

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

El control de hongos Fitopatógenos a través de fungicidas sintéticos continúa siendo la medida fitotecnia más importante para aumentar los rendimientos de los cultivos, sin embargo, la utilización masiva y a veces indiscriminada de estos productos a incrementado la población de organismos Fitopatógenos resistentes.

El marco de una agricultura sostenible ha llevado a investigadores de todo el mundo a buscar nuevos compuestos para el control de enfermedades cuya actividad y seguridad ambiental sea adecuada. En este sentido, se han desarrollado alternativas naturales entre las cuales se encuentra el uso de extractos vegetales, con los que se han obtenido resultados prometedores, además los extractos vegetales tienen las ventajas de poseer un origen biológico, ser desagradables y manifestar un mínimo impacto negativo sobre la salud humana y el medio ambiente(Asocolflores, 1995).

La agricultura ecológica, orgánica o biológica enmarca todos los sistemas agrícolas que promueven la producción sana y segura de fibras y alimentos desde el punto ambiental, social y económico. Está basada en un sistema de producción sostenible, en el cual no se hace uso de fertilizantes, herbicidas o pesticidas químicos, u otras sustancias tóxicas que pueden llegar a causar algún daño a la salud humana, animal y al medio ambiente. Dicho de otra forma, la agricultura ecológica trabaja bajo el concepto de producción sostenible y competitividad, sin deterioro de los recursos naturales, con un fin muy claro, el crecimiento económico y del mejoramiento de la vida de la población.

El manejo integrado de plagas es un método para combatir poblaciones no deseadas siendo responsable con el medio ambiente. Existen productos biológicos que pueden llegar a ser muy efectivos para el control de plagas. Se conocen sustancias extraídas de plantas que tienen un efecto anti fúngico contra la población dañina y sin contaminación del recurso suelo y agua (French & Hebert, 1980).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad anti fúngica de los extractos vegetales, a través de la inhibición del crecimiento micelar, para el control in vitro del *Fusarium sp.*

1.1.2. Objetivo Específicos

- Obtener extractos acuosos, a través de la trituración de vegetales, usando bulbos en el caso del ajo, hojas y tallos para la cola de caballo, tomillo y tabaco, para realizar las pruebas de la eficiencia anti fúngica.
- Aislar y purificar el hongo (*Fusarium sp.*) para la inoculación en los medios de cultivos.
- Comprobar la capacidad anti fúngica de cuatro extractos vegetales Ajo (*Allium sativum L.*), Tabaco (*Nicotina Tabacum L.*), Tomillo (*Thymus vulgaris L.*), Cola de caballo (*Equisetum sp.*), aplicando diferentes dosis; 0,45ml (1%), 1,35 ml. (3%), 2,25ml. (5%), mediante la medición de la inhibición micelar, para control del (*Fusarium sp.*).

CAPÍTULO III

II. MARCO TEÓRICO

2.1. FUNGICIDAS BIOLÓGICOS.

Los hongos constituyen el grupo más importante entre los agentes causales de tipo infeccioso que provocan enfermedades de las plantas. El número exacto de hongos fitopatógenos se desconoce, pero se estiman en un número superior a las diez mil especies, pertenecientes a diversas categorías taxonómicas (Asocolflores, 1995).

2.2. PRODUCCIÓN ORGÁNICA.

Agricultura orgánica es un sistema de producción que mediante el manejo racional de los recursos naturales, sin la utilización de productos de síntesis química, brinden alimentos sanos y abundantes, mantengan o incrementen la fertilidad del suelo y la diversidad biológica (Issues, 1989).

Uno de los factores que limita la producción de los cultivos son las plagas y enfermedades agrícolas y el uso indiscriminado de fungicidas, insecticidas orgánicos sintéticos, ha traído como consecuencia la selección de individuos muy resistentes, la aparición de nuevas enfermedades y plagas la contaminación ambiental producida por el hombre.

Estos factores han hecho posible el surgimiento de nuevos sistemas de producción orgánica, han creado la necesidad de obtener productos inofensivos para otros organismos no perjudiciales y han obligado a legislar estrictamente sobre la presencia de los residuos en los productos agropecuarios (Cañedo & Ames, 2004).

El término de agricultura orgánica, se refiere al proceso que utiliza métodos que respetan el medio ambiente, desde las etapas de producción hasta la manipulación y procesamiento.

La producción orgánica no solo se ocupa del producto, sino también de todo el sistema que se usa para producir y entregar el producto al consumidor final.

De acuerdo a la Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica (IFOAM), la agricultura orgánica es un enfoque integral basado en un conjunto de

procesos que resulta en un ecosistema sostenible, alimentos seguros, buena nutrición y bienestar animal.

Todas las normas existentes que regulan la agricultura orgánica prohíben el uso de la mayoría de los plaguicidas y fertilizantes sintéticos, todos los preservativos sintéticos los organismos genéticamente modificados (Scialabba, 2003).

2.3.CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS HONGOS.

Los hongos constituyen el grupo más importante entre los agentes causales de tipo infectivo que provocan enfermedades en las plantas. El número exacto de hongos fitopatógenos se desconoce, pero se estima en un número superior a las diez mil especies, pertenecientes a diversas categorías taxonómicas (Fernandez, 1980).

Debido a que cada una de las enfermedades fungosa de las plantas casi siempre se debe a un solo tipo de hongos ya que hay más de 100000 especies diferentes de hongos, la identificación de la especies que se encuentran en una planta enferma o en un medio de cultivo, implica que deben excluirse todas, excepto una de la especies de hongos conocidas.

Las características más importantes de los hongos utilizadas para su identificación, son sus esporas y sus cuerpos fructíferos (o estructuras portadoras de la spora) y, hasta cierto grado, las características de su soma (plasmodio o micelio). Estos órganos se examinan directamente en el microscopio compuesto después de haber sido retirados de la planta que han infectado. Con frecuencia, el espécimen infectado debe mantenerse húmedo durante algunos días para permitir el desarrollo de los cuerpos fructíferos del hongo, o en todo caso este último debe aislarse y cultivarse en medios artificiales a fin de que su identificación se realice con base de los cuerpos fructíferos que produzcan esos medios. En el caso de algunos hongos, se han generado medios nutritivos especiales que permiten cultivar selectivamente solo a una determinada especie de hongo, permitiendo su rápida identificación.

La forma, color, tamaño y manera en que se disponen las esporas sobre los esporos o cuerpos fructíferos, así como la forma, color, etc., de esas estructuras reproductoras, son características suficientes para sugerir (con una cierta experiencia

en taxonomía de hongos), la clase, orden, familia y género al cual pertenece un determinado hongo. En cualquiera de los casos, esas características se utilizan para determinar el género y la especie a la que pertenece un hongo determinado, y eso se logra mediante la consulta de claves analíticas que se han publicado para la identificación de las especies de hongos. Una vez que se ha identificado la especie de cierto hongo, deben consultarse las descripciones específicas de la especie en monografías de los géneros de hongos o en publicaciones específicas de revistas de investigaciones. Debido a que por lo general siempre hay listas de los patógenos que afectan a una determinada planta hospedante, deben utilizarse los índices de hospedante como medios de rápida consulta de los nombres de las especies de los hongos que pudieran corresponder al hongo que se desea identificar (Gonzales, 1975).

Los hongos son organismos eucariotas uní o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos y con poca luz.

Antiguamente, los hongos se incluían en el reino Plantae, pero por carecer de clorofila y por tener una composición química diferente, se los clasifica en reinos diferentes. La nutrición de los hongos es heterótrofa, es decir, que no pueden producir sus propios alimentos como lo hacen las plantas. Descomponen la materia orgánica por medio de enzimas, absorbiendo las sustancias nutritivas (Urbina, 2011).

La pared celular de los hongos está formada por quitina, celulosa, o ambas, permitiéndoles un alto grado de interacción con el substrato; en el caso de los hongos fitopatógenos esto tiene gran importancia, tanto como para la absorción de nutrientes como para la secreción de enzimas y metabolitos. Las células tienen uno más núcleos, bien definidos, con membrana, nucléolo y cromatina. A diferencia de los nucléolos de las plantas superiores, los de los hongos son haploides durante la mayor parte del ciclo vegetativo. A continuación se describe alguna de sus estructuras:

- **Micelio:** Cuerpo vegetativo o talo, generalmente formado por ramificaciones filamentosas llamadas hifas.
- **Hifa:** Cada uno de los filamentos que forma un micelio.

- **Haustorio:** Apéndice o proyección especializada de la hifa, que sirve a ciertos hongos para extraer nutrientes de las células del hospedante.
- **Esclerocio:** Cuerpo vegetativo macroscópico, de consistencia dura, que generalmente sirve de medio de sobrevivencia en condiciones adversas.
- **Estroma:** Aglomeración compacta de hifas, a manera de colchón, en la cual se forman las fructificaciones del hongo, ya sea en su superficie o dentro de sus cavidades especiales.
- **Rizo morfo:** Haz compacto y elongado de hifas, en forma de cordón, resistente a condiciones adversas de ambiente.
- **Espora:** Cuerpo formado por una o varias células, que puede separarse del micelio, y bajo condiciones favorables producir un nuevo micelio, sirve como un medio de diseminación y reproducción.
- **Conidio:** Espora asexual, generalmente no resistente (decidua), que se forma sobre hifas especializadas llamadas conidióforos.
- **Clamidosporo:** Espora asexual, generalmente resistente, y de pared gruesa, que se forma en una hifa o en un conidio por transformación de o varias células.
- **Esporangio:** Órgano que produce esporas asexuales endógenas, el esporangio se forma sobre una hifa modificada llamada esporangióforo (Gonzales, 1975).

Morfología de los hongos Fitopatógenos



(Agrios, 1996)

2.3.1. Síntomas que producen los hongos en las plantas.

Los síntomas que producen los hongos en su hospedero son de tipo local o general y pueden aparecer por separado en hospedantes distintos, o en un mismo hospedante, puede aparecer uno después de otro. En general, los hongos producen una necrosis local o general o la muerte de los tejidos vegetales que infectan, hipertrofia e hipoplasia o atrofia de plantas compuestas o de sus órganos, e hiperplasia o crecimiento excesivo de ellas o de alguno de sus órganos.

Los síntomas necróticos más conocidos son los siguientes:

- **Manchas foliares:** Lesiones localizadas en las hojas de los hospedantes que constan de células muertas y colapsadas.

- **Tizón:** Coloración café general, y se extiende en forma extremadamente rápida en las hojas, ramas, ramitas y órganos florales de una planta, que dan como resultado la muerte de estos órganos.
- **Cancro:** Herida localizada o lesión necrótica; con frecuencia sumida bajo la superficie del tallo de una planta leñosa.
- **Muerte descendente:** Necrosis generalizada de las ramitas de las plantas que se inicia en las puntas y sigue hasta su base.
- **Pudrición de la raíz:** Pudrición o desintegración de todo el sistema radicular de una planta.
- **Ahogamiento o secadera:** Muerte rápida y colapso de plántulas muy jóvenes que se cultivan en el campo o en el almacigo.
- **Pudrición basal del tallo:** Desintegración de la parte inferior del tallo.
- **Pudriciones blandas y secas:** Maceración y desintegración de frutos, raíces, bulbos, tubérculos y hojas carnosas de las plantas.
- **Antracnosis:** Lesión necrótica que se asemeja a una ulcera profunda y que se produce en el tallo, hojas, frutos o flores de las plantas hospedantes.

La mayoría de los síntomas mencionados también pueden causar una notable atrofia de las plantas que han sido infectadas. Además de algunos otros síntomas, como la roya de las hojas, mildius, marchitamientos e incluso algunas enfermedades que producen hiperplasia de algunos órganos de las plantas (como la hernia de las crucíferas), producen también la atrofia de toda la planta completa. En muchas enfermedades, el patógeno se desarrolla, o produce varias estructuras sobre la superficie de su hospedante, estas estructuras, que incluyen al micelio, esclerosis, esporóforos, cuerpos fructíferos y esporas, se las denomina signos y difieren de los síntomas, los cuales solo se refieren a la apariencia que toman las plantas o sus tejidos cuando han sido infectados. Así por ejemplo, en los mildius, lo que se observa con mayor frecuencia son los signos representados por las esporas y el crecimiento veloso y blanquizco del micelio del hongo sobre las hojas, frutos o tallos de la planta, mientras que los síntomas consisten en

lesiones necróticas o cloróticas que aparecen sobre las hojas, frutos y tallos y el crecimiento deficiente de la planta. (Agrios, 1995).

2.3.2. Ciclo de vida de los hongos

Aun cuando el ciclo de vida de los hongos de los distintos grupos varía ampliamente la gran mayoría de ellos pasan a través de una serie de etapas que son bastante similares. Así la mayoría de los hongos tienen una etapa de esporas que contiene un núcleo haploide (que posee una serie de cromosomas, o $1N$). La espora al germinar produce una hifa que contiene también núcleo haploide. La hifa produce de nuevo esporas haploides (como ocurre siempre en los hongos imperfectos) o puede fusionarse con otra hifa para producir una hifa fecunda en la que los núcleos se fusionan para formar un núcleo diploide denominado cigoto (el cual contiene ahora dos series de cromosomas, $02N$). En los Oomicetos, el cigoto se divide y produce esporas haploides, las cuales concluyen el ciclo. En una fase breve del ciclo de vida en la mayoría de los ascomicetos y por lo general en todos los basidiomicetos, el par de núcleos de la hifa fecundados, no se fusionan sino que se mantienen separados en pares dentro de la célula (condición diacrítica o $N+N$) y se dividen simultáneamente para producir más células hifales que contienen pares de núcleos. En los ascomicetos, las hifas dicarióticas se localizan solo en el interior de los cuerpos fructíferos, en los cuales dan origen a las hifas ascogenas, ya que los dos núcleos de una célula de cada una de las hifas se fusionan para formar un cigoto (con número diploide de cromosomas o $2N$), el cual se divide meióticamente para producir ascosporas que contienen núcleos haploides.

En los basidiomicetos, las esporas haploides solo producen pequeñas hifas haploides. Cuando estas son fecundadas, se produce un micelio dicariótico ($N+N$), el cual se desarrolla para constituir el soma del hongo. Dichas hifas dicarióticas pueden producir por vías asexuales, esporas dicarióticas que se desarrollaran de nuevo en un micelio dicariótico. Sin embargo, en cualquiera de los casos, los núcleos apareados de las células se fusionan y se forman cigotos, los cuales se dividen meióticamente para producir basidiosporas que contienen ahora núcleos haploides.

Por supuesto, en los hongos imperfectos solo se encuentra el ciclo asexual que sigue la secuencia: espora haploide - micelio haploide - espora haploide. Sin embargo, incluso los demás hongos, el ciclo que con mayor frecuencia se presenta es el asexual, debido a que puede repetirse varias veces en cada estación de crecimiento. Por lo común, el cigoto asexual solo se produce una vez al año (Agris, 1995).

2.4. FUSARIUM SP.

Cuadro 1

Clasificación taxonómica del *Fusarium sp.*

Reino:	Hongo o Fungi
Phylum:	Mycophytae.
División:	Micophytos.
Clase:	Deuteromicetes
Orden:	Moniliales
Flia:	Moniliaceae
Nombre científico:	<i>Fusarium sp.</i>

(Herbario Universitario, 2016)

Es un extenso género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. La mayoría de las especies son saprófitas y son unos miembros relativamente abundantes de la microbiota del suelo. Las esporas del hongo son fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de corona. Algunas especies producen micotoxinas en los cereales y pueden afectar a la salud de las personas y animales si estas están en la cadena alimentaria. Las principales toxinas producidas por estas especies son fumonisinas y tricótesenos. Son patógenos facultativos, capaces de sobrevivir en el agua y suelo alimentándose de materiales en descomposición. Son importantes agentes de contaminación en los laboratorios de microbiología. Algunas especies son Fito patógenas causando la enfermedad conocida como fusariosis (Smith, 2002).

Los hongos del género *Fusarium* tienen una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Su ocurrencia es

cosmopolita y las diversas especies son comunes en el suelo, en el aire y en el agua. Muchas especies del género *Fusarium* tienen una gran capacidad de ocasionar enfermedades en distintos tipos de plantas cultivadas. Pero algunas especies de este género son benéficas en la agricultura y se han utilizado en el control biológico de ciertas enfermedades causadas por especies patogénicas (Arbelaez, 2000).

Algunas especies dentro el género llegan a presentar un esporodoquio, muchas otras no lo presentan y las células esporógenas, son producidas directamente sobre las hifas o sobre un conidióforo corto, conidios de dos tipos, microconidios no septados o con un solo septo y macroconidios en forma de media luna o fusiformes con septos transversales, hialinos, algunas especies forman cadenas de micronidios (Moreno, 1988).

Los hongos fitopatógenos se reproducen por esporas, formadas en estructuras conocidas como conidióforos, esporangios, ascocarpos, basidios, etc, las cuales son empleadas para la correcta identificación de estos organismos; tales estructuras pueden observarse directamente sobre la superficie del órgano vegetal o dentro de los tejidos son incluso intercelulares.

No en todos los casos es posible hacer la observación directa de los hongos fitopatógenos en los tejidos, pero afortunadamente muchos de ellos pueden cultivarse en medios sintéticos adecuados para cada especie, lo que es de gran ayuda en el diagnóstico de las enfermedades que causan (Sosa-Mos & Salazar, 1997).

2.4.1. Condiciones favorables.

Es un hongo de temperaturas cálidas, el desarrollo óptimo se presenta a 20°C el rango va de 12 a 28°C. Esta temperatura acompañada de la alta humedad relativa, días cortos de baja intensidad lumínica favorecen al desarrollo de la enfermedad. Otros factores son los suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio.

Las heridas ocasionadas a las raíces por maquinaria o nematodos como es el caso de *Melodogyne incognita* aumentan la susceptibilidad al marchitamiento y favorecen el desarrollo del hongo (La Torre, 1999).

2.4.2. Daños.

El hongo invade el sistema vascular de las raíces y se distribuye por la planta gracias a los vasos conductores, obstruyéndolos e impidiendo ascender la savia proveniente de las raíces. Las hojas se vuelven flácidas y se necrosan. Aparece un amarillamiento en un sector lateral de las hojas, y a lo largo del tallo una necrosis, acompañada de unas secreciones gomosas. También hay una reducción del desarrollo de la planta en comparación a las plantas sanas. Las raíces se ven afectadas completamente, desarrollándose una podredumbre en el córtex y en el xilema, seca y de color castaño, que puede llegar a desarrollar chancros.

En los ataques en cereales, cuando la infección se produce muy temprano, mata la flor y no desarrolla el grano, mientras que si la infección es más tardía, afecta sólo algunos granos, aunque se debe tener en cuenta la formación de toxinas (Costales & Fernandez, 2010).

2.5.FUSARIOSIS O MARCHITAMIENTO DEL TOMATE.

2.5.1. Organismo causal.

El organismo causal es el hongo perteneciente a la clase deuteromycete denominado *Fusarium oxysporum sp. lycopersici*.

El hongo causal de esta enfermedad fue descrito en Italia, en 1882, por Saccardo con el nombre de *Fusarium Lycopersisci*, pero su acción patógena fue determinada por Masee (1895) en Gran Bretaña en donde en años recientes, había ocasionado considerables pérdidas (Von Tubeuf y Smith 1897), pero según Chupp (1925), es probable que la enfermedad existiera mucho antes en Europa y en los Estados Unidos.

