

I. INTRODUCCION.-

El propóleo es un conjunto de sustancias gomosas y resinosas de color verde, pardo, castaño, rojizo o negro de acuerdo a su origen.

La palabra propóleos, deriva de los términos Griegos “pro” que significa: delante de y “polis”: ciudad.

Los propóleos son sustancias que utilizan las abejas para revestir la colmena en su parte interna como forma de protección contra el ingreso de humedad, tapar agujeros y para barnizar el interior de la colmena con fines desinfectantes.

Tratamiento ecológico que actúa como fungicida y bactericida natural que controla microorganismos patógenos en una acción obstaculizante que evita que se reproduzcan al tiempo que induce a la planta al aumento de sus defensas naturales contra la adversidad.

Estas sustancias son recogidas por las abejas (*Apis melífera*), de ciertas partes de especies vegetales, que transportan al interior de la misma modificándolas con ceras y secreciones salivares.

Por eso se decidió hacer la investigación de la actividad Antifúngica del extracto de propóleo sobre hongos que atacan a las plantas en general. Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo, filamentosos que carecen de clorofila y que contienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes

La mayoría de las cien mil de hongos conocidas son estrictamente son saprofitos y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los animales.

Sin embargo, más de las 8000 especies de hongos, y cada uno de los hongos, parásitos atacan a uno o más tipos de plantas

Siendo favorable realizar el siguiente trabajo de investigación siendo que algunos hongos crecen y se reproducen solo cuando establece una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedantes durante todo su ciclo de vida estos hongos como parásitos obligados o biotrofos otros requieren de una planta hospedante durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en materia orgánica muerta o bien creciendo y reproduciéndose tanto materia orgánica muerta como en plantas vivas (como por ejemplo parásitos no obligados) (George N. Agrios 1996)

1.1. JUSTIFICACION.-

A nivel mundial, las tendencias de las poblaciones del primer mundo se están volcando hacia el consumo de productos orgánicos, naturales, hacia un estilo de vida que fundamentalmente les permita vivir una larga y saludable vida.

Tarija es considerado departamento Piloto por sus vocaciones productivas y diferentes pisos ecológicos, virtudes que la hacen favorable para el cultivo orgánico de diferentes productos que están considerados para la seguridad y soberanía alimentaria de los bolivianos.

El INIAF y otras organizaciones, están trabajando en manejo ecológico de diferentes cultivos, usando caldos, extractos de vegetales y otros productos de origen orgánicos, para la prevención y control de plagas y enfermedades, productos que son usados empíricamente, sin una base científica.

Este trabajo de investigación busca investigar la capacidad antifúngica del propóleo en la fase de laboratorio, sobre diferentes cepas de hongos, causantes de las principales enfermedades de las plantas en el departamento de Tarija. Información que nos permitirá recomendar específicamente la capacidad del propóleo para el control de enfermedades y las dosis recomendadas a emplear.

1.2. HIPOTESIS.-

El extracto etanólico de propóleo, inhibe *in vitro* a los hongos géneros *Alternaría*, *oídium*, *Botrytis*, y *Fusarium*.

1.3. OBJETIVOS.-

1.3.1. OBJETIVO GENERAL.-

- Determinar la acción fungicida *in vitro* del propóleo en el control biológico de cuatro tipos hongos (*Alternaría*, *oídium*, *Botrytis*, *Fusarium*) que afectan a los distintos cultivos de Tarija.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.-

- Identificar y aislar *in vitro* los hongos Fitopatógenos, de los géneros *Alternaría*, *oídium*, *Botrytis*, y *Fusarium*, para la obtención de cultivos monosporicos de cada género.
- Evaluaren laboratorio *in vitro* la actividad anti fúngica del propóleo usando diferentes concentraciones en medios de cultivo.
- Determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento de los hongos por acción del propóleo.

II. MARCO TEORICO.-

2.1. 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, brinde alimentos sanos y abundantes, mantenga o incremente la fertilidad del suelo y la diversidad biológica.(<http://www.fao.org/.htm>)

Uno de los factores que limitan 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 y del 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 residuos en los productos agropecuarios (Manual de laboratorio para hongos Fitopatógenos-centro internacional de la papa 2004 pag10).

El termino 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 con 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, 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. (Agricultura orgánica, ambiente y seguridad alimentaria fao 2003 editado por nadia elhage scialabba y caroline hattan pág. 11)

2.2. EL PROPOLEO.-

2.2.1. Generalidades del propóleo.-

El propóleo es un material resinoso que las abejas elaboran a partir de exudados y resinas de árboles, plantas y flores, es utilizado por las abejas para la construcción y el mantenimiento de la colmena: tapando grietas o hendiduras evitando así la entrada de viento frío o la pérdida de calor, ayudando a consolidar los componentes de la colmena y aislando las partículas extrañas dentro de la colonia para evitar su descomposición (Burdock, 1998; Paulino y col., 2003; Bankova, 2005), creando un ambiente de asepsia a la colmena, de allí el origen de la palabra propolis que en griego significa defensor de la ciudad (Burdock, 1998; Bedascarrasbure y col., 2000; Bankova, 2005).

Las abejas recolectoras (pecoreadoras) extraen el propóleo de las yemas valiéndose de sus mandíbulas y de su primer par de patas, así como la secreción de sus glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxidecenoico) lo cual permite su ablandamiento y trituración para ser transportado a la colmena. Al entrar a la misma, las propolizadoras toman pequeñas cantidades de esa sustancia completando el propolizado (Bedascarrasbure y col., 2000).

El propóleo es una sustancia resinosa, balsámica, de color verde pardo, castaño o incluso casi negro. Por lo que la composición de los propóleos estará dada tanto por los exudados recolectados, como por las sustancias secretadas como parte del metabolismo de la abeja y de los materiales que son agregados durante la elaboración del propóleo (Paulino y col., 2003) (Bankova, 200; Uzel y col., 2005).

Por lo tanto, la composición de los propóleos dependerá tanto de la vegetación, clima, época del año, así como de la especie de abeja que lo haya recolectado (Paulino y col., 2003; Bankova, 2005; Uzel y col., 2005).

Existe evidencia histórica que data del año 300 a. C. sobre el uso de los propóleos con fines medicinales (Russo y col., 2004; Uzel y col., 2005). Los antiguos egipcios lo utilizaban para embalsamar a sus momias, los griegos para aliviar diferentes padecimientos: Hipócrates (460 -

377 a. C.) lo administró para el tratamiento de úlceras en piel y Aristóteles (384 - 322 a. C.) para el tratamiento de abscesos y heridas. Los Incas lo utilizaban para disminuir la fiebre (Castaldo y col., 2002). En la actualidad es utilizado por algunas culturas de los estados europeos (Balcánicos) como tratamiento para heridas, quemaduras, faringitis y úlcera estomacal (Bankova, 2005).

La administración de este producto se ha mantenido durante siglos hasta llegar a nuestros tiempos, en los que se están realizando investigaciones científicas sobre el empleo de preparados a base de propóleos en los campos de la biología y la medicina humana.

La investigación sobre la industria farmacéutica ha dado popularidad al comercio de los propóleos en Estados Unidos, la Unión Europea y en Japón ya que están presentes en los biocosméticos y son utilizados como medicinas alternativas, así como complementos dietéticos, que mejoran la salud y previenen enfermedades (Bankova, y col., 2000; Weinstein y col., 2005). Japón, es el líder de importación de propóleos teniendo preferencia por el brasileño (Salatino y col., 2005). En el año 2002, México produjo 3.3 toneladas de propóleo (Ortega-Rivas y col., 2004).

2.2.2. Composición propóleo.-

El Propóleo está formado por más de 250 sustancias diferentes, y 50 principios biológicamente activos.

En la composición del propóleos se encuentra principalmente aceites esenciales y oligoelementos. Estos oligoelementos participan de los procesos metabólicos, fermentativos y vitamínicos y ayudan en la recuperación de estados anémicos.

El propóleo está formado de la siguiente manera: 50% resina y bálsamo 30% cera 5% polen 10% aceites esenciales y volátiles 5% materiales orgánicos y minerales.