En la Argentina fue observada por primera vez en enero de 1959 en tomates cultivados en la Estación Experimental del Delta del Paraná (Marfurt 1964) y determinando que era producida por *Fusarium Oxysporium f. sp. Lycopersici* por Carrera en 1972. En 1960, según Bergna, se hizo evidente en los tomates de la zona del Alto Valle del río Negro, habiéndose determinado el mismo agente causal.

En la actualidad se observa con mucha frecuencia en los cultivos de esta zona y probablemente tenga amplia difusión en otras zonas del país.

2.5.2. Distribución Geográfica.

África, Asia, Australia, Europa, y Norte Centro y Sud del continente Americano. Es un patógeno predominante en regiones de clima cálido-templado, siendo la temperatura óptima del suelo para su desarrollo 28°C.

2.5.3. Hospedante.

Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.).

2.5.4. Sintomatología.

El síntoma típico al final del proceso es el marchitamiento de la planta. En el campo, lo primero que se observa es la amarillez de las hojas inferiores, que luego se marchitan. Esta amarillez va progresando hacia la parte superior de la planta, pero antes que alcance la parte apical ya manifiesta pérdida de vigor, flacidez, y el desarrollo se paraliza. A veces los síntomas se manifiestan al comienzo de una sola rama, pero finalmente toda la planta sucumbe.

Las raíces principales y la base del tallo, presentan necrosis vascular, manifiesta ya a la iniciación de los síntomas foliares (Smith., 1991).

2.5.5. Patogenia.

- **Penetración:** Por heridas o aberturas naturales principalmente en las raíces.
- **Infección:** Más o menos generalizada (sistémica).
- **Incubación:** Según Matta y Dimond (1963) los síntomas foliares se manifiestan lentamente durante los seis primeros días posteriores a la inoculación, aumentando rápidamente hasta el décimo sexto día, y luego desarrolla más lentamente hasta que las hojas se marchitan. El primer síntoma de decoloración de los vasos aparece a los 14 días después de la inoculación al sistema radical.

2.5.6. Razas.

Una de las más importantes contribuciones al control a la enfermedad ha sido por Bohn y Tucker (1939) de que *Lycopersicum pinpenellifolium* Acc. 160 (P. I. 79532) posee un factor de resistencia al marchitamiento. Esta resistencia es heredada en la forma mendeliana simple de un solo gen dominante (gen 1) y ha sido transferida a una larga lista de variedades comerciales.

Henderson y Winstead (1961) indicaron la existencia de 55 variedades o líneas con este tipo de resistencia. La raza del hongo a la cual *L. pimpinellifolium* confiere resistencia ha sido denominada Raza 1 o común y se supone que es la que se halla difundido en todo el mundo.

Alexander y Tucker (1945) determinaron que otra raza (Raza 2) *F. Oxyosporum f. sp. Lycopersici*, atacaba a las plantas de tomate que contenían al gen I, resistente a la Raza I. Las pérdidas económicas recién fueron determinadas en 1961, por Estall, en Florida (Estados Unidos). Según este autor, cientos de acres de tierra apta para tomate debieron ser abandonados en Florida todos los años por falta de medidas prácticas para el control de esta raza, la cual parece que solo existe en algunos estados de ese país.

Las razas 1 y 2 también han sido encontradas en Brasil, por Tokeshi y Galli (1966), y además un nuevo aislamiento de *F. Oxyosporum f. sp. Lycopersici* ha manifestado diferentes características que diferencian a ambas razas, suponiendo los autores que se trata de una nueva raza, que denominan N°3, pues ataca a las variedades comerciales y con resistencia a las razas 1 y 2, pero no a *L. pimpinellifolium*.

Según Da Silveira y Bastos Cruz (1970), es esta una raza muy patógena representando un peligro potencial para el cultivo del tomate en ese estado, pues las variedades e híbridos resistentes a la raza 1 y 2 son susceptibles a la raza 3.

2.5.7. Propagación.

Se transmite por el terreno y por la semilla del tomate. La propagación a distancia se hace entonces, por la semilla y por los trasplantes. Localmente por los trasplantes de plantas con inoculo, por el viento y por el agua de riego (Michereff, 2005).

2.6. COMPORTAMIENTO VARIETAL.

En los Estados Unidos y también en otros países, la mayoría de las variedades comerciales contienen resistencia a la raza 1, no a si a la raza 2, como la variedad munapal, por ejemplo. En Australia los nuevos cultivares “Collegue Abundant” y “Collegue Red” son resistentes a la raza 2.

Una selección de tomate “P1 126.015” originaria del Perú (un nuevo híbrido de *Lycopersicum pinpinellifolium X L. Esculetum*), ha demostrado tener resistencia a ambas razas. Cuando fue cruzado con variedades comerciales de tomate, el modo de heredar la resistencia a cada raza fue similar a la de un simple gen dominante. Pruebas de campo, confirmaron que la resistencia fue altamente efectiva (Valiela, 1979).

2.6.1. Daños.

Comúnmente cuando la marchitez ocurre los frutos comienzan a madurar, siendo la pérdida de los mismos parcial o total.

2.6.2. Control.

El único control efectivo es el empleo de variedades resistentes. Según Stall (1995), este hongo sobrevive en muchos tipos de suelos y estos permanecen infectados casi indefinidamente, señalando que la rotación nunca ha demostrado eficiencia en el control de este patógeno. Yong (1962), Tobolski y Wahl (1963); Biehn y Dimond (1970,) En los Estados Unidos, señalan que la aplicación de fungicidas al terreno, vorlex, bromuro de metilo y benomyl, puede ser un método importante en la lucha contra este hongo.

La corrección del terreno con cal hidráulica ha demostrado eficiencia, según Jones y Woltz (1969-1970), especialmente en la raza 2.

2.7. DIAGNOSIS DE LA ENFERMEDAD.

El diagnóstico de la enfermedad de planta requiere la ejecución de varios pasos consecutivos, que pueden variar según las circunstancias.

2.7.1. Pasos del diagnóstico.

- a. Observación de síntomas.
- b. Determinación de las circunstancias particulares del caso: condiciones climáticas; relieve del terreno; distribución de la enfermedad en el campo; historial de cultivos previos, aplicación de fertilizantes, insecticidas, fungicidas, nematocidas, y herbicidas (estos dos últimos en años anteriores pueden tener efectos duraderos).
- c. Observación de señales de patógenos.
- d. Correlación de lo observado con la bibliografía pertinente.

El aislamiento del patógeno *in vitro* o su perpetuación y purificación a través de un hospedante apropiado.

2.8. OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS

Las enfermedades afectan a todos los órganos de la planta. Describir todas las posibles combinaciones de síntomas y órganos para los distintos tipos de cultivo sería difícil e inapropiado. Los tipos de síntomas se dan a continuación y las causas más comunes en orden de importancia entre paréntesis usando como clave la primera letra de las siguientes causas: Hongo, Bacteria, Micoplasma, Virus, Nematodo, Abiótica.

Manchas, Cloróticas (A, B, H, M, V), oscuras (H, N), mosaicos (V), traslucidas (B), venales (V, H), intervenales (H, B, V, A), redondas (H, B), angulares (H, B), alargadas (H, N), corchosas (V), necróticas (H, B, V), gomosas (V), pústulas (H), y chancros (H, B), ocurren en todos los órganos de la planta.

2.9. CIRCUNSTANCIAS PARTICULARES

Los factores del ambiente no biótico en el cual crecen las plantas, pueden afectarlas directamente o predisponerles a agentes causantes de enfermedades.

2.9.1. Causas abióticas

Las enfermedades pueden resultar de temperaturas inapropiadas, exceso o falta de agua o nutrientes, toxicidad por residuos de cosechas anteriores o productos químicos aplicados a estos, toxicidad ambiental, y hasta la caída de un rayo. La distribución de la enfermedad en el campo puede ser clave de alguna de estas.

2.9.2. Factores de predisposición

Los factores ambientales que predisponen y por lo tanto favorecen la incidencia y afecciones por patógenos son: temperaturas desfavorables a la planta, temperaturas favorables al patógeno; humedad desfavorable para la planta; humedad favorable para el patógeno; nutrición desfavorable al crecimiento de la planta; nutrición favorable a la planta pero que también favorece al patógeno; acumulación de sustancias metabólicas en condiciones de almacenaje; carencia de oxígeno (por exceso de agua o falta de aireación en el almacenaje); carencia de luz; exceso de radiación solar; efecto residual de herbicidas usados para otros cultivos no susceptibles; prácticas culturales inapropiadas.

2.9.3. Señas del patógeno.

Algunos patógenos son más conspicuos que otros, las setas y esclerotes de algunos hongos son reconocidos simple vista sobre las plantas afectadas. El aspecto algodonoso o pulverulento de otros los delata. Los picnidios de algunos hongos, en cambio, son apenas perceptibles, pero con una lupa de 10x, se observa su presencia. Las hembras de algunos nemátodos forman quistes o agallas característicos en ciertos cultivos, que son reconocidos a simple vista por los especialistas. Las bacterias pueden formar exudados característicos, pero estas, como los micoplasmas y virus, no se pueden ver sin mucho aumento (Valiela, 1979).

2.10. AISLAMIENTO DE HONGOS IN VITRO.

2.10.1. Método de aislamiento.

La mayoría de las enfermedades de las plantas se diagnostican al observar a simple vista o mediante al microscopio, lo cual hace innecesario, el aislamiento del

Patógeno. Sin embargo hay muchas enfermedades fungosas en las que es imposible identificar al patógeno que ya se encuentra mezclado con uno más contaminantes, porque aún no están producidos sus cuerpos fructíferos característicos y esporas, debido a que una misma enfermedad pueda deberse a uno o más patógenos morfológicamente semejantes o tal vez a algún factor del ambiente, o bien que la enfermedad es causada por un nuevo patógeno hasta ese momento desconocido, el cual debe aislarse y estudiarse.

Como es habitual, los patógenos de enfermedades desconocidas deben aislarse de los tejidos enfermos de una planta a fin de que se pueda llevar a cabo un estudio de sus características hábitos.

El método más común para aislar patógenos es aquel que se selecciona varios cortes pequeños de 5 a 10 mm a partir del borde de la lesión infectada, a fin que contenga tejidos enfermos y tejidos al parecer sanos, esos cortes se colocan en una de las soluciones esterilizantes de superficie lo cual asegura que esa superficie se humedezca y al cabo de 15 o 30 segundos los cortes se toman asépticamente uno por uno a intervalos regulares de tiempo, a fin que cada uno de ellos se esterilice. Posteriormente los cortes se secan con trozos limpios de papel estéril o se pasa por tres cambios de agua estéril, y por último se colocan sobre el medio nutritivo (por lo común, de 3 a 5 por de caja Petri) (Agrios., 1996).

2.10.2. Consideraciones preliminares.

La posibilidad de poder aislar un fitopatógeno no obligado en cultivo, depende inicialmente de sus requerimientos ambientales: nutrición, temperatura, luz, pH, etc. En el caso de patógenos obligados no se han determinado las condiciones de cultivo para mantenerlos.

Un factor primordial para el aislamiento de un patógeno es dar las condiciones más favorables a este y a la vez las más desfavorables posibles a sus competidores. Cuando se conocen a sus competidores a veces se pueden utilizar técnicas especiales para contrarrestarlos. Cuando la tarea es muy difícil in vitro, se puede recurrir al uso de una planta hospedante, o a un órgano vivo de planta.

Para poder proceder al aislamiento de un patógeno, es esencial realizar previamente los pasos para el diagnóstico, puesto que la metodología de aislamiento de distintos grupos de microorganismos varía mucho y se tiene que tener un criterio formado de las condiciones necesarias. Si hay la más leve sospecha de que el patógeno es una bacteria, debe proceder primero a tratar de aislar, y si hubiera duda por haberse observado ambas, bacterias y hongos, durante el diagnóstico, después de iniciado el proceso de aislar bacterias, debe hacerse lo mismo para aislar los hongos.

2.10.3. Aislamiento de hongos Patógenos.

El peor enemigo del hongo y del investigador en el proceso de aislar hongos fitopatógenos, es la contaminación bacteriana y de otros hongos secundarios más políficos. Por esta razón se utilizan varias técnicas de limpieza, desinfección, y antagonismo a los contaminantes.

2.10.4. Lavado de tejidos afectados.

- a. Partes subterráneas: Deben lavarse bajo agua corriente, con la ayuda de un cepillo suave. Para casos difíciles como de algunos ficomicetos, patógenos sensibles a desinfectantes, se alarga el proceso de lavado para eliminar el uso de desinfectantes. Se colocan porciones de las raíces lavadas en un frasco tapado con una malla o gasa y se deja caer un chorro de agua sobre este durante dos o más horas.
- b. Partes aéreas: Los órganos aéreos son generalmente difíciles de mojar. Una sumersión instantánea en alcohol etílico 70% antes de introducir en agua, o el uso de un detergente líquido (unas 2-3 gotas por litro) generalmente resuelve el problema. Los tejidos aparentemente limpios no necesitan lavado, excepto el que se hace durante la desinfección.

2.10.5. Desinfección.

- a. El alcohol al 70% es útil para la desinfección superficial de órganos leñosos como ramas, troncos, y raíces gruesas, u otros órganos gruesos y difíciles de mojar. Se sumergen un instante y luego se flamean; pero si el órgano es delgado o el patógeno superficial, morirán por el calor. Se siembra material disectado del interior.

- b. Bicloruro de mercurio (HgCl_2), 1 gr/lt. Se sumergen los trozos que se desinfectaran por 1-2 minutos, se enjuagaran en agua estéril y se siembran. Debido a que este producto es toxico al hombre y penetra por contacto y además que tiene que ser enjuagado del material por que no se descompone, no se recomienda su uso, excepto cuando el método siguiente no resulta.
- c. Hipoclorito de sodio (NaClO) 0,5-1%. La forma más conveniente es usar la legía marca “CLOROX2 (5,25% NaClO) aprox.), diluida 1/5-1/10. Se pueden adquirir concentraciones similares como reactivos, por medio de los proveedores de materiales de laboratorio, pero a mucho mayor costo.
- d. Sumerja durante 2 minutos, en la solución de clorox al 10%, pedazos de tallo, hojas o frutos enfermos de 1 centímetro de largo. Con las pinzas esterilizadas a la llama, transferirlos a los platos Petri con agar y agua colocando 3 pedazos en cada plato. Una vez que aparecen las colonias con la ayuda del asa transfiera una pequeña porción del borde de la colonia a tubos de ensayo con agar papa dextrosa (Echandi, 1967).

2.10.6. Siembra.

Cuando el material del cual se desea aislar este lo suficientemente limpio y desinfectado se corta en trozos de tamaño adecuado para siembra. El hongo está más activo cerca del margen de avance de las lesiones, por lo que se cortan porciones de tejido enfermo de esas zonas.

Cuando se trata de hojas, se cortan porciones de 0,5 cm o menos en cuadrados. En el caso de tallos y raíces delgadas se hacen secciones de 0,5 cm de largo. De órganos más grandes, se sacan asépticamente trozos internos del sitio más indicado, y se siembran sin desinfectarlos en un medio bacteriostático (triple-A, APSA, etc.).

La desinfección del tejido antes de cortarlo para la siembra se lo hace con NaClO 0,5-1%, sumergiendo el material unos segundos hasta que esté bien mojado (se usa Tween si es necesario) o se deja hasta 1 minuto (a menos concentración más tiempo). Para sembrar el material escúrralo y ubíquelo con una pinza sobre el medio escogido. Por lo general se hace cuatro siembras equidistantes por placa.

El uso de alcohol o llama para desinfectar la pinza no es necesario porque el NaClO lo hace. Este es un oxidante fuerte. Si la pinza no se enjuaga bien cuando se termina la labor, se corroe. Después de la desinfección no se enjuaga porque la luz y el aire descomponen rápidamente al NaClO. Esto se debe tomar en cuenta y renovarse las soluciones que se utilizan, guardándolas en botellas oscuras o a prueba de luz. Algunos fitopatólogos prefieren usar el hipoclorito de calcio que no se descompone fácilmente y requiere un doble enjuague. El uso de una piseta con agua estéril facilita este proceso.

Es importante escoger bien los medios para siembra. Cuando no se tiene familiaridad con el material que se quiere aislar conviene utilizar varios medios. Los medios pobres en hidratos de carbono son superiores para la observación e identificación de hongos, porque a menudo producen un desarrollo del micelio poco tupido, limitan la multiplicación de bacterias contaminantes e inducen al hongo a entrar antes a su fase reproductiva o de esporulación, hasta un medio sin nutrientes puede ser ventajoso.

2.10.7. Incubación.

Casi todos los hongos crecen bien a temperaturas entre 20 y 25°C, y un gran porcentaje esporula antes o mejor, con luz. Por estas razones es preferible mantener un laboratorio a unos 22°C e inocular las placas sembrando en ese ambiente con la luz disponible. Es preferible un control ambiental que favorezca también al investigador, en vez de una incubadora con iluminación, lo cual sería más costoso. Las incubadoras tienen la desventaja que se contaminan con ácaros que interfieren con el trabajo. El almacenamiento de placas para el periodo de incubación se puede hacer sobre una mesa bajo campanas de vidrio o plástico, o sobre estantes de armarios, gabinetes, o anaqueles con compartimentos y puertas de vidrio.

2.10.8. Observación.

Conviene observar las placas todos los días, porque algunos hongos crecen muy rápido. Todos los trozos inoculados pueden resultar en el crecimiento de un mismo hongo, pero por lo general se aprecia a simple vista por diferencias en coloración, desarrollo, crecimiento aéreo, etc., que más de un hongo ha crecido de un mismo

trozo inoculado, de distintas siembras. Muchas inoculaciones pueden resultar negativas. El hongo que predomina es el que merece atención primero, pero no se deben descuidar a los otros, excepto que sean contaminantes usuales. Una vez que el hongo de interés haya crecido unos 2 cm de su punto de origen, o estén por hacer contacto los hongos de varias siembras en una misma placa, es el momento de trasplantarlos del margen de avance a otras placas, o tubos inclinados para su futura identificación y prueba de patogenicidad. Para ganar tiempo o formular criterios sobre cual hongo es el patógeno, se pueden realizar identificaciones de estas placas unas ves hechos los trasplantes.

Cuando a simple vista no se distinguen adecuadamente similitudes y diferencias entre las colonias, se pueden observar los hongos por ambos lados de las placas, sin abrirlas, con un microscopio estereoscopio. Con el microscopio compuesto, a bajo aumento, es posible ver a través del fondo de las estructuras fungosas en el medio, las situadas en la superficie, y aun las aéreas. Abriendo las placas después de trasplantar, o en ambiente poco contaminado, se puede ver muchas características de las estructuras de un hongo, especialmente de las aéreas, que no se ven en las preparaciones microscópicas. Estas últimas se requieren para ver el detalle de los órganos del micelio.

2.10.9. Purificación de Hongos.

En algunos casos es difícil separar al hongo de ciertas bacterias contaminantes (aun usando sustancias bacteriostáticas) o separar dos hongos que se desarrollan juntos en las siembras realizadas. En otros casos de hongos muy variables, se recomienda hacer una purificación genética, aunque esto es relativo puesto que las células pueden ser multinucleares. Según los hongos esporulen o no, estos tipos de purificaciones se pueden realizar con técnicas de cultivo de punta de hifa o Monosporicos (Echandi, 19967).