Cuadro1
Composición Del Propóleo



Pero también está compuesto de vitaminas, aminoácidos esenciales, resinas, bálsamos y flavonoides 50% de compuestos fenólicos, flavonoides (responsables de la actividad antiviral), ácidos aromáticos, aldehídos aromáticos, cumarinas, triglicéridos fenólicos.

(Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena P. JEAN-PROST 2007)

2.2.2.1. Composición química.-

La composición de los propóleos es bastante compleja y variada ya que depende de la flora y de las condiciones geográficas y climáticas donde se elabora el producto (Bosio y col., 2003). Las abejas recolectan las resinas en un perímetro de 1-2 Km alrededor de la colmena Castillo, 2002) y su composición dependerá de la vegetación circundante y de la preferencia de la abeja por un determinado tipo de flores, según su color, aroma, forma y floración, (Bankova, 2005).

Por su consistencia y estructura, los propóleos pueden clasificarse en dos grupos: 1) Los de naturaleza fluida y 2) Los balsámicos-oleo-resinosos. Los primeros presentan una fracción importante de agentes volátiles, mientras que en los balsámicos predomina la consistencia densa, con bajo contenido de volátiles, susceptible de polimerización y con frecuencia se percibe el aroma de las plantas en forma concentrada; en general son sustancias viscosas, semisólidas y cauchosas. Dependiendo de su origen y condiciones térmicas; se presentan como un material

duro a los 15°C y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión varía entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C (Salamanca y col., 2007).

Se han identificado más de 300 constituyentes de los propóleos, dentro de los cuales una amplia variedad son compuestos fenólicos, principalmente de tipo flavonoide, siendo estos, a los que se les ha atribuido parte de las propiedades biológicas de los propóleos (Paulino y col., 2003). También se han identificado otros constituyentes como ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes, aldehídos y terpenos (Silici y col., 2005; Uzel y col., 2005; Sahinler y col., 2005). De manera general, la composición de los propóleos se basa en resinas y aceites volátiles en un 50%, cera en un 30%, aceites aromáticos en un 10%, polen 5% y el 5% restante está constituido por otras sustancias y detritos orgánicos. También se encuentran pequeñas cantidades de vitamina B, azúcares, hierro zinc, oro, plata y potasio (Farré y col., 2004).

a) Flavonoides.-

Son pigmentos naturales presentes en los vegetales, que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no es apto para producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. De forma natural están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Martínez-Flórez, 2002; Aherne, y col., 2002). Estos compuestos están también involucrados en mecanismos de foto sensibilización y de transferencia de energía, regulando así las reacciones de crecimiento, de control de la respiración, la fotosíntesis, la morfogénesis, la determinación sexual y la defensa contra infecciones (Cushnie, 2005).

Son compuestos de bajo peso molecular, polifenólicos derivados de la benzo- -pirona los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (López Luengo, 2002). Parten de un esqueleto común de difenilpiranos o fenilbenzo-pironas (C6-C3-C6), compuesto de dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona (anillo C) (López y col., 2006). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los

anillos B desde el 2' al 6'. De acuerdo a los sustituyentes presentes en estas tres estructuras cíclicas, se subdividen en función de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del anillo C, de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, y de la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B (Narayana y col., 2001). Se han descrito más de 4000 distintos flavonoides (Bylka y col., 2004) que por sus diferencias químicas pueden clasificarse en seis grupos: flavonoles, flavanos, flavanonas, flavonas, flavanonoles y antocianidinas. (Havsteen, 2002).

2.2.3. Actividad biológica de los propóleos.-

Debido a la gran cantidad de flavonoides contenidos en los propóleos, se les atribuyen un amplio espectro de actividades biológicas: Antifúngica (*Candida albicans*), antiviral (Virus de avian influenza), y antibacteriana (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena (Paulino y col., 2003; Uzel y col., 2005; Hernández y col., 2007) y antiparasitaria (Barbosa da Silva-Cunha y col., 2004). Este conocimiento ha servido como piedra angular para el desarrollo de investigaciones a nivel mundial que buscan conocer más acerca de sus propiedades curativas.

2.2.3.1. Ensayos.-

Ensayos realizados en Bulgaria han reportado los efectos de los extractos etanólicos de esa región como analgésicos, antiinflamatorios (Paulino y col., 2003) y antiparasitarios (Machado y col., 2007).

Los propóleos alemanes fueron probados en quemaduras, heridas y problemas de artritis (Hellner y col., 2008). En Turquía fueron evaluadas la actividad antimicrobiana (*K.pneumonia*, *M .morganii*) y antifúngica (*C. albicans*) (Katircioglu y col., 2006).

En Egipto, los propóleos regionales han sido probados como antivirales, antimicrobianos y antioxidantes (Faten, y col., 200; Hegazi y col., 2002). Los extractos taiwaneses mostraron actividad como citotóxicos (Chen y col., 2003). Esta misma actividad se ha estudiado en Cuba, utilizando células HeLa de carcinoma humano de cérvix (Cuesta-Rubio y col., 2001).

En las regiones templadas de Chile central, se investigó la actividad antioxidante y antiproliferativa en donde la muestra de propóleo demostró la capacidad de eliminar radicales libres e inhibir el crecimiento de células tumorales (Russo y col., 2004).

En Argentina es utilizado para prevenir problemas bucales y gastrointestinales al mezclarlo con un poco de miel y leche y también como antimicrobiano principalmente contra *S. aureus* y *E. faecalis* (Moreno y col., 1999).

En Brasil se ha estudiado su actividad citotóxica (Banskota y col., 1998), antibacterial (Santos y col., 2002) y antioxidante (Teixeira y col., 2008). Brasil se destaca por tener una amplia biodiversidad en su territorio lo cual permite tener una variedad de propóleos. Los extractos brasileños son clasificados como verdes y rojos siendo los verdes, los que cuentan con mayor preferencia en el mercado debido a su alta actividad biológica. Los extractos brasileños verdes son recolectados de las especies *Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria angustifolia* y *eucalyptus citriodora* (Salatino y col., 2005)

En el estado de Campeche, en México, se ha evaluado la actividad microbicida de los propóleos regionales contra *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* y *S. typhi* (Tolosa y col., 2002). En el estado de Campeche, en México, se ha evaluado la actividad microbicida de los propóleos regionales contra *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* y *S. typhi* (Tolosa y col., 2002).

En Sonora se ha evaluado su actividad como agente antiproliferativo en el modelo murino, anticancerígeno en líneas celulares humanas, su capacidad para inducir apoptosis (Hernández y col., 2007), su actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, y también se determinó que los extractos de esta región poseen una fuerte actividad antioxidante (Velázquez y col., 2007).

El esquema realizado por Bankova en el 2005 donde se hace referencia a los principales compuestos de propóleos y sus actividades biológicas, ha sido modificado con el fin de añadir los resultados obtenidos de estudios realizados en Sonora y hacer una comparación de las

actividades biológicas que tienen los propóleos sonorenses a las del mundo, con el fin de abrir nuevos campos de investigación.

2.2.4. Actividad antiparasitaria de los extractos de propóleos.-

En Egipto, un grupo de investigadores utilizó extracto de propóleos contra *Schistosoma mansoni* en estudios in vivo con ratones albinos; se administraron dosis de 250 mg/kg/día las cuales redujeron en un 58.5% la proliferación de los parásitos (Ragaa, 2007).

En Adana, Turquía, se investigaron los efectos de un extracto etanólico sobre el crecimiento in vitro de *Leishmania trópica*, se determinó que las concentraciones estadísticamente significativas eran de 250, 500, y 750 µg/ml. Después de comparar con el grupo control ($p < 0.05$), los resultados demostraron que el extracto etanólico de Adana reduce la proliferación de forma significativa de *L. tropica* (Duran G. y col. 2008).

La *Leishmania*, causa manifestaciones clínicas como úlceras en la piel, inflamación al hígado y bazo, desnutrición, anemia e incluso la muerte, afecta a casi 12 millones de personas en 88 países del mundo tanto en regiones tropicales como subtropicales. No hay vacunas y los tratamientos son largos y muy costosos por lo que los propóleos representan una buena alternativa a considerar (Machado y col., 2007). Los propóleos de Brasil y Bulgaria fueron evaluados contra este mismo parásito (*L. major*, *L. amazonas*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*). El ensayo se realizó de manera in vitro en placas de 96 pozos, con una incubación de 26 °C y un tiempo de monitoreo a las 24 horas en concentraciones de 0.5 a 500 µg/mL.