2.11. EXTRACTOS VEGETALES.

El uso de productos naturales es tan antiguo como la humanidad. Los productos naturales son de naturaleza muy variada, desde sustancias biológicamente activas de origen marino, exudados de raíz y los más explorados, aquellos provenientes de las

plantas. La química orgánica estudia la estructura, transformación y efectos biológicos de los metabolitos secundarios presentes en diferentes organismos. Debido a sus propiedades y principios activos se están aplicando en medicina moderna, cosmetología, farmacéutica, biotecnología y últimamente como contribución muy prometedora en la agricultura ecológica.

En la naturaleza existen de 250.000 a 5000.000 especies vegetales, de las cuales se estima que al menos el 10% han sido estudiados en sus aspectos químicos y propiedades biológicas. Como se mencionó anteriormente, esta temática no es nueva, se había dejado al olvido por un largo periodo de tiempo y recientemente, el interés ha sido renovado valorando la diversidad de estructuras químicas en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Los productos de origen vegetal han sido, en las últimas décadas, mayormente estudiados en su parte química, con énfasis en los metabolitos secundarios, los cuales están implicados en el control biológico contra patógenos o plagas, y en ciertos casos, activando procesos de defensa en la planta, brindando una protección preventiva (Lizcano, 2007).

2.11.1. Producción de metabolitos.

Además de las rutas del metabolismo primario, idénticas o similares en todos los organismos vivos, los vegetales tienen otras vías metabólicas que llevan a la formación de compuestos característicos de un grupo taxonómico y cuya función no guarda relación con los procesos vitales de la célula que los biosintetiza, pero puede tener significación para el organismo productor como un todo. Estas rutas constituyen el metabolismo secundario. Las enzimas involucradas tendrán el carácter de metabolitos primarios o secundarios, dependiendo de su función metabólica (Illanes, 1994). La biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a períodos de estrés (Piñol & Palazón, 1993). Algunas células vegetales producen metabolitos secundarios importantes en las interacciones de la planta con el medio ambiente (protección frente a depredadores, patógenos o estrés ambiental) o que están relacionadas con la maquinaria reproductiva de la planta (atracción de insectos para la promoción de la polinización). Muchos de estos productos secundarios tienen uso en la industria farmacéutica y en la producción de test de diagnóstico, de fragancias, de aditivos alimentarios y de

biocidas en general. Lo anteriormente mencionado explica el interés de la industria en la producción de compuestos naturales cuya calidad y costos no sea afectada por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción.

Los metabolitos secundarios, son sustancias de bajo peso molecular, no son comunes en todas las plantas y por el contrario, pueden ser una expresión de la individualidad química de un organismo. Los productos del proceso fundamental de la fotosíntesis proporcionan los intermedios biosintéticos necesarios para dar lugar a la formación de los metabolitos secundarios, haciéndose evidente la interconexión entre productos del metabolismo primario con el secundario (Riveros, 2010).

Los compuestos fenólicos sencillos (hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos), son metabolitos secundarios comunes en las plantas con propiedades fungicidas. Las cumarinas son clasificadas como antifúngicas y antibacterianas. Los conjugados de los fenilpropanoides con aminas, se incorporan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez e impedir la entrada de patógenos. En cuanto a las fitoalexinas, estas son sintetizadas por las plantas, después de la infección y en actividad inhibidora de microorganismos patógenos, se han identificado un grupo importante, por ejemplo, la pisatina, la cual es un flavonoide sintetizado por el guisante, *Pisum sativum*, como reacción a la infección por hongos, siendo esta la primer fitoalexina aislada y caracterizada. Por otro lado, aquellos que hacen parte de la respuesta hipersensible, como es el caso de algunos compuestos perteneciente al grupo de alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente eliminando directamente al microorganismo patógeno y/o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa. Es así, como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas al ataque por patógenos.

Existen varios reportes en la literatura en donde registran plantas con actividad fungicida, como es el caso de *Allium sativum*, la cual contiene como compuesto activo aliina un aminoácido sulfurado; el aceite esencial de hojas de orégano

mexicano (*Lipp iagraveolens*), presenta fenoles timol y carvacol que son los principales componentes que le confieren poder antibacteriano y antifungico (Kagale et al. 2004). El aceite esencial obtenido desde hojas de limón (*Cymbopogon citratus*), que es rico en citral, myrceno, dipenteno, methylheptenona, ciertos alcoholes, y ácidos volátiles, presentó actividad antifungica, contra *Mycosphaerella fijiensis* en bioensayos realizados in vitro (Riveros, 2010).

2.11.2. Descripción y Preparación de extractos.

Extracto fermentado. Poner a macerar la planta, previamente troceada con tijeras, en agua durante unos días (de 5 a 30 días), según la temperatura ambiente y el tipo de planta que vayamos a usar. Tenemos que remover el preparado cada día durante unos minutos para oxigenar la mezcla. Al remover, tenemos que observar el momento en el que dejan de salir burbujas de fermentación, cuando eso pase hay que trasegarlo lo antes posible, si no empezará el proceso de putrefacción. El extracto final no huele bien, la verdad, pero tampoco tiene que oler pútrido el olor es comparable al de la orina de una vaca sana. *Es recomendable utilizar agua destilada o de lluvia para todos los preparados, incluso la infusión y la decocción, ya que las aguas calizas o con nitratos taponan las estomas de las plantas e impiden una buena absorción de substancias en el agua.*

2.12. EL AJO.

Cuadro 2
Taxonomía del Ajo

Reino:	Vegetal.
Phylum:	Telemophytae.
División:	Tracheophytae.
Subdivisión:	Anthophyta.
Clase:	Angiospermae.
Subclase:	Monocotyledoneae
Orden:	Liliflorales
Familia:	Liliaceae
Nombre científico:	<i>Allium sativum</i> L.
Nombre común:	Ajo

2.12.1. Descripción botánica del ajo.

Planta herbácea, perenne, acaule, bulbosa, con bulbos secundarios de color blanco o cremosos, hinchados, ovoides, de ápice agudo, llamados dientes de ajo, muy olorosos, reunidos sobre un tallo discoide, recubiertos por escamas membranosas, translúcidas, blanco amarillentas, que forman la llamada cabeza de ajo, cada una con 8 a 14 dientes. Hojas de color verde azulado o verde rojizo, planas, con un canal central, ápice agudo, hasta de 50 cm de longitud y 3 cm de ancho. Flores rosadas o blanquecinas agrupadas en pequeñas umbeladas densas, esféricas localizadas entre pequeños bulbos (Cordoba, 2010).

2.12.2. Componentes.

El principio activo del ajo es la alicina, este es un componente oxidante producido por el ajo crudo cuando sus células se rompen (durante el acto de corte por ejemplo), en su producción interviene una enzima denominada alinasa, la cual cataliza la conversión de la aliina en alicina.

2.13. EL TABACO.

Cuadro 3

Taxonomía del Tabaco

Reino:	Telemophytae.
Phylum:	Telemophytae.
División:	Tracheophytae.
Sub División:	Anthophyta.
Clase:	Angiospermae.
Sub Clase:	Dicotyledoneae
Grado Evolutivo:	Metachlamydeae
Grupo de Ordenes:	Tetraciclicos
Orden:	Polemoniales
Flia:	Solanaceae
Nombre científico:	<i>Nicotiana tabacum L.</i>
Nombre común:	Tabaco

2.13.1. Descripción botánica del Tabaco.

Planta anual, bienal o trienal, herbácea, de 0,90 a 1,50 m de altura, viscosa-pubescente. Hojas elípticas, aovadas, oblongas o lanceoladas, muy grandes, sésiles o pecioladas, las superiores auriculadas. Flores pubescentes de 5-6 cm de largo, dispuestas en panojas terminales; tubo de la corola ensanchado en su parte superior, blanquecino o blanco-rosado, con limbo extendido, pentalobulado, rojizo. Cápsula ovoide dehiscente por 2-4 valvas. Originarias América tropical. Cultivada para la elaboración del tabaco común (Dimitri, 1959).

2.13.2. Componentes.

Las plantas de tabaco contienen diversos metabolitos secundarios. Los grupos más importantes son los alcaloides, terpenos y componentes fenólicos. Se sabe que la síntesis de novo de muchos de estos compuestos se incrementa dramáticamente

como respuesta al daño mecánico, o ataque por herbívoros y/o patógenos y que este a cambio es inducido en muchos casos por el ácido jasmónico, el cual funciona como una señal mediadora en el metabolismo secundario en respuesta a muchos agobio biótico y abiótico (Citlalli & Aguirre, 2005).

2.14. EL TOMILLO.

Cuadro 4
Taxonomía del Tomillo

Reino:	Vegetal.
Phylum:	Telemophytae.
División:	Tracheophytae.
Subdivisión:	Anthophyta.
Clase:	Angiospermae.
Subclase:	Dicotyledoneae
Grado Evolutivo:	Metachlamideae
Grupo de Ordenes:	Tetracíclicos
Orden:	Escrophulariales
Familia:	Labiatae
Nombre científico:	<i>Thymus vulgaris</i> L .
Nombre común:	Tomillo

2.14.1. Descripción botánica del Tomillo.

Subarbusto de 10-25 cm de altura, con los tallos cespitosos, más o menos erguidos. Hojas sésiles, lineares o aovadas, 5-10 mm de largo, glandulosas. Flores blanquecinas pequeñas, dispuestas en glomérulos espigados, protegidas por hojas o brácteas florales más anchas que las caulinares. Cuenca del mediterráneo y se multiplica por división de matas. Es muy cultivada para condimento.

2.14.2. Componentes.

La composición química de las ramas contiene flavonoides, derivados del apigenol y del luteolol; ácidos fenólicos, caféico, rosmarínico, clorogénico; ácidos triterpénicos, ursólico y oleanoico; saponinas; contiene también elementos minerales. El aceite esencial contiene carvacrol y timol (Lizcano, 2007).

2.15. LA COLA DE CABALLO.

Cuadro 5

Taxonomía de la Cola de caballo

Reino:	Vegetal.
Phylum:	Telemophytae.
División:	Tracheophyta
Subdiv.:	Pteridophyta
Clase:	Sphenopsida
Orden:	Equisetales
Familia:	Equisetaceae
Nombre científico:	<i>Equisetum</i> sp.
Nombre común:	Cola de caballo

2.15.1. Descripción botánica de la Cola de caballo.

Plantas palustres, medianas a grandes (hasta varios metros de alto). Rizomas negrovioletados, sin sílice ni carenas. Tallos epigeos erguidos cuando jóvenes adscumbentes mas adelante y cuando alcanzan grandes dimensiones, escandentes, apoyantes; cilíndricos, fistulosos, 5-15mm de diámetro, con un número variable de carenas, marcadas o no, ásperas o lisas; estomas hundidos, ubicados en 2-6 hileras. Vainas cilíndricas ensanchadas en su boca, urceoladas o ceñidas al tallo. Ramas laterales en verticilos nutridos. Estróbilos cilíndricos a ovoides, sobre el eje principal, pero más frecuentemente sobre los extremos de la ramas laterales, sésiles,

apiculados, 10-15mm de largo, con 6-8 esporangios, o mayores (de hasta 25mm de largo) en este caso sobre tallos jóvenes.

Este género se encuentra ampliamente difundido en América tropical, desde el sur de México y Haití hasta Chile Uruguay y Argentina. En nuestro país crece al norte desde 150 a 2500m de altura, en lugares húmedos a periódicamente inundados, a orillas de los cursos de agua o en las cunetas de los caminos. Comúnmente esta planta se conoce con el nombre de “cola de caballo”. Por su rico contenido en sílice, a veces se usa pulir objetos de plata (Cabrera, 1977).

2.15.2. Componentes

- Ácidos: Ferulico, silícico, málico, cafeico, gálico, péctico, tánico.
- Campesterol.
- Flonoides: Equisetrina, isoquereitosido, galuteolina.
- Equisetonina.
- Alcaloides: Nicotina, palustrina, equispermina.
- Aminoácidos.
- Niacina.
- Fibra.
- (SL., 1999-2016).

CAPÍTULO III

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.LOCALIZACIÓN DEL ENSAYO.

La investigación se desarrollara en el departamento de Tarija, Provincia Cercado Zona el Tejar, ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y 15` de latitud sur y los meridianos 64° 21` y 65° 05` de longitud Oeste, con una altura promedio de 1850 m.s.n.m, específicamente en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la “Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales” de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho”.

3.2.MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1. Material Biológico.

El material vegetal que se utilizó para el presente trabajo de investigación fueron cepas de *Fusarium sp*, que se aislaron, purificaron e identificaron en el Laboratorio de Fitopatología de la U.A.J.M.S.

3.1.1. Material De Laboratorio.

- **Área de Preparación.**
 - Cajas Petri 48 unidades.
 - Balanza de precisión.
 - Potenciómetro.
 - Pipetas 10- 20 ml.
 - Erlenmeyer 12 unidades.
 - Batidor imantado.
 - Papas partidas.
 - Dextrosa (glucosa).
 - Agar.
 - Cloranfenicol 150 ml.
 - Agua destilada 600 ml.

- **Área de esterilización.**
 - Autoclave.
 - Estufa de esterilización para el material in vitro.
 - Alcohol al 70%.
 - Hipoclorito de sodio.
- **Área de siembra.**
 - Cámara de flujo laminar.
 - Mechero.
 - Pinzas.
 - Agujas.
 - Bisturís.
 - Tijeras.
 - Estereoscopio.
 - Microscopio.
 - Bisturí.
 - Agua destilada.
 - Cinta adhesiva.
 - Papel filtro.
- **Área de crecimiento.**
 - Incubadora.

3.2.METODOLOGÍA.

3.3.PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.

- En el caso del ajo se tomó la parte de los bulbos para realizar el extracto, hojas y tallos secos en el caso del tomillo, tabaco y cola de caballo.
- Después de haber hecho el peso correspondiente de 12, 50 gr. de cada uno de los elementos, se procede a triturar con la ayuda de un mortero manual.
- Se los depositó en frascos de vidrio con 250 ml. de agua destilada estéril. Se los agitó diariamente.
- Después de 3 días de reposo se procedió a filtrar los extractos, por medio de una gasa, esto se hizo para evitar la putrefacción.

Las indicaciones dicen que se deja reposar entre 5 y 15 días según la concentración que se requiera tener. En nuestro caso probamos a los 5 y 12 días, dándonos mejores resultados a los 12 días.

3.3.1. Recolección de Muestras.

Se recolectó muestras de campo en la zona del valle central de Tarija, según el análisis presuntivo hecho en el campo, tomando en cuenta los síntomas que presenta este hongo. Se tomó plantas con raíces, es decir plantas completas e infestadas, se colocó las muestras envueltas en papel e introducidas a una bolsa plástica para que no se deterioren al llevarla hasta el laboratorio.

3.3.2. Cámaras Húmedas.

Al tener ya las muestras en el laboratorio, se procedió a dar las condiciones favorables al hongo, mediante la introducción de las muestras en una cámara húmeda, la cual consiste en una bolsa plástica en la cual introducimos las muestras papel húmedo se procede a cerrar la bolsa y se deja 2-3 días.

3.3.3. Identificación.

3.3.3.1. Por observación directa.

Se hizo la identificación mediante claves que nos marcaron las estructuras de los micelios y esporas de los hongos.

En el análisis presuntivo se observó en el estereoscopio sus estructuras, una vez que se manifestó el micelio del hongo puesto en la cámara húmeda, se pudo reconocer el hongo *Fusarium sp.* en el estereoscopio de una muestra traída de campo, en la cual se ve que solo está presente el *Fusarium sp.*

3.4. MEDIOS DE CULTIVO.

3.4.1. Preparación.

Se preparó el medio siguiendo métodos estándares de laboratorio el medio Agar de Papa Dextrosa (APD), fue el que se utilizó como medio para el aislamiento de los cultivos puros.

3.4.2. Metodología.

1. Se peló las papas, se las partió en cuadritos de 1,5 cm., se las puso en un recipiente y se procedió a calentar en la estufa para que desprendan el almidón que contienen ya que este nos sirve para preparar el medio.
2. En otro recipiente se disolvió el agar, se lo calentó para facilitar que este se disuelva mejor.
3. Se colocó el caldo de papa a través de una manta de cielo o algodón, se mezcló luego el agar con el caldo de la papa, con la ayuda del imán se homogenizó, luego se agregó la dextrosa y el cloranfenicol batiendo para que estos se homogenicen.
4. Se dividió la sustancia en matraces de 250 ml. y se tapó los matraces con algodón.

3.5.INDUCCIÓN AL DESARROLLO MICELAR.

Una vez identificado el hongo se procedió a extraerlo mediante el alza de esporas o tejidos vegetales y colocándolos en cajas Petri con el medio de cultivo PDA repitiendo esto las veces que fueron necesarias hasta que se obtuvo el hongo puro.

3.5.1. Metodología.

1. Se lavó el material enfermo con agua potable pasándolo por papel filtro para secarlo externamente.
2. Se seleccionó el tejido vegetal afectado representativo procurando que los explantos sean de 0,3 a 0,5 cm de longitud cortados con un bisturí.
3. Ya en la cámara de flujo laminar se desinfecto los explantos con hipoclorito de sodio (lavandina) mezclando una parte de esta sustancia en cinco partes de agua destilada, para obtener la mezcla deseada, ya que la lavandina viene al 5-6%, es decir que normalmente se usa hipoclorito de sodio al 1-2%, se expuso los explantos durante 30 segundos en la mezcla.
4. Luego se procedió a sumergir los explantos en alcohol etílico al 70% durante 20 segundos, no es prudente usar alcohol al 95% por su flameabilidad.
5. Se enjuagó los explantos en tres vasos de agua destilada estéril y se secó en papel.
6. Se colocó 3 a 4 explantos alrededor de la caja Petri con PDA, luego se procedió a sellar la caja con cinta parafina, esto para evitar la contaminación.

7. Por último llevamos las cajas Petri a la incubadora, la cual tiene la función de mantener a los hongos a una temperatura constante de 20 a 25°C (Agrios, 2007).

3.5.2. Multiplicación De Las Cepas.

3.5.2.1.Cultivos Monosporicos.

Para establecer la pureza de un tipo de hongo es necesario partir de aislamientos monosporicos que garanticen la autenticidad y pureza de los mismos y de los datos que se consigan. Los aislamientos Monosporicos pueden ser por colonia o por punta de hifa.

3.5.3. Procedimiento.

3.5.3.1.Método de la Raya.

- Una vez que el PDA contenido en las cajas Petri se haya solidificado, tomamos un asa recta y una aguja, las cuales se esterilizaron a la llama de un mechero y se recogieron las esporas simplemente frotando la aguja con la estructura del hongo.
- Se procedió a abrir la caja Petri ya con el PDA solidificado y con la aguja se deslizó las esporas del hongo sobre el medio de cultivo.
- Se cerraron las cajas y aseguraron con cinta parafina.
- Todos los pasos anteriores se los realizó en la cámara de flujo laminar, para evitar la contaminación.
- Finalmente pasamos a llevar las cajas Petri a la incubadora, donde permanecieron cuatro días para que el hongo empiece a desarrollar.

3.6.SIEMBRA CON LOS BIOENSAYOS.