Los resultados de este estudio demostraron que los extractos de Bulgaria tienen un potencial de inhibición mayor que los de Brasil, esto, atribuido a la mayor cantidad de flavonoides contenida en los extractos de Bulgaria (Kumasawa y col., 2003; Machado y col., 2007).

El propóleos tiene materias colorantes, los flavonoides como la galangina, que son las más activas en la función antiséptica, contiene resinas y bálsamos (un 50%), cera de abeja (un 30%), aceites esenciales (un 10%), polen y diversos materiales minerales: aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, estaño, hierro y muchos otros.

(Propóleo: el oro púrpura de las abejas. Moisés Asis – 2005)

2.3. HONGOS FITOPATOGENOS.-

2.3.1 Generalidades de los hongos.-

Los hongos son organismos eucariontes uni o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos y con poca luz. Las células de los hongos se agrupan en filamentos llamados hifas que en conjunto recibe el nombre de micelio.

Antiguamente, los hongos se incluían en el reino Plantae, pero por carecer de clorofila y tener una composición química diferente en la pared celular, se clasificaron 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. (Fitopatología general Enfermedades causadas por hongos. MSc. Martin Urbina Chavarría agosto del 2011).

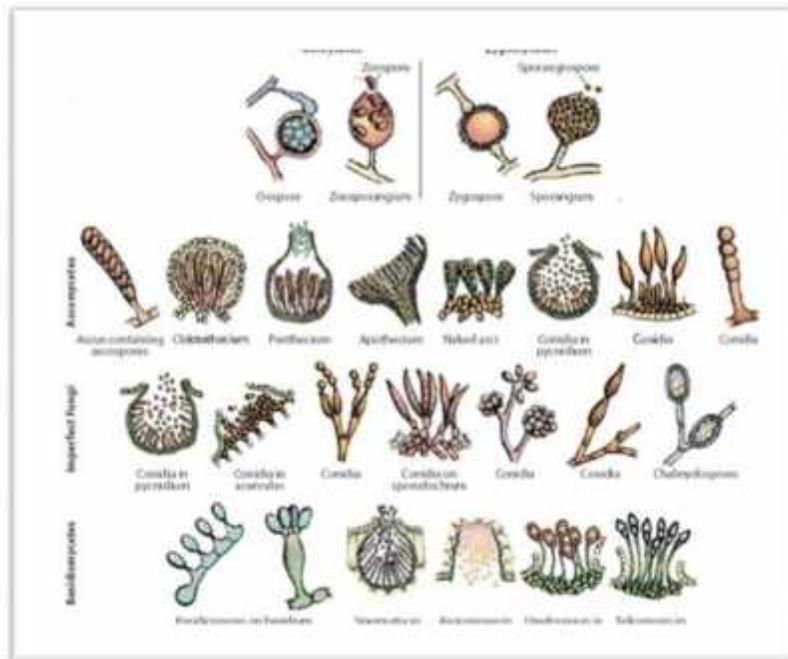
2.3.2 La morfología de los hongos.-

Los hongos constan de una masa de filamentos muy ramificados y enmarañados a los que se denomina hifas.

Esos filamentos están incompletamente divididos en células por unas paredes (tabiques) dispuestas en ángulo recto respecto al eje longitudinal de aquellos y esparcidas por toda la maraña hifas.

Los tabiques de casi todos los hongos son porosos y permiten el flujo citoplásmico de una célula a otra. En otros grupos, los núcleos están dispersos en una masa citoplásmica ininterrumpida; es decir, se trata de estructuras cenocíticas. La masa filamentosa entera se denomina micelio.

Figura 1
Morfología de los hongos Fitopatógenos



(George N Agrios)

Es frecuente que en el micelio de los hongos parasíticos en rápido crecimiento aparezcan hifas especializadas denominadas haustoriales.

En el caso de los hongos que parásita a las plantas, esas cortas prolongaciones penetran en las células y absorben en poco tiempo las sustancias nutritivas ahí presentes.

La mayoría de hongos tienen un soma vegetativo similar al de las plantas que consta de filamentos microscópicos continuos más o menos alargados y ramificados que tienen paredes celulares definidas. Al soma del hongo se le denomina micelio, y a las bifurcaciones individuales o filamentos del micelio se les denomina hifas, cada hifa o micelio puede tener un grosor uniforme o pueden terminar en porciones más delgadas o más anchas.

Las hifas de algunos hongos tienen un diámetro de tan solo 0,5µm, mientras que otras tienen un espesor de más de 100 µm, en algunos hongos el micelio tiene una longitud de tan solo unos cuantos micrómetros, pero en otros produce filamentos de varios metros de longitud.

En algunos hongos, el micelio está constituido por células que contienen uno o dos núcleos por célula, en otros el micelio es cenocítico es decir contiene muchos núcleos y está integrado por una célula multinucleada continua y tubular que puede o no ramificarse o bien puede estar dividido por varias paredes transversales (septos) de ahí que cada segmento represente una hifa multinucleada. El crecimiento del micelio se produce en las puntas de las hifas.

Algunos de los hongos inferiores carecen de un micelio verdadero y producen un plasmodio multinucleado, amiboideo y desnudo o unos sistemas de filamentos de diámetros más u menos distintos y que varía constantemente, denominado rizo micelio.

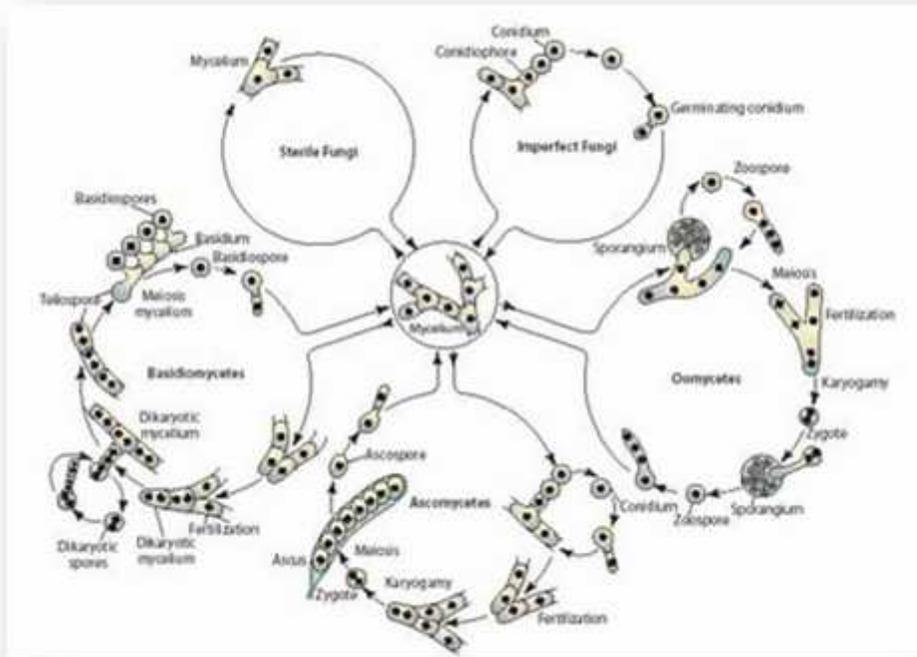
(Hongos microscópicos saprobios y parásitos Teresa Mier, Conchita Toriello, Miguel Ulloa – 2002 página 23)

2.3.3. Reproducción.-

Los hongos se reproducen principalmente por esporas, las esporas son estructuras o especializados para la propagación del hongo, constan de una o varias células, estas estructuras pueden formarse asexualmente (mediante la producción, por el micelio del hongo, de células individuales especializadas las esporas sin intervención de cariogamia o meiosis) o ser el resultado de un proceso sexual.

En algunos hongos las células intercalares o terminales de una hifa se alargan están rodeados por una pared densa y se reparan para formar clamidosporas. En otros grupos de hongos las esporas asexuales (conidios) se forman en el interior de estructuras de pared gruesa denominadas picnidios

Figura 2
Ciclo nuclear genérico de los hongos y principales grupos de hongos Fito patógenos
(Agrios, 2005).