1. Se envolvió el material como las cajas Petri, pinzas, sacabocado, porta bisturí con papel periódico, se procedió a meter al horno a una temperatura de 150°C durante dos horas, las cajas Petri se envolvieron en dos según metodología.
2. Se preparó (600 ml.) de PDA distribuidos en trece matraces, en cada matraz conteniendo (45 ml.), se rotuló para no llegar a confundir las dosis.
3. En el tratamiento del testigo(TES) no se incluyó ninguna dosis de los extractos vegetales, (Ajo, Tomillo, Tabaco, Cola de caballo) en el tratamiento 1 dosis 1 al 1% (T1D1) se incluyó en el medio 0,45 ml del extracto del ajo con la ayuda de una pipeta de 2ml de capacidad, en el tratamiento 2 dosis 2 al 3% (T2D2) se

incluye 1,35 ml de extracto de ajo con la ayuda de una pipeta de 5 ml de capacidad, en el tratamiento 3 dosis 3 al 5% (T3D3) se incluye 2,25 ml de extracto de ajo con la ayuda de una pipeta de 5 ml de capacidad. El mismo procedimiento se realizó para el extracto dosis (T4D1, T5D2, T6D3, T7D1, T8D2, T9D3, T10D1, T11D2, T13D3).

4. Se implantó en los medios de cultivos PDA (Agar de Papa Dextrosa), previamente distribuidos en las cajas Petri más la dosis respectivas de los extractos a evaluar, explantos de 0,3 cm. de diámetro, con la ayuda de un sacabocado se los colocó en las cajas Petri de las cepas aisladas del *Fusarium sp.*
5. Procedimos a sellar las cajas Petri con cinta parafina y a rotular con las siglas correspondientes, tratamiento, dosis, extracto más la fecha.
6. Una vez realizados todos los procedimientos pasamos a llevar las cajas Petri a la incubadora, dejando que se mantenga a una temperatura de 22°C.
7. Haciendo las mediciones correspondientes del diámetro del crecimiento micelar a los 5, 7 y 14 días después de la siembra.

3.7. Aplicación de los extractos.

La aplicación de los cuatro extractos vegetales, se la realizó conjuntamente con la preparación de los medios de cultivo. Las dosis a usar están en base a concentraciones preestablecidas en los ensayos materializados. Las dosis establecidas son: 1% (0,45 ml.), 3% (1,35 ml.), 5% (2,25 ml.).

3.7.1. Siembra de bioensayos en plantas de tomate.

Se realizó pruebas de control con las dosis empleadas de los extractos vegetales en un bioensayo, para esto se utilizó cuatro plantas por extracto, este trabajo se lo llevó a cabo en un domicilio particular.

En el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*) de la familia de las solanáceas, se enfermó las plantas por medio del método de infección del sustrato, tomando el sustrato ya contaminado con el hongo y procediendo a incorporarlo en macetas, para después hacer el trasplante de las plantas de tomate.

Para obtener los resultados se utilizó la fórmula de Ogawa (1986), siendo expresada en porcentaje a los 7 días se muestreo todos los bioensayos.

➤ **Porcentaje de Incidencia.**

Incidencia (I)= (número de individuos controlados/total de individuos)*100

➤ **Porcentaje de inhibición.**

Porcentaje de inhibición (P)= (número de individuos controlados/total de individuos)*100

Con estas fórmulas se midió el porcentaje de incidencia y el porcentaje de inhibición a los 7 días.

3.8.ANÁLISIS DE RESULTADOS.

3.8.1. Diseño Experimental.

Los datos obtenidos se evaluaron a través de un análisis estadístico y pruebas de comparación de medias significativas, se utilizó el diseño experimental completamente al azar, con un arreglo bifactorial (4 x 2) de acuerdo al siguiente orden:

- **Factor A:**

Los cuatro extractos vegetales (ajo, tomillo, tabaco y cola de caballo).

- **Factor B:**

Las dosis que se agregaron a los medios de cultivo al 1% con 0,45 ml., al 3% con 1,35 ml. y al 5% con 2,25 ml.

Nº de tratamientos: 12 (12 tratamientos más 4 testigos).

Unidades experimentales: 96.

Nº de repeticiones: 3.

3.8.2. Variables a evaluar

- El diámetro del crecimiento del micelio.
- El porcentaje de inhibición de crecimiento.
- Eficiencia de los extractos en la inhibición del crecimiento del hongo (*Fusarium sp*).

$$\text{Inhibición micelar} = \frac{\text{Crecimiento del testigo} - \text{Crecimiento total}}{\text{Crecimiento del testigo}} * 100$$

Cuadro 6

Diagrama Del Diseño

Hongo

Extracto	Dosis	Sigla
Testigo	D0	T1D0TES
Extracto De Ajo	D1	T2D1AJO
	D2	T3D2AJO
	D3	T4D3AJO
Testigo	D0	T5D0TES
Extracto De Tomillo	D1	T6D1TOM
	D2	T7D2TOM
	D3	T8D3TOM
Testigo	D0	T9D0TES
Extracto De Tabaco	D1	T10D1TAB
	D2	T11D2TAB
	D3	T12D3TAB
Testigo	D0	T13D0TES
Extracto De Cola De Caballo	D1	T14D1CCA
	D2	T15D2CCA
	D3	T16D3CCA

Fusarium

Tratamientos:

T1 (3 cajas Petri)

T2 (3 cajas Petri)

T3 (3 cajas Petri)

T4 (3 cajas Petri)

T5 (3 cajas Petri)

T6 (3 cajas Petri)

T7 (3 cajas Petri)

T8 (3 cajas Petri)

T9 (3 cajas Petri)

T10 (3 cajas Petri)

T11 (3 cajas Petri)

T12 (3 cajas Petri)

T13 (3 cajas petri9)

T14 (3 cajas Petri)

T15 (3 cajas Petri)

T16 (3 cajas Petri)

CAPÍTULO IV

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1.RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.

4.1.1. Porcentaje de inhibición.

Se tomó los datos a los 5, 7, 14 días que son los más representativos para el hongo a estudiar, se hizo tres réplicas de cada uno de los extractos con su respectiva dosis.

4.1.2. Inhibición en el diámetro del crecimiento del hongo.

Cuadro 7
Ensayo 1 a los 5 días

<i>TRATAM./REP</i>	I	II	III	Σ	X
<i>T1 D0AJO</i>	2,06	2,08	1,8	5,94	1,98
<i>T2 D1 AJO</i>	1,63	1,4	1,45	4,48	1,49
<i>T3 D2 AJO</i>	1,17	1,29	0,95	3,41	1,14
<i>T4 D3 AJO</i>	1,36	1,24	1,51	4,11	1,37
<i>T5 D0 TOM</i>	2,06	2,08	1,8	5,94	1,98
<i>T6 D1 TOM</i>	1,3	1,39	1,22	3,91	1,30
<i>T7 D2 TOM</i>	1,47	0,87	0,97	3,31	1,10
<i>T8 D3 TOM</i>	1,34	1,39	1,29	4,02	1,34
<i>T9 D0 TAB</i>	2,06	2,08	1,8	5,94	1,98
<i>T10 D1 TAB</i>	1,72	1,6	1,07	4,39	1,46
<i>T11 D2 TAB</i>	2,05	1,96	1,41	5,42	1,81
<i>T12 D3 TAB</i>	1,89	1,67	1,41	4,97	1,66
<i>T13 D0 CCA</i>	2,06	2,08	1,8	5,94	1,98
<i>T14 D1 CCA</i>	2,05	1,7	1,54	5,29	1,76
<i>T15 D2 CCA</i>	1,74	1,77	1,65	5,16	1,72
<i>T16 D3 CCA</i>	1,58	1,72	1,18	4,48	1,49
Σ <i>Blog.</i>	27,54	26,32	22,85	76,71	

Según los datos obtenidos podemos observar que la media máxima obtenida en el testigo del fusarium es de 1,98 cm. de diámetro.

En el caso de los tratamientos se puede ver que la media máxima del crecimiento micelar se dio en el tratamiento (T15D2CCA) con un dato de 1,06 cm. de diámetro. Con una mínima de 0,62 cm. de diámetro en el tratamiento (T7D2TOM).

Cuadro 8

Ensayo 1 Tabla de ANOVA a los 5 días

<i>Fv</i>	gl	SC	CM	Fc	Ft 5%	Ft 1%	DF
TOTAL	47	5,55					
REPETICIONES	2	0,72	0,36	15,12	3,32	5,39	**
TRATAMIENTOS	15	4,11	0,27	11,46	2,01	2,70	**
ERROR	30	0,72	0,02				
Fact.Extractos	3	0,90	0,30	12,51	2,92	4,51	**
Fact.dosis	3	2,36	0,79	32,89	2,92	4,51	**
Extracto/Dosis	6	0,86	0,14	5,96	2,42	3,47	**

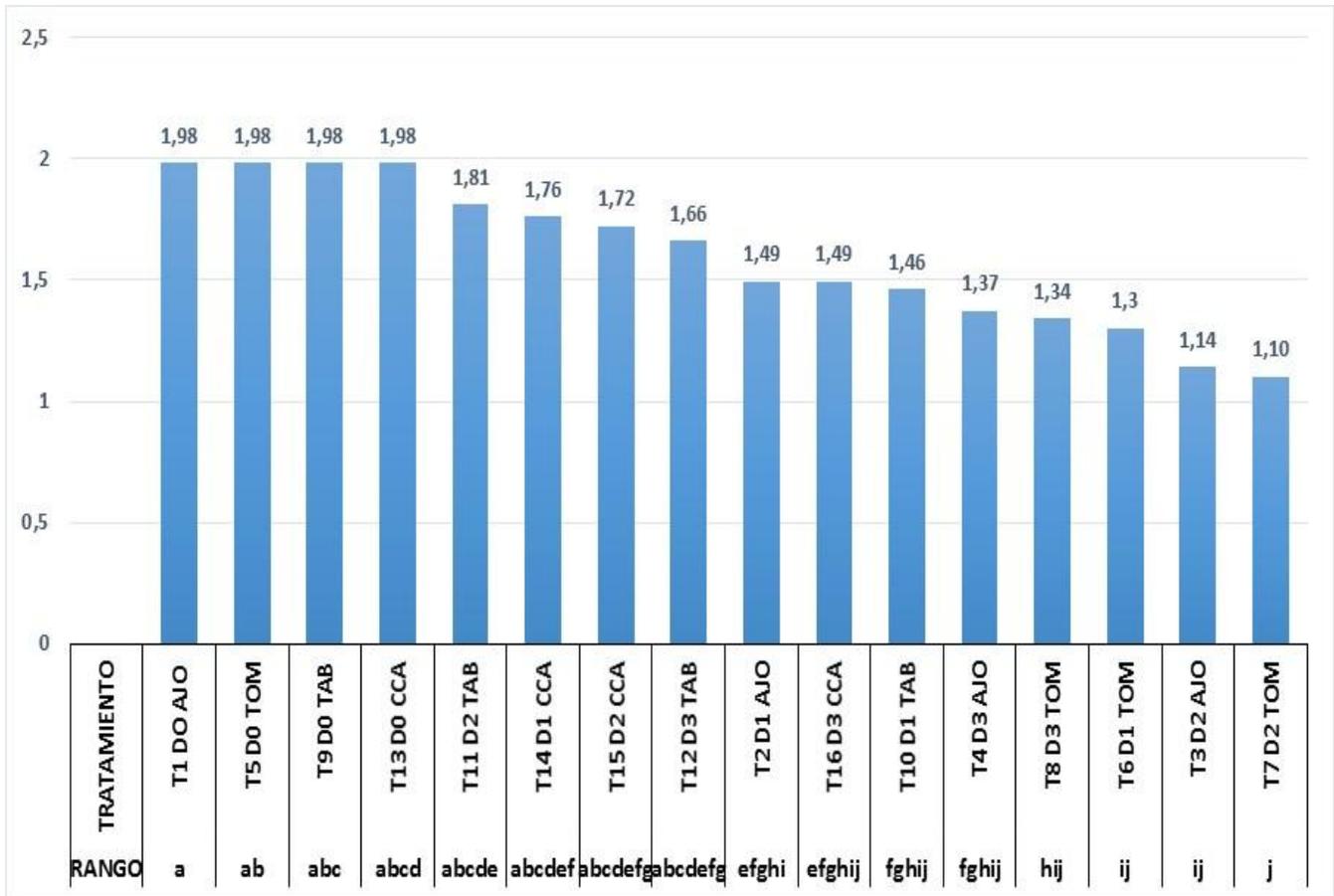
Según el análisis estadístico vemos que en el factor dosis existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $32,89 F_c > 2,92 F_t$, y al 1% con una diferencia significativa con un dato de $32,89 F_c > 4,51 F_t$, siendo este resultado significativamente diferente en el factor dosis. En el factor extracto se puede observar que hay una diferencia significativa con un dato de $12,51 F_c > 2,92 F_t$ al 5%, como también así al 1% con un dato de $12,51 F_c > 4,51 F_t$, siendo este resultado también significativamente diferente.

En los tratamientos se obtuvo una diferencia significativa tanto para el 5% y el 1% con un dato de $11,46 F_c > 2,01 F_t$ y $11,46 F_c > 2,70 F_t$, siendo significativamente diferentes.

En las repeticiones también se obtuvo una diferencia significativa tanto para el 5%, como para el 1%, con un dato de $15,12 F_c > 3,32 F_t$, $15,12 F_c > 5,39$, habiendo una diferencia significativa en los resultados. En la relación extracto dosis nos muestra que $5,96 F_c > 2,42 F_t$ y $5,96 F_c > 3,47 F_c$, existiendo en ambos casos una diferencia significativa en los resultados.

Cuadro 9

Ensayo 1 Prueba de DUNCAN Para el diámetro del micelio 5 días

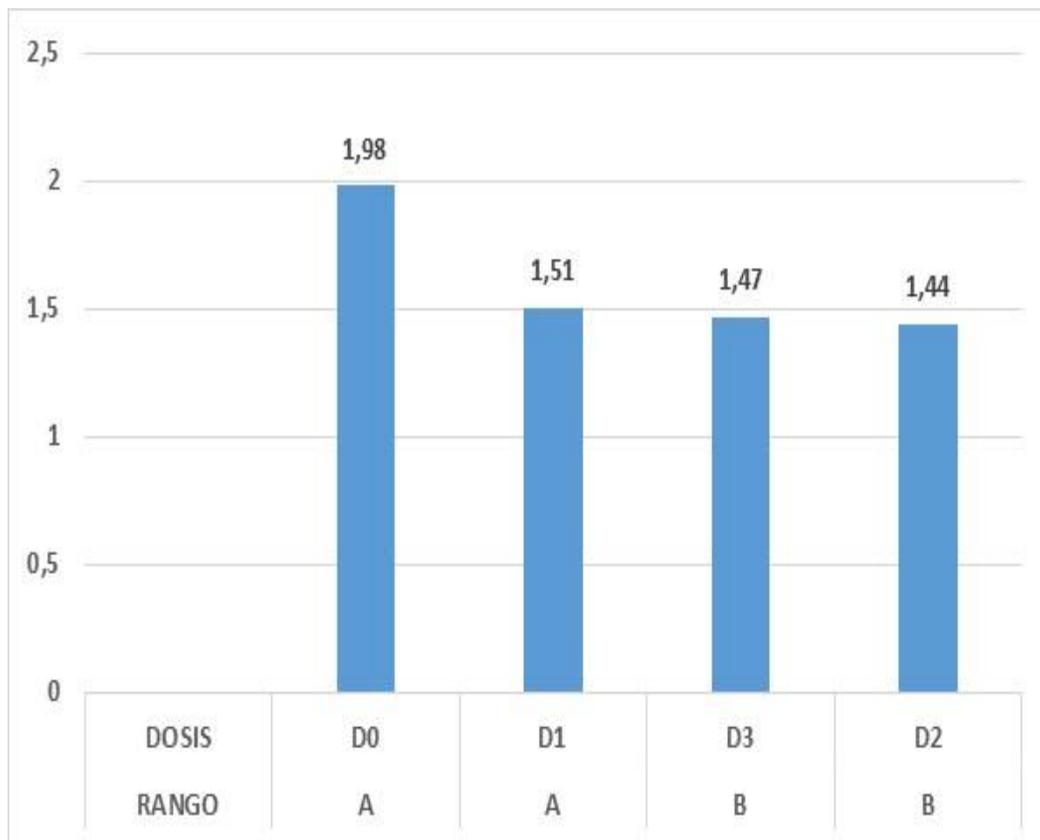


Se puede apreciar en la prueba de duncan que los tratamientos del testigo (T1D0AJO), (T5D0TOM), (T9D0TAB), (T13D0CCA), tienen diferencias significativas con los demás tratamientos con 1,98 cm de diámetro de crecimiento.

En los tratamientos del tabaco dosis 2 con 1,81 ml. (T11D2TAB) hasta el tratamiento del tomillo dosis 1 con 0,45 ml. (T6D1TOM), tienen una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos, siendo así que los tratamientos que mayor diámetro tuvieron fueron los del rango a, ab, abc, abcd, y como así también podemos decir que el mejor tratamiento fue el tratamiento del tomillo con la dosis al 2% con un valor de 1,35 ml. (T7D2TOM) ubicado en el rango (j).

Cuadro 10

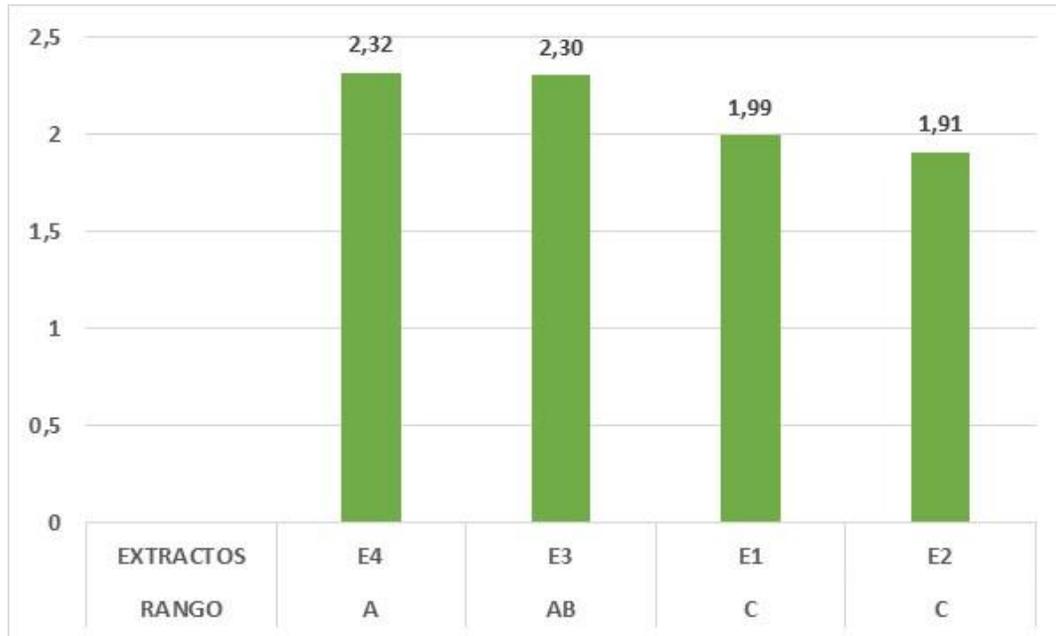
Prueba De Duncan Para El Diámetro Del Micelio Factor Dosis



La prueba de duncan nos muestra que el factor dosis con mayor crecimiento fue el del testigo (D0) del rango A, también podemos apreciar el crecimiento mínimo que se da en la dosis (D2) con 1,35 ml. seguida por la D3 con 2,25 ml. El factor dosis nos indica que no existe una diferencia significativa entre las dosis (D1, D2, D3), de los distintos extractos vegetales.