En los hongos inferiores las esporas sexuales se forman en el interior de un saco denominado esporangio y se diseminan en el momento en que se rompe esta estructura o a través de una abertura que posee. Otros hongos producen esporas asexuales denominadas conidios que se desprenden de las células terminales o laterales de hifas especializadas denominadas conidióforos.

La reproducción en los hongos puede ser asexual o sexual y, en ambos casos, las esporas son las estructuras, responsables de dispersar la progenie para colonizar nuevas localizaciones. Algunas esporas están diseñadas para resistir condiciones adversas de crecimiento o para proporcionar un periodo de latencia.

El micelio de los mohos puede también estar fragmentado, y los fragmentos resultantes puede cada uno seguidamente desarrollarse en un talo individual por el proceso de reproducción

vegetativa. El término reproducción vegetativa es usado para referirse a la reproducción asexual, donde las estructuras reproductoras especiales no son esporas. El estado vegetativo o asexual de un hongo es conocido como anamorfo y el estado sexual como el teleomorfo (estado perfecto).

2.3.3.1. Reproducción asexual en hongos.-

La forma simple de la reproducción asexual es la producción de esporas vegetativas. Son dos estructuras principales, asociadas con la reproducción vegetativa. Son los artroconidios, y los clamidoconidios. Los artroconidios son producidos por las hifas que se separan y fragmentan.

Estos pueden también ser denominados talosporas. Los clamidoconidios son usualmente mayores que los artroconidios, son redondeados y están inflados con alimentos de reserva. La formación de estas estructuras es usualmente como respuesta al estrés medioambiental. Bajo condiciones favorables, ambos, artroconidios y clamidoconidios germinan para producir un nuevo micelio.

Las verdaderas esporas asexuales de los hongos difieren de las esporas vegetativas en que son formadas en estructuras especializadas llamadas esporóforos. Los cuales son también producidos generalmente en gran número. Se producen porque las células se dividen mitóticamente, y la composición genética de las esporas es idéntica a la de la célula parental.

Estas esporas son variables en tamaño, forma complejidad y color. Esto proporciona medios excelentes para la identificación de los hongos. Y también en parte forma la base de la clasificación micológica. Algunos hongos producen sólo un tipo de esporas asexuales, mientras otros pueden producir diferentes tipos de esporas.

La mayoría de las esporas son diseminadas por el viento, agua o los insectos. Las esporas asexuales proporcionan un medio de reproducción para los hongos y, a causa del gran número de esporas que son producidas, la diseminación extensa de las especies es posible.

Algunas esporas asexuales tienen vida corta, y son sensibles al estrés externo como la radiación ultravioleta y la desecación. Sin embargo, este no es el caso siempre. Muchas esporas, particularmente aquellas que tienen pigmentación oscura o aquellas con pared gruesa, tienen resistencia a las presiones medioambientales. Las esporas resistentes pueden ser usadas como un estado de latencia en el ciclo de vida del hongo.

Las esporas asexuales pueden ser producidas bien exógenamente en los extremos o lados de las hifas, o endógenamente en estructuras especializadas semejantes a sacos llamadas esporangios.