Cuadro 11

Prueba DE Duncan Para El Diámetro Del Micelio Factor Extracto



Leyenda E1 = extracto del ajo E2 = extracto del tomillo E3 = extracto del tabaco E4 = extracto de cola de caballo.

Podemos distinguir que en la prueba de duncan para el factor dosis, los extractos que mayor crecimiento obtuvieron fueron los del rango (A), (AB), con datos de 2,32, 2,30 cm. de diámetro.

El extracto que mayor influencia tuvo sobre el crecimiento micelar del el hongo en este caso fue el extracto dos (E2), con un valor de 1,91 cm. seguido por el extracto uno E1 con un dato de 1,99 cm.

Se obtuvo resultados positivos de nuestros extractos vegetales para el control del crecimiento micelar del hongo, como explica (Lizcano M, 2007), los extractos vegetales se comportan mucho mejor en el séptimo día de crecimiento del fitopatógeno, con la dosis más alta.

Cuadro 12**Ensayo 1 Crecimiento micelar a los 7 días**

TRATAM./REP	I	II	III	Σ	X
T1 D0A JO	2,88	2,88	2,47	8,23	2,74
T2 D1 AJO	2,25	2,25	2,25	6,75	2,25
T3 D2 AJO	1,88	2,09	1,78	5,75	1,92
T4 D3 AJO	2,13	1,83	2,33	6,29	3,15
T5 D0 TOM	2,88	2,88	2,47	8,23	2,74
T6 D1 TOM	1,94	2,14	2,14	6,22	2,07
T7 D2 TOM	2,18	1,55	1,82	5,55	1,85
T8 D3 TOM	2,11	2,12	1,88	6,11	2,04
T9 D0 TAB	2,88	2,88	2,47	8,23	2,74
T10 D1 TAB	2,68	2,46	1,88	7,02	2,34
T11 D2 TAB	2,35	2,53	2,45	7,33	2,44
T12 D3 TAB	2,65	2,35	2,35	7,35	2,45
T13 D0 CCA	2,88	2,88	2,47	8,23	2,74
T14 D1 CCA	2,8	2,78	2,41	7,99	2,66
T15 D2 CCA	2,53	2,52	2,44	7,49	2,50
T16 D3 CCA	2,42	2,45	1,99	6,86	2,29
ΣBlog.	39,44	38,59	35,60	113,63	

De acuerdo a los datos obtenidos, se puede llegar a observar que la media máxima del testigo del *Fusarium sp.* es de 2,74 cm. de diámetro.

En el caso de los distintos tratamientos podemos ver que la media máxima se dio en el tratamiento 4 del ajo con dosis 3(T4 D3 AJO), con un diámetro de 3,15 cm., también se puede observar el mínimo crecimiento que se dio en el tratamiento del tomillo con 1,35 ml. (T7 D2 TOM) con un diámetro de 1,85 cm.

Cuadro 13

Ensayo 1 Tabla de ANOVA a los 7 días

<i>Fv</i>	gl	SC	CM	Fc	F_T 5%	F_T 1%	DF
<i>TOTAL</i>	47	5,87					
<i>REPETICIONES</i>	2	0,51	0,25	7,39	3,32	5,39	**
<i>TRATAMIENTOS</i>	15	4,33	0,29	8,40	2,01	2,70	**
<i>ERROR</i>	30	1,03	0,03				
<i>Fact.Extractos</i>	3	1,18	0,39	11,47	2,92	4,51	**
<i>Fact.dosis</i>	3	2,42	0,81	23,44	2,92	4,51	**
<i>Extracto/Dosis</i>	6	0,73	0,12	3,53	2,42	3,47	**

Según el análisis estadístico tenemos los siguientes resultados, en el factor dosis si existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $23,44 F_c > 2,92 F_t$, al 1% con un dato de $23,44 F_c > 4,51 F_t$.

Viendo nuestros datos obtenidos, podemos observar que en el factor extracto hay una diferencia significativa tanto como para el 5% con un dato $11,47 F_c > 2,92 F_t$ como así también para el 1% con un dato de $11,47 F_c > 4,51 F_t$. Siendo los resultados significativamente diferentes.

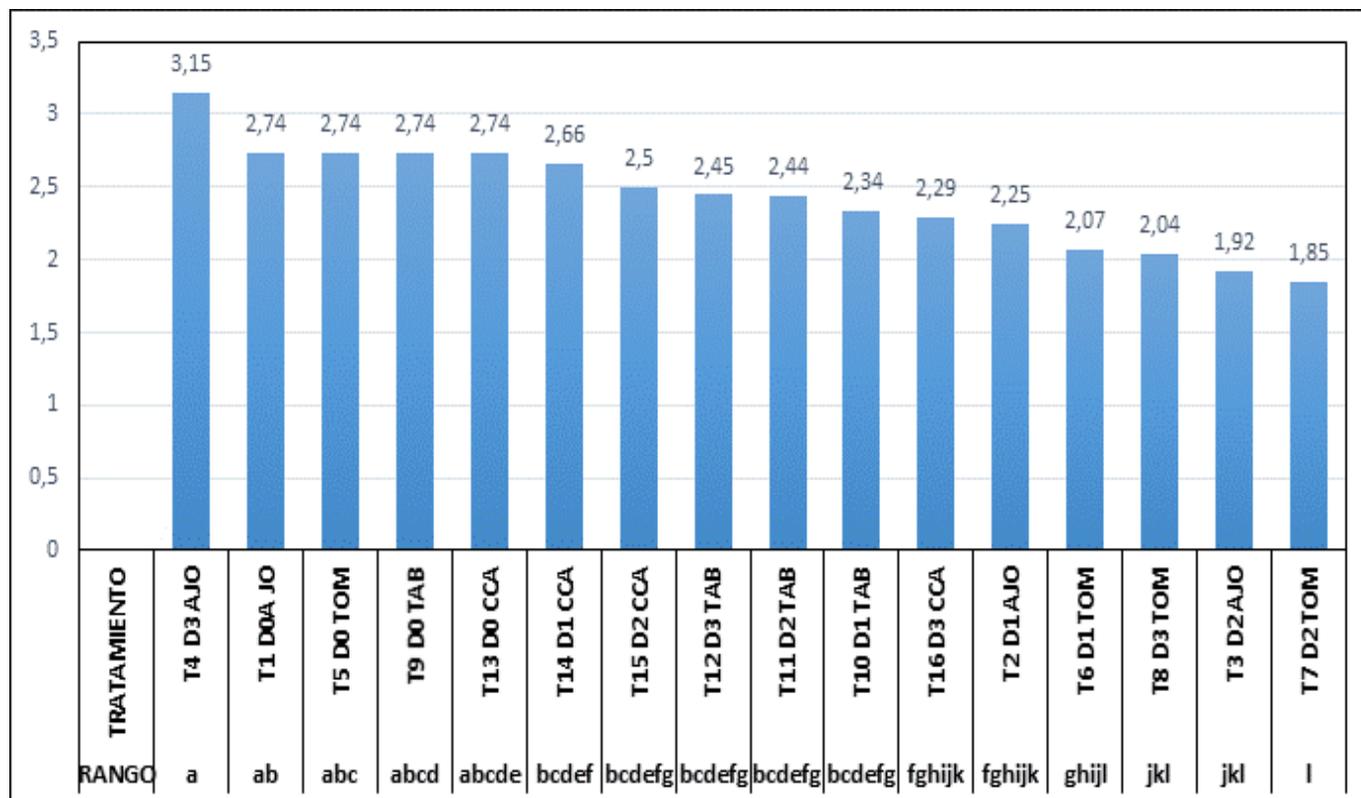
También se puede observar que en los tratamientos, que si existe una diferencia significativa, tanto así para el 5% con un dato de $8,40 F_c > 2,01 F_t$ y para el 1% con un dato de $8,40 F_c > 2,70 F_t$, siendo significativamente diferentes los resultados.

En las repeticiones si existe diferencia significativa en el 5% con un dato de $7,39 F_c < 3,32 F_t$, y en el 1% con un dato de $7,39 F_c < 5,39 F_t$, no habiendo ninguna diferencia en los resultados.

En el caso de la relación extracto dosis podemos ver que $3,53 F_c > 2,42$ hay una diferencia significativa al 5%, también en $3,53 F_c > 3,47 F_t$ al 1% existiendo diferencias significativas en los resultados.

Cuadro 14

Ensayo 1 prueba de DUNCAN para el diámetro del micelio 7 días



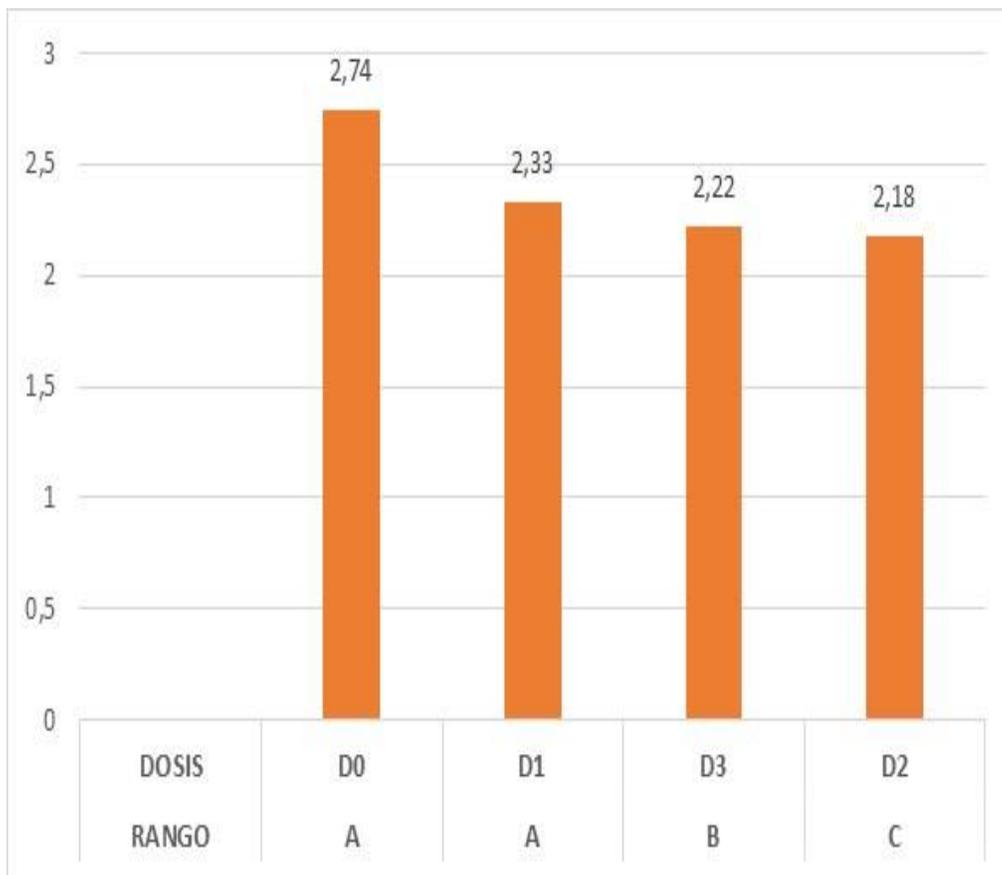
Se puede observar que en la prueba, que en el tratamiento 4 del ajo con la dosis 3 con 2,25ml (T4D3AJO) tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos con un dato de crecimiento micelar de 3,15 cm., siendo este mismo el que obtuvo mayor crecimiento con respecto a los testigos.

Podemos decir que el mejor tratamiento es el del tomillo con la dosis dos al 3% con un dato de 1,85 cm, logrando el menor crecimiento micelar a los 7 días después de la siembra en el medio de cultivo.

También podemos ver que en los tratamientos del testigo (T1D0AJO), (T5DOTOM), (T9D0TAB), (T13DOCCA) teniendo una diferencia significativa con el resto de los tratamientos. Del rango (bcdf) hasta el rango (jkl), también podemos ver que no tuvieron un crecimiento pronunciado.

Cuadro 15

Prueba De Duncan Para El Diámetro Del Micelio Factor Dosis

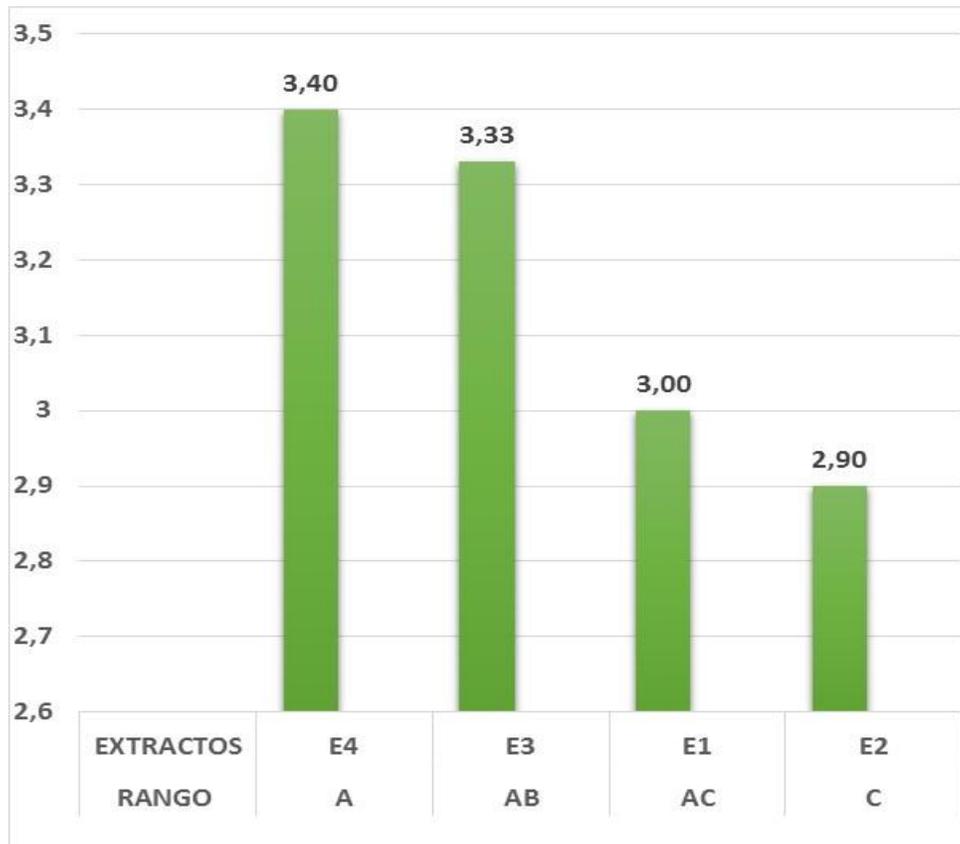


En el factor dosis nos indica que el mayor crecimiento se da en la dosis del testigo (D0) con el rango (A) siendo diferentemente significativo en relación a las demás dosis, así mismo podemos observar que la dosis mínima se dio en el rango (C) con un valor de 2,18 cm. Siendo esta la más óptima, junto con la D3 en el rango (B).

Los resultados de la prueba de duncan nos arrojan que no hay una diferencia significativa entre las dosis (D1) con 0,45 ml., (D2) con 1,35 ml., (D3) con 2,25 ml., no habiendo significativamente diferencia entre estas tres dosis.

Cuadro16

Prueba De Duncan Para El Diámetro Del Micelio Factor Extracto



Para el factor extractos, los resultados de la gráfica nos muestran que, el extracto que más llegó a controlar el crecimiento micelar del hongo fusarium fue el extracto del tomillo (E2) en el rango B con un dato de 2,90 cm., siendo así este el mejor extracto, seguido por extracto del ajo.

El extracto (E3) podemos evidenciar que es el de mayor crecimiento teniendo unas diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Se puede ver que en el (E3) y en el (E2) no hay diferencias significativas.

Se obtuvo buenos resultados con nuestros extractos vegetales, esto debido al efecto inhibitor de sus metabolitos secundarios que contienen, así como indica en su proyecto de grado (Moreno, 2011), el cual dice que los extractos vegetales tienen un muy buen resultado en el efecto inhibitor del crecimiento de este hongo *Fusarium sp.*, con las dosis más altas de los extractos a diferencia de otros hongos.

Cuadro 17

Ensayo 1 Crecimiento Micelar a los 14 días

TRATAM./REP	I	II	III	Σ	X
T1 D0A JO	3,95	4,68	4,68	13,31	4,44
T2 D1 AJO	3,71	3,75	3,53	10,99	3,66
T3 D2 AJO	3,39	3,91	3,9	11,20	3,73
T4 D3 AJO	3,65	3,13	3,85	10,63	3,54
T5 D0 TOM	3,95	4,68	4,68	13,31	4,44
T6 D1 TOM	3,25	3,4	3,48	10,13	3,38
T7 D2 TOM	3,55	2,47	2,88	8,90	2,97
T8 D3 TOM	3,81	3,47	3,7	10,98	3,66
T9 D0 TAB	3,95	4,68	4,68	13,31	4,44
T10 D1 TAB	3,81	4,42	3,72	11,95	3,98
T11 D2 TAB	3,85	4,68	4,67	13,20	4,40
T12 D3 TAB	3,9	4,37	4,55	12,82	4,27
T13 D0 CCA	3,95	4,68	4,68	13,31	4,44
T14 D1 CCA	3,9	4,59	3,93	12,42	4,14
T15 D2 CCA	3,93	4,25	4,2	12,38	4,13
T16 D3 CCA	3,91	4,15	3,85	11,91	3,97
ΣBlog.	60,46	65,31	64,98	190,75	

En los resultados obtenidos en la medición a los 14 días podemos observar un incremento en el diámetro micelar obteniéndose una media máxima en el testigo con un dato de 4,44 cm. de diámetro.

En el caso de los extractos se puede observar que la media máxima fue en el tratamiento 11 del tabaco con la dosis 2 (T11D2TAB) con un dato diametral de 4,40 cm., y una mínima en el crecimiento micelar en el tratamiento 7 del tomillo (T7D2TOM) con un dato diametral de 2,97 cm., siendo el mejor tratamiento el extracto del tomillo con la aplicación de la dosis 2 al 3% con un contenido de 2,25 ml.

Cuadro 18

Ensayo 1 Cuadro De ANOVA A Los 14 Días

<i>Fv</i>	Gl	SC	CM	Fc	F_T 5%	F_T 1%	DF
TOTAL	47	12,93					
REPETICIONES	2	0,92	0,46	4,52	3,32	5,39	*
TRATAMIENTOS	15	8,96	0,60	5,88	2,01	2,79	**
ERROR	30	3,05	0,10				
Fact.Extractos	3	3,32	1,11	10,89	2,92	4,51	**
Fact.dosis	3	3,46	1,15	11,35	2,92	4,51	**
Extracto/Dosis	6	2,19	0,36	3,58	2,42	3,47	**

Según los datos obtenidos podemos ver que en el factor dosis, se encontraron diferencias significativas al 5% con un dato de 11,35 $F_c > 2,92 F_t$ y al 1% con un dato de 11,35 $F_c > 4,51 F_t$, por lo tanto se encontraron diferencias significativas en los resultados.

En el factor extractos podemos observar que si existen diferencias significativas al 5% con un dato de 10,89 $F_c > 2,92 F_t$ y al 1% con un dato de 10,89 $F_c > 4,51 F_t$, habiéndose confirmado las diferencias significativas.

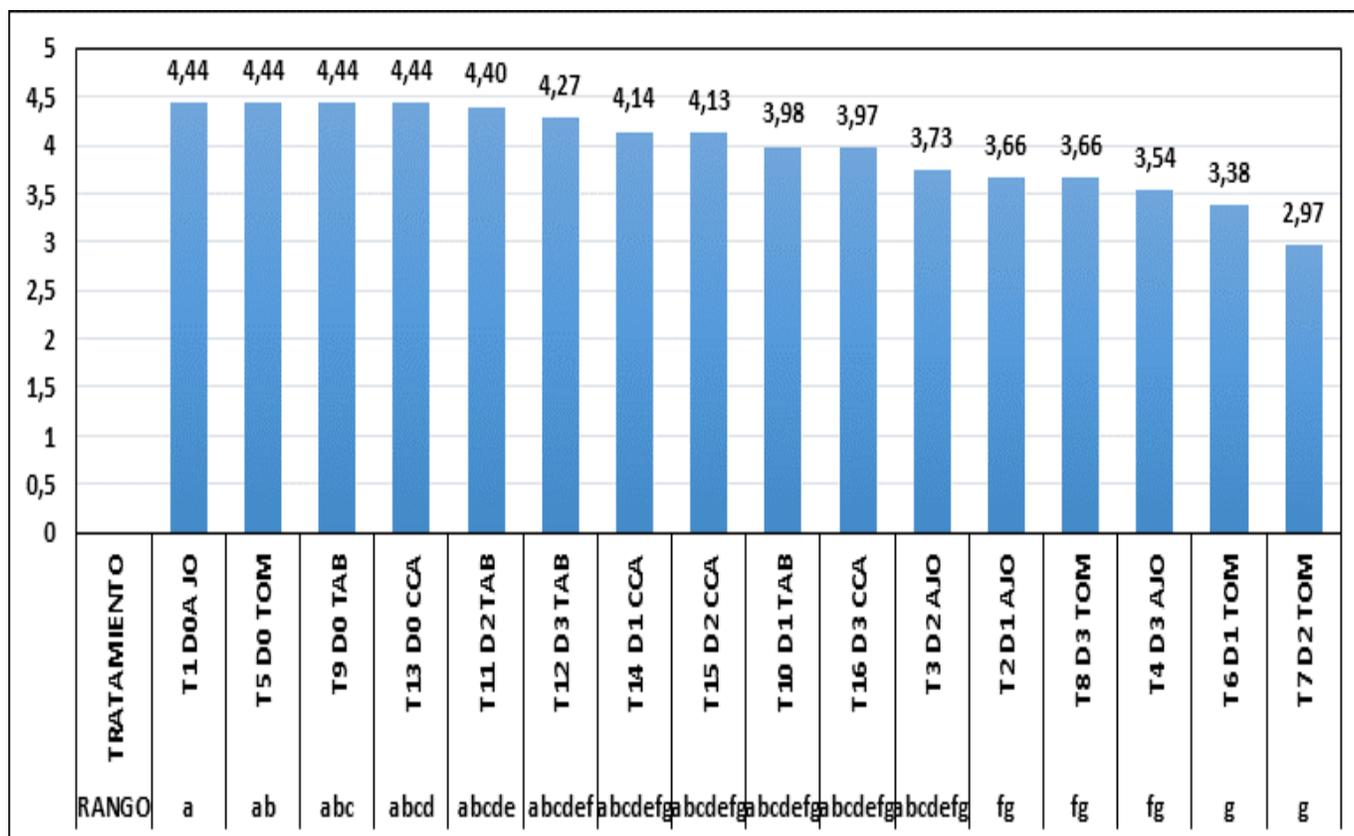
En los tratamientos, se obtuvo diferencias significativas al 5% con un dato de 5,88 $F_c > 2,01 F_t$, al 1% se encontró también una diferencia significativa con un dato de 5,88 $F_c > 2,79 F_t$.

En los datos obtenidos en las repeticiones solo hubo diferencias significativas al 5% con dato del 4,52 $F_c > 3,32 F_t$, al 1% con un dato de 4,52 $F_c < 5,39 F_t$, no existiendo diferencia alguna en este dato.

Para la relación extracto dosis según la tabla de anova podemos ver que hay una diferencias significativas al 5% con 3,58 $F_c > 2,42 F_t$ y al 1% también se encontró diferencias significativas con el dato de 3,58 $F_c > 3,47 F_t$, existiendo significativamente diferencias en ambos datos.

Cuadro 19

Ensayo 2 Prueba De DUNCAN Para El Diámetro Del Micelio 14 Días



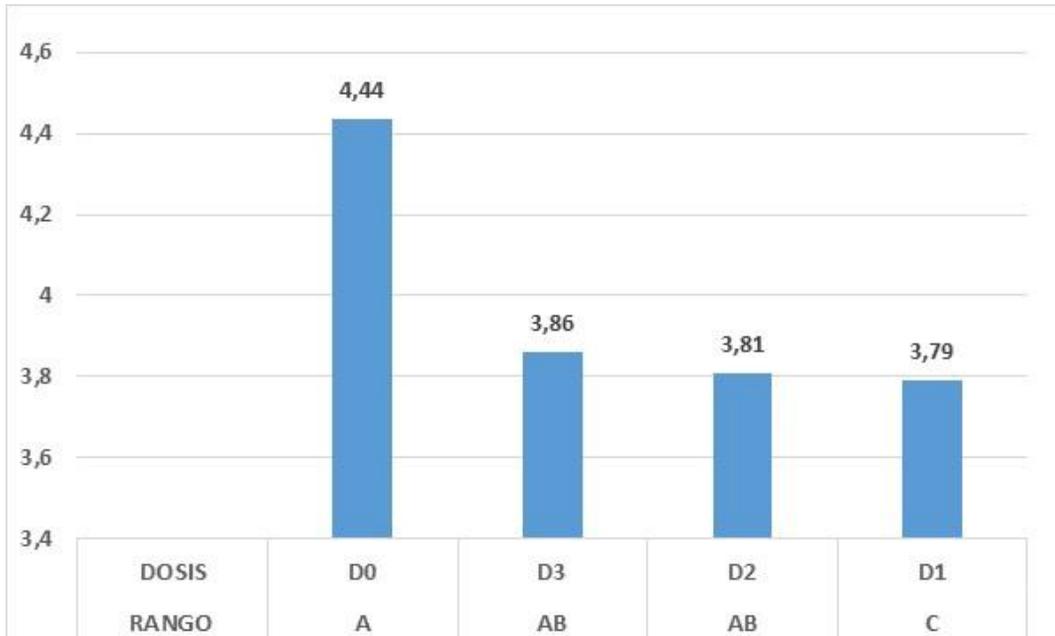
Como se puede evidenciar en la gráfica de la prueba de duncan en los tratamientos (T3D2AJO), (T2D1AJO), (T8D3TOM), (T4D3AJO), (T16D1TOM), (T7D2TOM), hay diferencias significativas con los demás tratamientos, por lo tanto se puede decir que el mejor tratamiento para el crecimiento micelar del hongo fusarium después de la siembra en los medios de cultivo es el (T7D2TOM) ubicado en el rango a con un dato de 2,97 cm.

Los tratamientos (T1D0AJO), (T5D0TOM), (T9D0TAB), (T13DOCCA), con 4,44 cm., tienen diferencias significativas con los demás tratamientos testigos que se encuentran en el rango (a, ab, abc, abcd), de esta manera podemos decir que fueron los tratamientos con mayor crecimiento y mejor desarrollo del hongo.

Habiendo sido de esta manera el mejor extracto/dosis el del tomillo al 3% con un contenido de extracto 2,25 ml.

Cuadro 20

Prueba De Duncan Para El Diámetro Del Micelio Factor Dosis



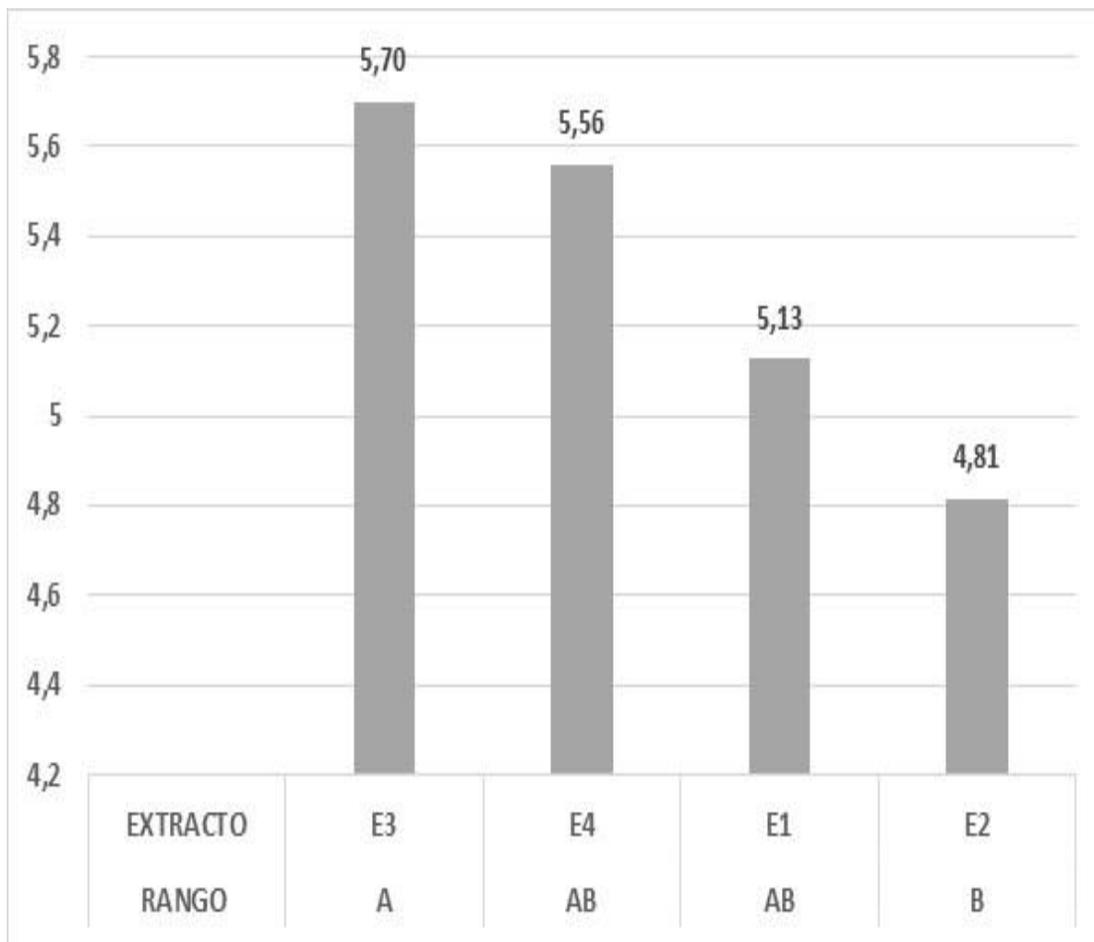
Los resultados de la prueba para el factor dosis, nos muestran que la dosis (D0) fue la que mayor crecimiento obtuvo a los 14 días de la medición después de la siembra, con dato de 4,44 cm., así mismo podemos ver que la de menor crecimiento en este caso es la dosis (D1) ubicada en el rango (C).

Con estos datos podemos decir que en las dosis (D3, D2, D1), con un contenido de 0,45 ml., 1,35 ml, y 2,25 ml., no hay una diferencia significativa con respecto a la (D1).

Ya en los estudios del segundo ensayo se llegó a obtener resultados más óptimos ante el primer ensayo, esto debido a la experiencia que uno llega a obtener durante el primer, efecto que tiene que ver con la asepsia y la limpieza en la manipulación del trabajo, como nos lo hace ver el trabajo de doctorado de (Londoño, 2010), en el cual enfatiza las condiciones de un laboratorio de alto nivel, teniendo en cuenta que el trabajo de aislamiento e identificación tiene un cierto grado de complejidad.

Cuadro 21

Prueba De Duncan Para El Diámetro Del Micelio Factor Extracto



Leyenda E1 = extracto de ajo E2 = extracto de tomillo E3 = extracto de tabaco E4 = extracto de cola de caballo.

Los resultados obtenidos para el factor extractos nos muestran que el extracto que tuvo mayor control ejercido sobre el hongo, fue el extracto del tomillo (E2) en el rango (B) con un dato de 4,81, seguido por el extracto del ajo ubicado en el rango (AB), estos datos son resultado de la medición diametral a los 14 días después de la siembra.

El extracto que más se disparó en crecimiento fue el extracto del tabaco, siendo significativamente diferente al resto. Así mismo podemos decir que el efecto inhibitor de los metabolitos secundarios del extracto del tomillo son los más efectivos para el control del crecimiento micelar del hongo *Fusarium sp.*

3.1.1. PORCENTAJE DE INHIBICION DEL HONGO.

Los datos que se tomaron para medir el porcentaje fueron a los 5, 7, 14 días.

Cuadro 22

Porcentaje De Inhibición a los 5 Días Ensayo 1

TRATAM./REP	I	II	III	Σ	X
T2 D1 AJO	20,87	32,69	19,44	73,01	24,34
T3 D2 AJO	43,20	37,98	47,22	128,41	42,80
T4 D3 AJO	33,98	40,38	16,11	90,48	30,16
T6 D1 TOM	36,89	33,17	32,22	102,29	34,10
T7 D2 TOM	28,64	58,17	46,11	132,92	44,31
T8 D3 TOM	34,95	33,17	28,33	96,46	32,15
T10 D1 TAB	16,50	23,08	40,56	80,14	26,71
T11 D2 TAB	0,49	5,77	21,67	27,92	9,31
T12 D3 TAB	8,50	19,71	21,67	49,87	16,62
T14 D1 CCA	0,49	18,27	14,44	33,20	11,07
T15 D2 CCA	15,53	14,90	8,33	38,77	12,92
T16 D3 CCA	23,30	17,31	34,44	75,05	25,02
ΣBlog.	263,35	334,62	330,56	928,52	

En el resultado del análisis estadístico del porcentaje de inhibición del hongo a los 5 días de la siembra en los medios de cultivo, nos muestra que obtuvimos el mayor porcentaje de inhibición en el tratamiento 7 del tomillo con la dosis 2 (T7 D2 TOM) con una media de 44,31%, siendo este el con mayor porcentaje de inhibición del hongo fusarium. Seguido por el tratamiento 3 del ajo con la dosis 3 (T3 D2 AJO) con un porcentaje de 42,80 de media.

Cuadro 23

Tabla De Anova Del Porcentaje De Inhibición A Los 5 Días

<i>Fv</i>	gl	SC	CM	F_c	F_T 5%	F_T 1%	DF
TOTAL	47	11228,09					
REPETICIONES	2	200,25	100,12	5,63	3,32	5,39	**
TRATAMIENTOS	15	10494,61	699,64	39,36	2,01	2,70	**
ERROR	30	533,23	17,77				
Fact.Extractos	3	2185,72	728,57	40,99	2,92	4,51	**
Fact.dosis	3	6052,49	2017,50	113,51	2,92	4,51	**
Extracto/Dosis	6	2256,40	376,07	21,16	2,42	3,47	**

Según los resultados del análisis podemos ver que en el factor dosis al 5% existen unas diferencias significativas de $113,51 F_c > 2,92 F_t$, como así también para el 1% con un dato de $113,51 F_c > 4,51 F_t$.

En el factor extractos se observó un dato de $40,99 F_c > 2,92 F_t$ al 5% donde existe diferencias significativas, también así al 1% podemos ver que hay diferencias significativas con un dato de $40,99 F_c > 4,51 F_t$, habiendo significativamente diferencias en ambos casos.

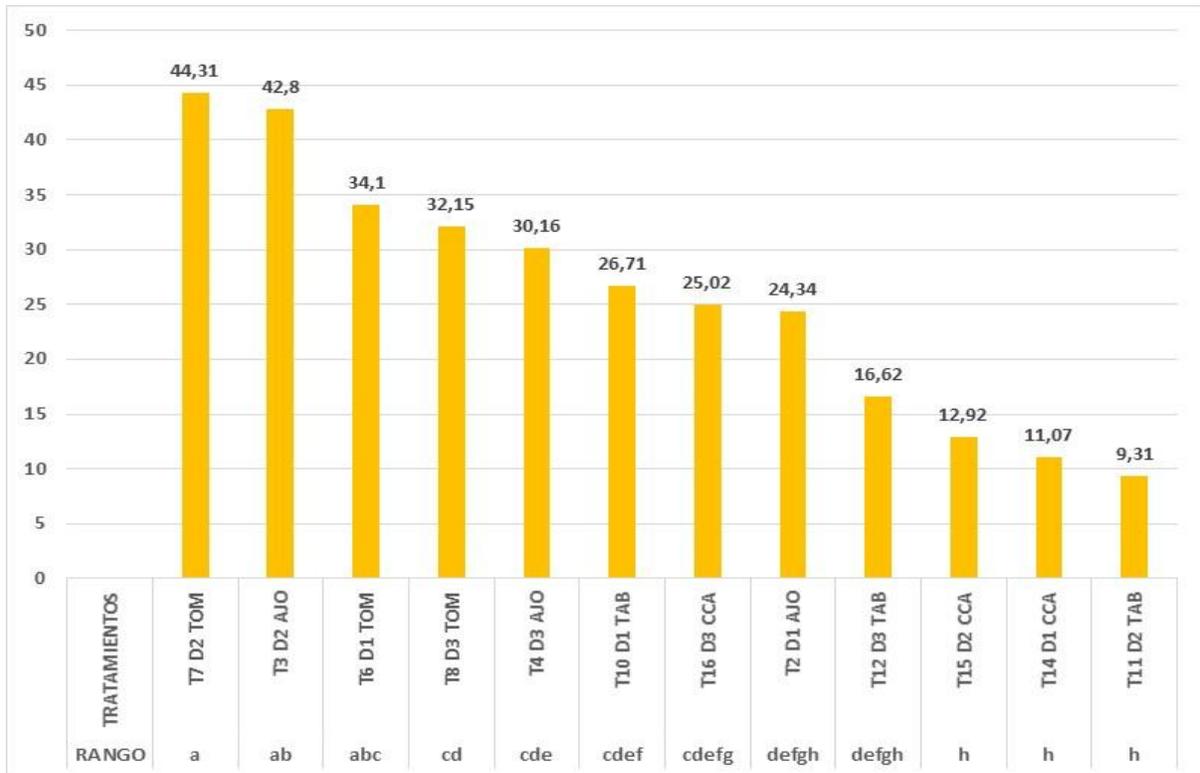
En los tratamientos se tiene un dato al 5% de $39,36 F_c > 2,01 F_t$ habiendo diferencias significativas y en el dato $39,36 F_c > 2,70 F_t$ al 1% existiendo diferencias significativas.

En las repeticiones como se puede observar al 5% hay una diferencias significativas en $5,63 F_c < 3,32 F_t$, como así también al 1% con $5,63 F_c < 5,39 F_t$ existieron diferencias significativas.

Para la relación extracto dosis al 5% con $21,16 F_c > 2,42 F_t$ hay diferencias significativas, al 1% con $21,16 F_c > 3,47 F_t$ habiendo diferencias significativas.

Cuadro 24

Prueba De DUNCAN Para el Porcentaje De Inhibición los 5 Días



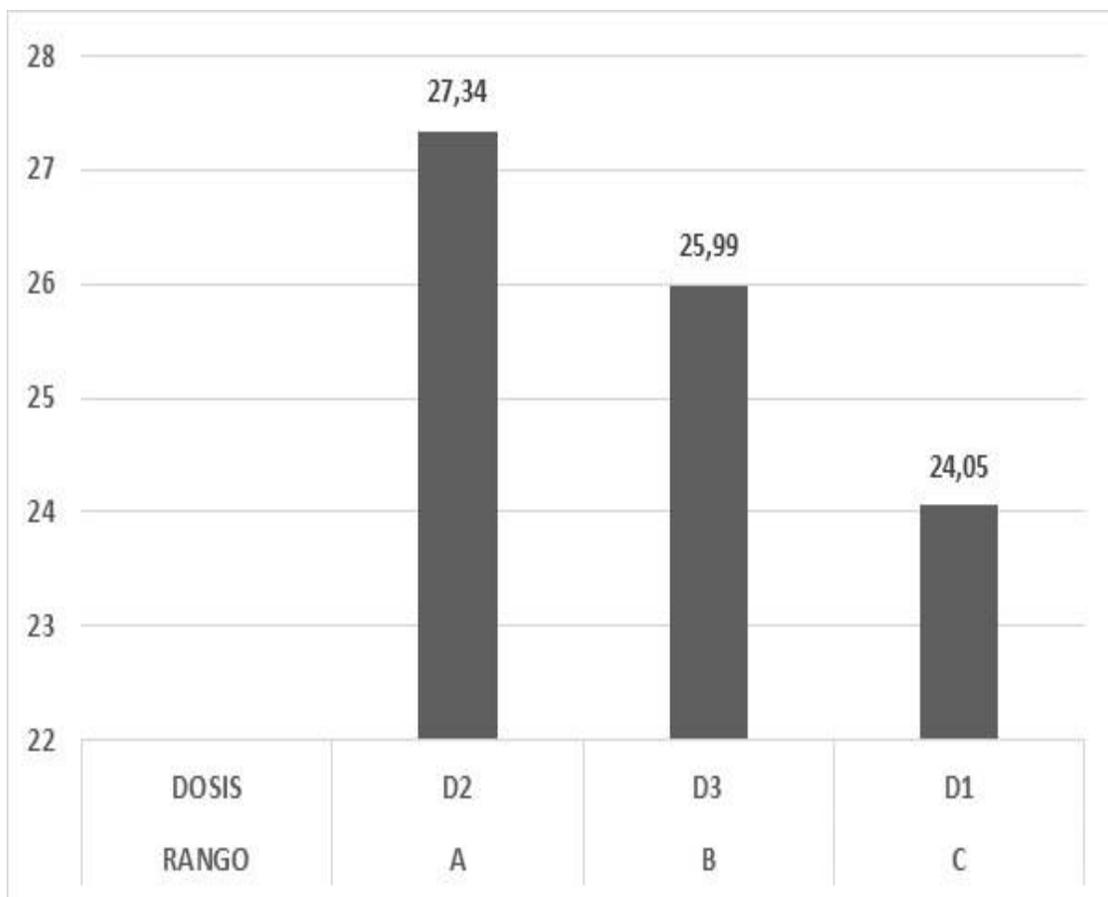
Podemos llegar a observar que el tratamiento 12 del tabaco dosis 3 (T12D3TAB), tratamiento 15 de la cola de caballo con la dosis 2 (T15 D2CCA), tratamiento 14 de cola de caballo dosis 1 (T14D1CCA), tratamiento 11 del tabaco dosis 2 (T11D2TAB) tienen una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, teniendo un rango de 16,62 % a 9,31 % de inhibición del micelio, siendo así estos los que menor porcentaje de inhibición obtuvieron a los 5 días después de la siembra.

Del tratamiento 7 del tomillo dosis 2 (T7D2TOM) al tratamiento 2 del ajo dosis 1 (T2D1AJO) del rango “a”, al rango (defgh), contaron con mayor porcentaje de inhibición, siendo estos tratamientos los mejores inhibidores del crecimiento del hongo, teniendo una diferencia significativa con el resto.

El mejor tratamiento fue el del tomillo con la dosis 2 al 3%, con un contenido de 2,25 ml. (T7D2TOM), por la buena actuación de los metabolitos secundarios que contiene.

Cuadro 25

Prueba De Duncan Del Porcentaje De Inhibición Factor Dosis

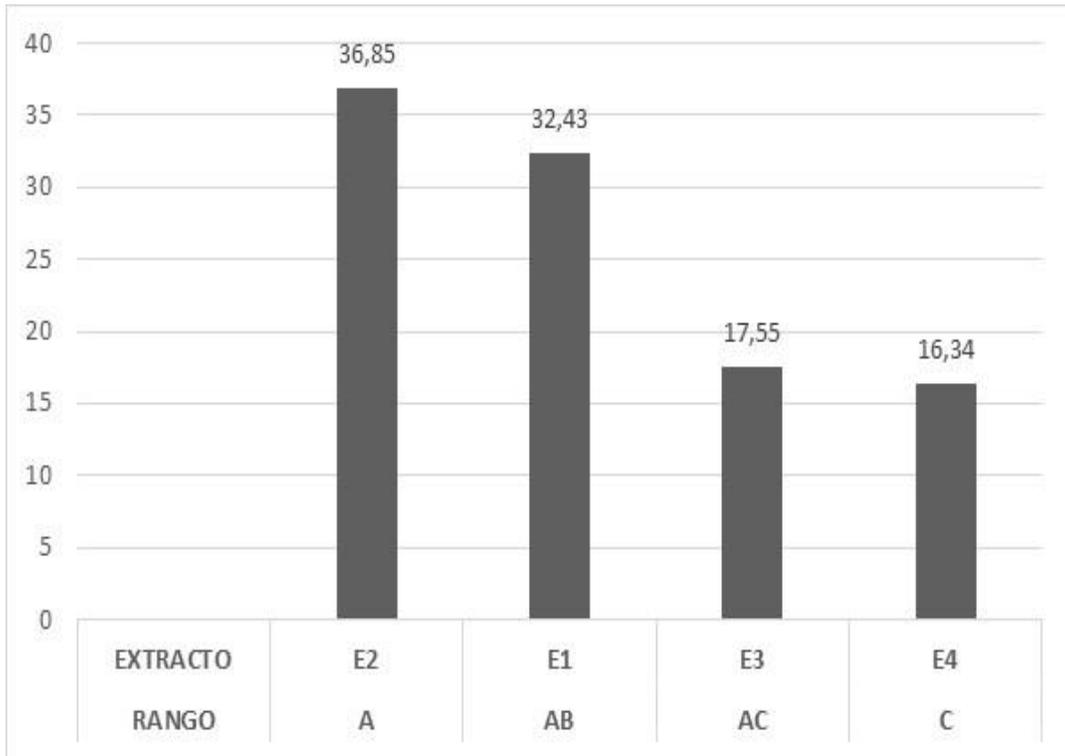


En el siguiente cuadro nos muestra que la mejor dosis es la 2 (D2) al 3% del extracto, con un porcentaje de 27,34% de inhibición, seguidamente se encuentra la dosis D3 al 5% del extracto, con un dato de 25,09% de inhibición, la de menor porcentaje de inhibición fue la dosis 1 (D1), a los 5 días después de la siembra del hongo en el medio de cultivo.

Se puede decir que hay una leve diferencia entre las tres dosis empleadas para la inhibición del hongo estudiado.

Cuadro 26

Prueba De Duncan Del Porcentaje De Inhibición Factor Extractos



En el factor extractos que más porcentaje de inhibición obtuvo fue el extracto del tomillo (E2) con un dato de 36,85%, siendo así este el mejor controlador de la inhibición del crecimiento del hongo, seguido por el extracto del ajo.

Para los extractos (E3) y (E4) se puede ver que no hay una diferencia significativa con respecto a las dos dosis anteriores.

Se obtuvo un buen efecto inhibitor de los extractos vegetales más propiamente en el del ajo, tomillo con sus respectivas dosis, pero siendo estos extractos mucho más efectivos si se hace una cromatografía, como se hizo en (Londoño, 2010), en el país no contamos con este método más detallado para poder realizar este análisis, por lo mismo solo se obtuvo las propiedades físicas, como en el estudio de la (U.N.D.N.A. 2013), en la cual también no contaron con un estudio cromatográfico.

Cuadro 27**Porcentaje De Inhibición a los 7 Días**

TRATAM./REP	I	II	III	Σ	X
T2 D1 AJO	21,88	21,88	8,91	52,66	17,55
T3 D2 AJO	34,72	27,43	27,94	90,09	30,03
T4 D3 AJO	26,04	36,46	5,67	68,17	22,72
T6 D1 TOM	32,64	25,69	13,36	71,69	23,90
T7 D2 TOM	24,31	46,18	26,32	96,80	32,27
T8 D3 TOM	26,74	26,39	23,89	77,01	25,67
T10 D1 TAB	6,94	14,58	23,89	45,41	15,14
T11 D2 TAB	18,40	12,15	0,81	31,37	10,46
T12 D3 TAB	7,99	18,40	4,86	31,25	10,42
T14 D1 CCA	2,78	3,47	2,43	8,68	2,89
T15 D2 CCA	12,15	12,50	1,21	25,87	8,62
T16 D3 CCA	15,97	14,93	19,43	50,34	16,78
ΣBlog.	230,56	260,07	158,70	649,33	

Como podemos ver el cuadro nos muestra que el mayor porcentaje de inhibición del hongo a los 7 días de la siembra en los medios de cultivo, se dio en el tratamiento 7 del tomillo con la dosis 2 (T7D2TOM) con un dato de 32,27%, en segundo lugar podemos ver que se dio en el tratamiento 3 del ajo dosis 2 (T3D2AJO) con un valor de 30,03 % de inhibición. Así también podemos ver que el menor porcentaje de inhibición se dio en el tratamiento 14 de la cola de caballo dosis 1 (T14D1CCA) con un porcentaje de 2,89 por ciento.

Cuadro 28

Tabla De Anova Del Porcentaje De Inhibición A Los 7 Días

<i>Fv</i>	gl	SC	CM	Fc	F_T 5%	F_T 1%	DF
<i>TOTAL</i>	47	6550,34					
<i>REPETICIONES</i>	2	339,76	169,88	8,96	3,32	5,39	**
<i>TRATAMIENTOS</i>	15	5641,95	376,13	19,84	2,01	2,70	**
<i>ERROR</i>	30	568,63	18,95				
<i>Fact.Extractos</i>	3	1518,81	506,27	26,71	2,92	4,51	**
<i>Fact.dosis</i>	3	3121,02	1040,34	54,89	2,92	4,51	**
<i>Extracto/Dosis</i>	6	1002,12	167,02	8,81	2,42	3,47	**

En los resultados que nos da la tabla de anova a los 7 días podemos ver que en el factor dosis hay diferencias significativas al 5% con $54,89 F_c > 2,92 F_t$, como así también para el 1% se existen una diferencias significativas con $54,89 F_c > 4,51$.

En el factor extracto podemos distinguir que hay diferencias significativas tanto para el 5% con un dato de $26,71 F_c > 2,92 F_t$ y como para el 1% con $26,71 F_c > 4,51 F_t$, siendo ambos casos significativamente diferentes.

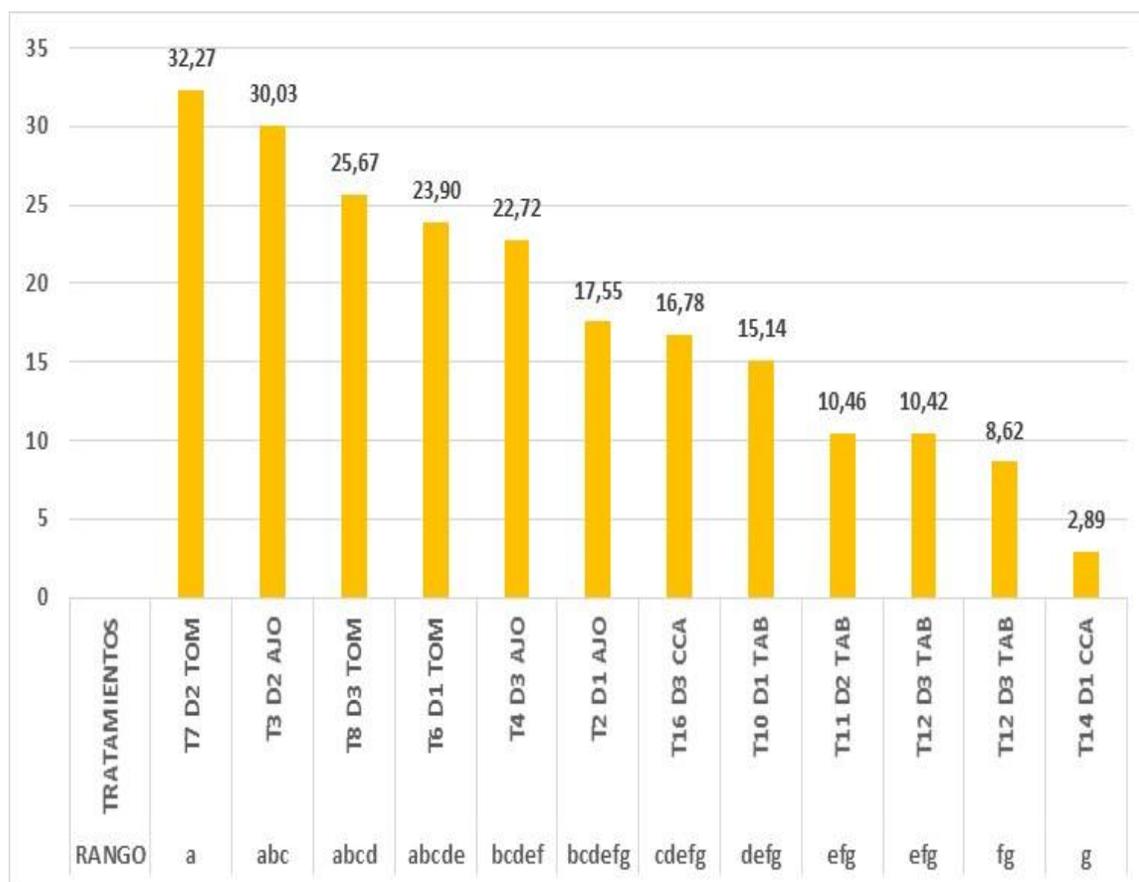
En los tratamientos se pudo observar que en el dato $19,84 F_c > 2,01 F_t$ existen diferencias significativas al 5%, al 1% también existen diferencias significativas con $19,84 F_c > 2,70 F_t$.

Para las repeticiones observamos que no hay diferencias significativas al 5 % con $8,96 F_c < 3,32 F_t$ y para el 1% existen diferencias significativas en el dato $8,96 F_c > 5,39$.

En la relación hongo dosis existieron diferencias significativas de $8,81 F_c > 2,70 F_t$ y en el 1% con $8,81 F_c > 3,47 F_t$.

Cuadro 29

Prueba De DUNCAN Para el Porcentaje De Inhibición los 7 Días



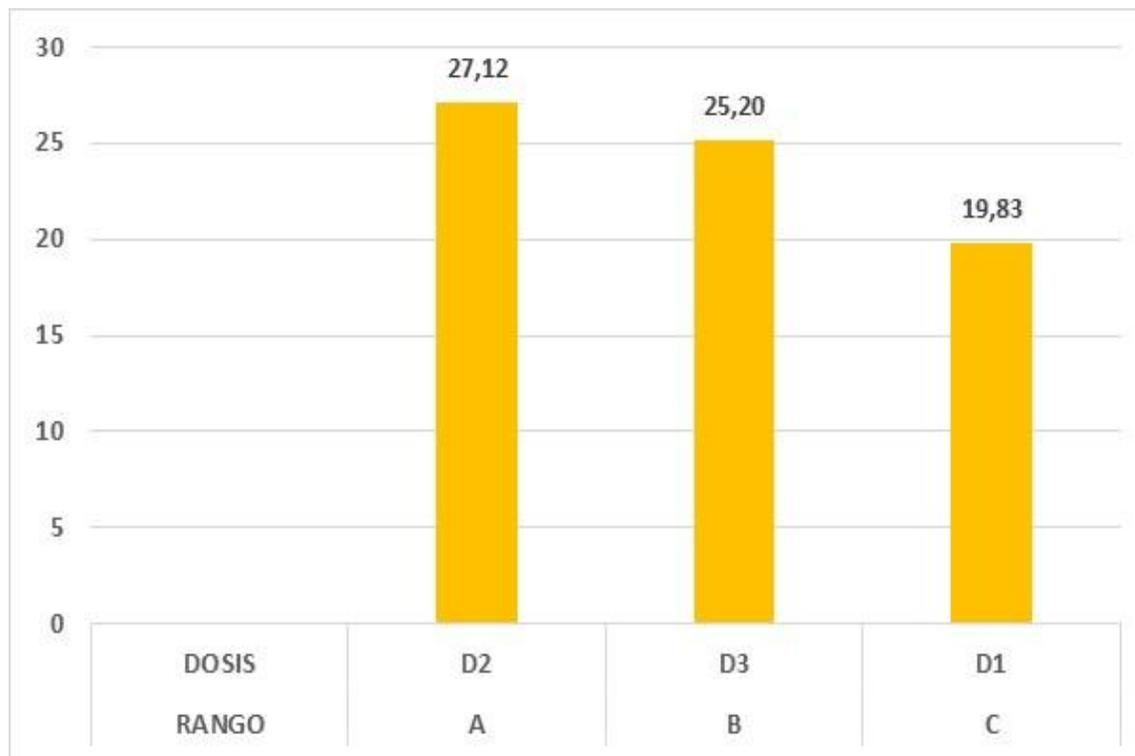
Los resultados de la prueba de duncan nos muestran en el cuadro los tratamientos; el ajo dosis 1 (T2D1AJO) con un rango de 17,55% al tratamiento de la cola de caballo dosis 1 (T14D1CCA) con un rango de 2,89% son los que menor porcentaje de inhibición nos dieron para el control del hongo.

Los tratamientos del tomillo dosis 2 (T7D2TOM), ajo dosis 2 (T3D2AJO), tomillo dosis 3 (T8D3TOM), tomillo dosis 1 (T16D1TOM) y ajo dosis 3 (T4D3AJO) son los que mayor porcentaje de inhibición obtuvieron con respecto al resto de los tratamientos, siendo así significativamente diferentes.

Podemos, indicar que, el mejor tratamiento es el del tomillo al 3%, para la inhibición del crecimiento del hongo estudiado.

Cuadro 30

Prueba De Duncan Del Porcentaje De Inhibición Factor Dosis



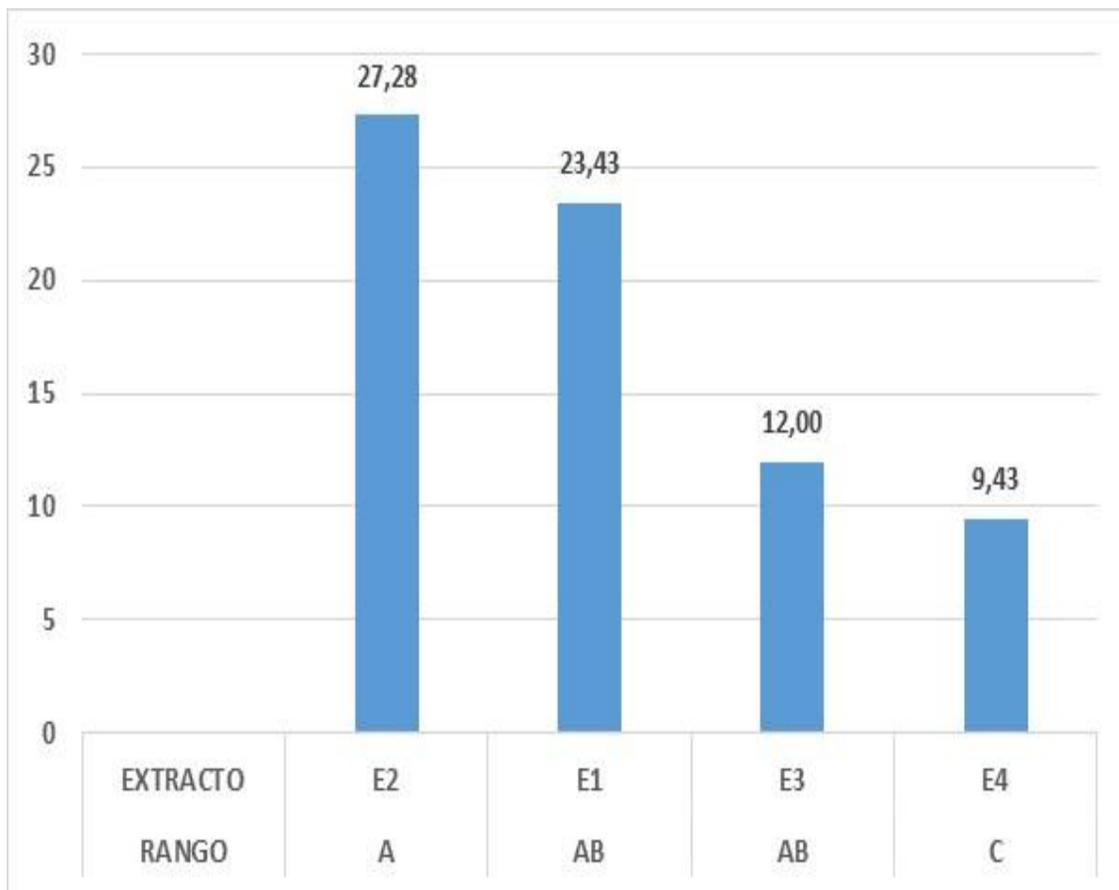
En el factor dosis podemos interpretar según la tabla que la dosis 2 (D2) ubicada en el rango (A) con un porcentaje de 27,12 %, es la que mayor porcentaje nos dio a los 7 días, seguida por la dosis (D3) con un dato de 25,20%.

El que menor porcentaje nos dio la dosis 1 con 0,45 ml. (D1) en el rango (C), no habiendo significancia entre la dosis 3 con 2,25 ml. (D3) y la dosis 1 con 0,45 (D1).

El cultivo del hongo *Fusarium sp*, según (Quiroz, 2008), encuentra un antagonismo con los demás hongos, esto lo logramos comprobar en laboratorio en nuestro segundo ensayo en una de nuestras réplicas, ante un hongo alternaría que estaba contaminando toda la muestra, tomando en cuenta la asepsia para el cultivo del mismo como lo menciona Quiroz Sarmiento.

Cuadro 31

Prueba De Duncan Del Porcentaje De Inhibición Factor Extractos



En el factor extractos según la tabla podemos ver que el de mayor porcentaje fue el extracto del tomillo (E2) con 27,28% de inhibición sobre el hongo, siendo este el mejor controlador, seguido también por el extracto del ajo con un porcentaje de 23,43%.

Así mismo podemos, decir que, entre los extractos (E1) y (E2) no existe una diferencia significativa y tampoco con los restantes.

Cuadro 32**Porcentaje De Inhibición a los 14 Días**

TRATAM./REP	I	II	III	Σ	X
T2 D1 AJO	6,08	19,87	24,57	50,52	16,84
T3 D2 AJO	14,18	16,45	16,67	47,30	15,77
T4 D3 AJO	7,59	33,12	17,74	58,45	19,48
T6 D1 TOM	17,72	27,35	25,64	70,71	23,57
T7 D2 TOM	10,13	47,22	38,46	95,81	31,94
T8 D3 TOM	3,54	25,85	20,94	50,34	16,78
T10 D1 TAB	3,54	5,56	20,51	29,61	9,87
T11 D2 TAB	2,53	0,00	0,21	2,75	0,92
T12 D3 TAB	1,27	6,62	2,78	10,67	3,56
T14 D1 CCA	1,27	1,92	16,03	19,21	6,40
T15 D2 CCA	0,51	9,19	10,26	19,95	6,65
T16 D3 CCA	1,01	11,32	17,74	30,07	10,02
ΣBlog.	69,37	204,49	211,54	485,39	

Según los resultados del análisis estadístico podemos observar, que el mayor porcentaje de inhibición a los 14 días en el hongo fue en el tratamiento 7 del tomillo (T7 D2 TOM), que llego a obtener un dato de 31,94%, así mismo podemos ver que el tratamiento 11 del tabaco (T11D2TAB) fue el que menor porcentaje de inhibición tuvo con un dato 0,92%, llegando a la conclusión que el mejor porcentaje lo obtuvo el tomillo con la dosis 3 al 5% con un valor de 2,25 ml.

Cuadro 33

Tabla De Anova Del Porcentaje De Inhibición A Los 14 Días

<i>Fv</i>	GI	SC	CM	Fc	F_T 5%	F_T 1%	DF
<i>TOTAL</i>	47	6405,50					
<i>REPETICIONES</i>	2	802,50	401,25	9,15	3,32	5,39	**
<i>TRATAMIENTOS</i>	15	4288,03	285,87	6,52	2,01	2,70	**
<i>ERROR</i>	30	1314,97	43,83				
<i>Fact.Extractos</i>	3	1599,35	533,12	12,16	2,92	4,51	**
<i>Fact.dosis</i>	3	1655,72	551,91	12,59	2,92	4,51	**
<i>Extracto/Dosis</i>	6	1032,95	172,16	3,93	2,42	3,47	**

Según nuestra tabla de anova se puede ver los siguientes resultados, obtuvimos que en el factor dosis obtuvimos diferencias significativas al 5 % con $12,59 F_c > 2,92 F_t$ y al 1% existe unas diferencias significativas con el dato $12,59 F_c > 4,51 F_t$, existiendo diferencias significativas.

Los resultados en el factor extractos nos dice que si hay diferencias significativa en $12,16 F_c > 2,92 F_t$ al 5%, al 1% también existen diferencias significativas con $12,16 F_c > 4,51 F_t$, siendo significativamente diferentes a los dos porcentajes de la tabla.

En los tratamientos existen diferencias significativas al 5% con $6,52 F_c > 2,01 F_t$, así también hay diferencias significativas al 1 % con $6,52 F_c > 2,70 F_t$.

En las repeticiones podemos observar que hay diferencias significativas con $9,15 F_c > 3,32 F_t$ y así también al 1% con $9,15 F_c > 5,39 F_t$ habiendo diferencias significativas.

Los datos de la relación extracto dosis, nos dicen que, hay diferencias significativas al 5% con un dato de $3,93 F_c > 2,42 F_t$, como así también hay diferencias significativas en $3,93 F_c > 3,47 F_t$ al 1%.

Cuadro 34

Prueba De DUNCAN Para el Porcentaje De Inhibición los 14 Días



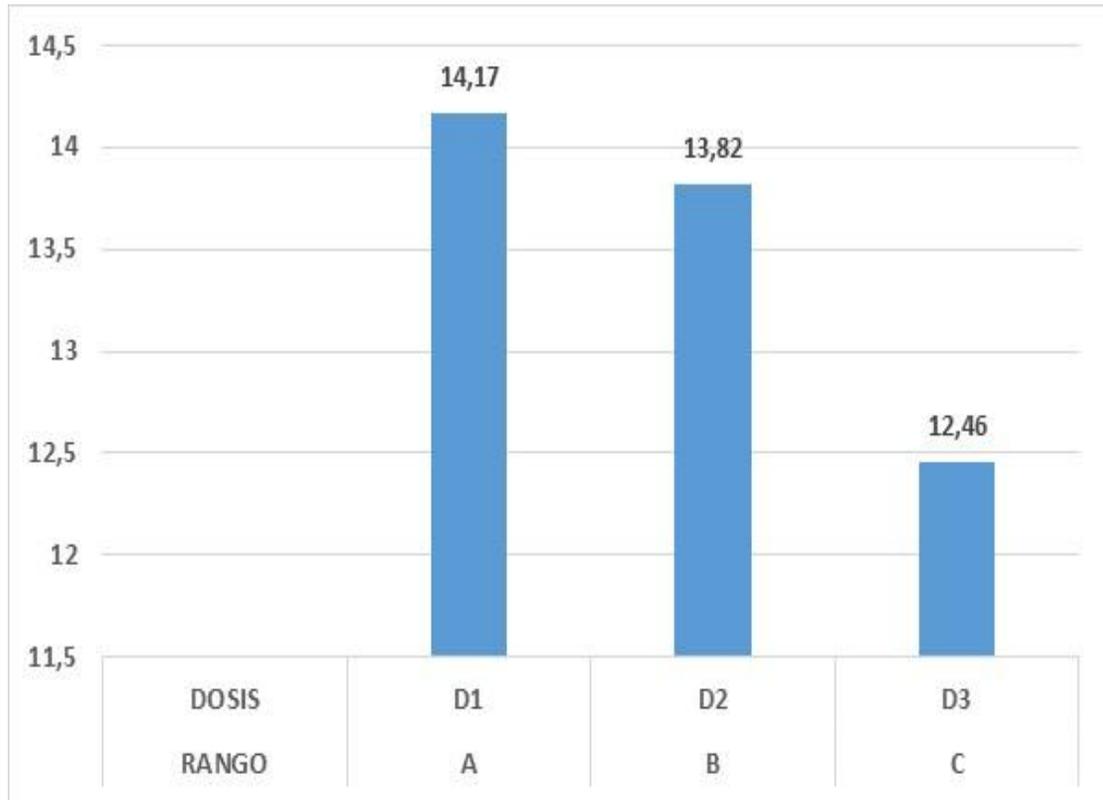
Se puede observar en la tabla que el tratamiento 11 dosis 2 del tabaco (T11D2TAB), perdió casi en su totalidad el efecto inhibitor de sus metabolitos secundarios con un porcentaje de 0,92%.

Los tratamientos 6 y 7 con las dosis 1, 2 del tomillo (T7D2TOM), (T6D1TOM), tratamiento 4 del ajo dosis 3 (T4D3AJO) son los que mayor porcentaje de inhibición pudieron alcanzar a los 14 días después de la siembra, teniendo una diferencia significativa con el resto de los tratamientos.

Así mismo podemos, expresar que, el mejor tratamiento para la inhibición micelar del hongo *fusarium sp.*, fue el tratamiento 7 del tomillo (T7D2TO), con una dosis del 3% con un dato de 2,25 ml.

Cuadro 35

Prueba De Duncan Para El Diámetro Del Micelio Factor Dosis

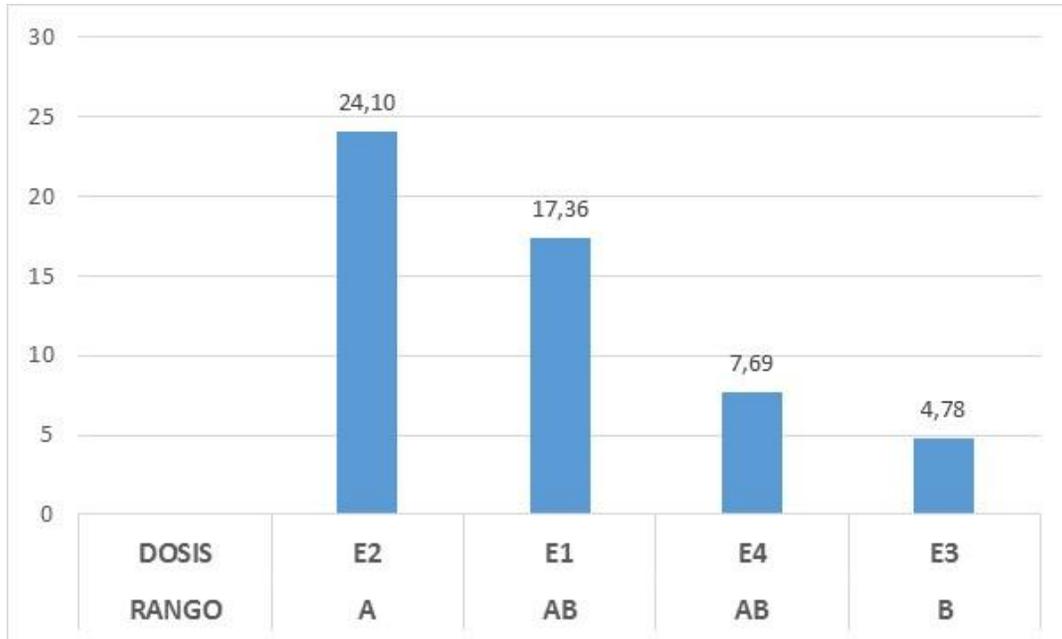


En el siguiente cuadro resultado de la prueba de duncan, podemos observar que la mejor dosis es la dosis 1 (D1) con 14,17% de inhibición.

Para la dosis 2 al 3% con un contenido de 1,35 ml. (D2) y la dosis3 al 5% con 2,25ml (D3), no tuvieron ninguna diferencia significativa, con estos datos podemos, decir que, el factor dosis es relativamente irrelevante.

Cuadro 36

Prueba De Duncan Para El Diámetro Del Micelio Factor Extracto



En el caso de los resultados del factor extractos podemos corroborar que el mejor extracto para la inhibición del crecimiento del hongo es el extracto del tomillo (E2), que llego a obtener un porcentaje de 24,10%, habiendo diferencias significativas con el resto de los extractos.

En la tabla nos muestra también que entre el extracto 1 del ajo (E1), extracto cuatro de cola de caballo (E4) y el extracto 3 del tabaco (E3) no hay diferencias significativas.

(Gonzales., 2014), nos muestra que si se quiere inocular un hongo para obtener mejores resultados, se debe de hacer más de tres aislamientos seguidos de los mismos explantos, lo cual pudimos corroborar con los rendimientos de crecimiento micelar de nuestro hongo estudiado en nuestro presente trabajo de tesis.

3.2. BIO ENSAYOS.

3.2.1. Porcentaje de incidencia.

Incidencia (I)= (número de individuos infectados/ total de individuos)*100

Cuadro 37

Porcentaje de Incidencia a los 7 días

<i>EXTRACTOS</i>	TOTAL	INCIDENCIA %
<i>AJO</i>	8	100
<i>TOMILLO</i>	8	100
<i>TABACO</i>	8	100
<i>COLA DE CABALLO</i>	8	100

Se infectó el 100% de las plantas por medio del sustrato que ya contenía el hongo *Fusarium sp*, al momento del trasplante se hizo la aplicación de los extractos, a los 7 días se hizo una nueva aplicación de los extractos con las dosis 2 al 3% con 1,35ml y la dosis 3 al 5% con 2,25 ml.

3.2.2. Porcentaje de inhibición a los 7 días con un control preventivo

Porcentaje de inhibición (P)= (número de individuos contados/total de individuos)*100

Cuadro39**Porcentaje de Inhibición a los 7 días (Tratamiento preventivo)**

<i>Extractos</i>	Dosis	Total	% Inhibición
<i>Ajo</i>	D2	1	25
	D3	1	25
<i>Tomillo</i>	D2	3	75
	D3	4	100
<i>Tabaco</i>	D2	0	0
	D3	1	0
<i>Cola de caballo</i>	D2	0	0
	D3	0	0

Al ver que en el primer ensayo no se obtuvo rendimientos en la inhibición del hongo, se optó por hacer un tratamiento preventivo al sustrato para recién trasplantar las plantas de tomate, en este caso a los 7 días se hizo otro tratamiento llegando a obtener que el extracto del tomillo con la dosis 3 (D3) al 5% con 2,25 ml. Es la más efectiva con un porcentaje del 100%, en la prueba de cambo seguida así por la dosis 2 (D2) del tomillo, con un contenido de 1,35 ml. También se puede ver que el extracto del tabaco controló al hongo con un 25% en la dosis D3. Así mismo podemos corroborar que los extractos del tabaco y la cola de caballo no tienen un efecto de inhibición en el hongo. A los 5 días después de la segunda aplicación de las dosis de los extractos se llegó a observar un leve síntoma en las hojas del tomate.

CAPÍTULO V

V. CONCLUSIONES

- Se identificó y se aisló en medio PDA (agar papa dextrosa), las cepas del hongo *Fusarium sp.*
- Se preparó las cantidades necesarias de los cuatro extractos Ajo (*Allium sativum l.*), Tabaco (*Nicotina Tabacum*), Tomillo (*Thymus vulgaris*), Cola de caballo (*Equisetum sp.*), para el control in vitro del *Fusarium Sp.*
- El factor dosis llegó a ser irrelevante en el caso del control del hongo *Fusarium sp in vitro* del presente trabajo.
- En el factor extractos pudimos obtener que el mejor extracto que nos resultó, tanto para la prueba in vitro como para nuestra prueba de campo fue el extracto del tomillo.
- El mejor tratamiento para el crecimiento micelar del hongo *Fusarium sp* se dio en el tratamiento 7 del Tomillo, al 3% que contiene 1,35 ml. (T7D2TOM) a los 5 días después de la siembra en el medio de cultivo PDA.
- El mejor tratamiento para la inhibición del crecimiento micelar del hongo *Fusarium*, fue dado en el tratamiento 7 del tomillo, con una dosis al 3%, con 1,35 ml. (T7D2TOM), que llegó a darnos un 44, 31% de inhibición a los 7 días después de la siembra del hongo *Fusarium sp.*
- Para la prueba de campo el factor dosis tiene diferencias significativas, así mismo la mejor dosis nos resulta la D3 al 5% con un contenido 2,25 ml., seguida por la D2 que contiene 1,35 ml., del extracto del tomillo y del tabaco.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar, la esterilización de los materiales de vidrio y medios de cultivo, ya que así se asegura un estado de asepsia que permite trabajar sin dificultades cuando se ejecuta el trabajo de forma eficiente.
- Recomendamos que si se quiere inocular el hongo, se debe hacer más de tres aislamientos seguidos de los explantos usados.
- La humedad es fundamental para el desarrollo del micelio del hongo, por tanto se recomienda mantener una temperatura estable de 23°C, porque esta va a disminuir con la formación micelio, y se tiene que asegurar la subsistencia del hongo formando estructuras propagativas como esporas.
- Cuando ya se hizo la siembra en el medio de cultivo, es recomendable asegurar las cajas Petri, esto para evitar la contaminación del hongo.
- Muchas veces es posible identificar al hongo por observación directa de los síntomas y/o signos en los órganos afectados; también la especie de la planta hospedante, puede ser determinante para esto.
- Se recomienda probar distintos tipos de maceración de los extractos, ya que estos varían mucho a la hora de la inhibición.
- Se recomienda, en el caso de la prueba de campo realizar un tratamiento preventivo al sustrato cuando la infestación del hongo es severa.
- Se recomienda desarrollar pruebas de campo en parcelas abiertas para determinar la capacidad anti fúngica de los extractos.