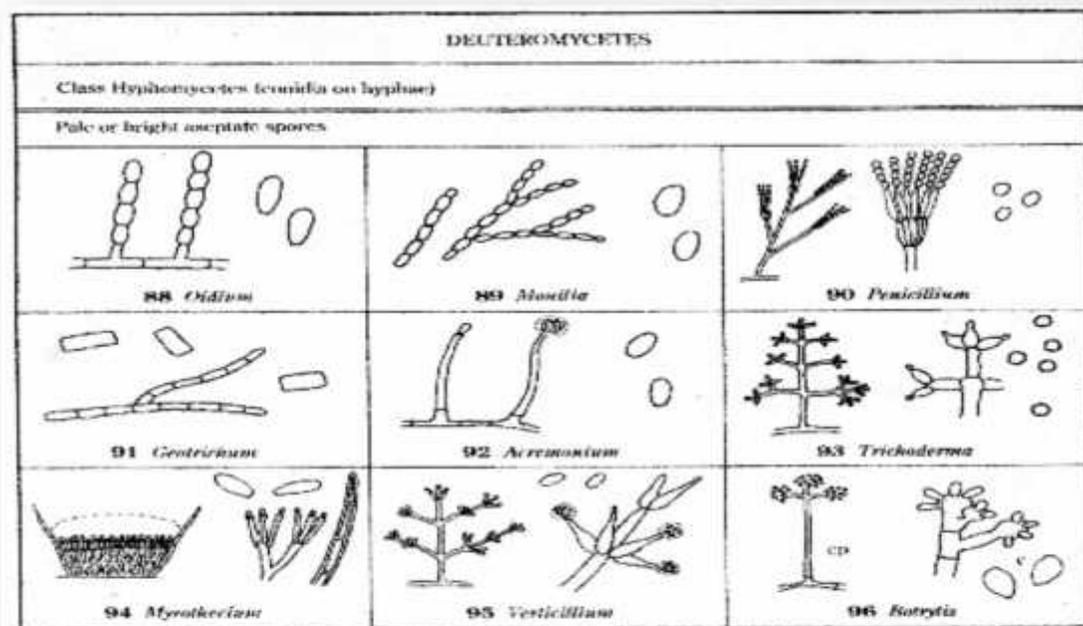
Los hongos inferiores producen esporas en esporangios que están formados típicamente en los extremos de hifas ordinarias o en hifas especializadas denominadas esporangióforos, aunque pueden ser formados a lo largo de la estructura hifal.

Muchos hongos terrestres producen esporas no móviles llamadas aplanosporas, pero los acuáticos y algunos hongos habitantes del suelo que viven en suelos húmedos producen esporas móviles, llamadas zoosporas, dentro de esporangios. La movilidad de las zoosporas es conferida por la posesión de flagelos. En los hongos que producen zoosporas, el esporangio es nombrado como el zoosporangio.

Las esporas producidas exógenamente están formadas muchas veces en hifas especializadas, y son denominadas conidiosporas o simplemente conidias. Las conidias varían en forma, color y complejidad y pueden ser grandes o pequeños. Estas están unidas en estructuras llamadas conidióforos.

Los conidióforos algunas veces, pero no siempre, difieren de las hifas vegetativas, y pueden ser característicos de un género o especie de hongo particular. Reproducción asexual en hongos deuteromycetes (Fitopatología General – Guías de Apoyo Capítulo3 Christian A. Reyes R.)

Figura 3
Morfología estructural de hongos deuteromicetes



(George N Agrios)

2.3.3.2. Reproducción sexual en los hongos.-

Los hongos son clasificados de acuerdo a su método de reproducción sexual, pero hay un grupo de hongos en el que la reproducción sexual no ha sido observada y existen sólo en el estado anamórfico. Estos hongos son agrupados juntos en un grupo conocido los Hongos Imperfectos o Deuteromicetes.

En algunos casos, los Hongos Imperfectos pueden ser incapaces de reproducirse sexualmente, pero en otras instancias puede simplemente no haber sido observada. Algunos miembros de los Deuteromicetes son claramente referidos a especies cuyo patrón de reproducción sexual ha sido esclarecido. Tales similitudes son generalmente demostradas por similitud con las estructuras de reproducción asexual de los hongos.

La reproducción sexual en hongos es muchas veces en respuesta al estrés ambiental como cambios de temperatura, pH adverso o carencia de nutrientes. En el laboratorio, las condiciones pueden ser manipuladas para disparar la reproducción sexual por cultivos de crecimientos en

medios que son deliberadamente bajos en nutrientes. El resultado de la reproducción sexual en hongos es la producción de esporas sexuales que son muchas veces estructuras resistentes, capaces de entrar en una fase de latencia.

Como en toda reproducción sexual, en los hongos básicamente implica la fusión de dos núcleos compatibles. Con la excepción de algunas especies de levaduras, los hongos están en un estado haploide. Esto consiste en que tienen un solo conjunto de cromosomas desapareados. La reproducción sexual de los hongos se produce un estado diploide, en el que los cromosomas están pareados, y la fusión celular es seguida por una meiosis del núcleo del cigoto (inmediatamente a menudo) así que la progenie puede regresar otra vez más al estado haploide.

Típicamente ellos tienen tres fases en la reproducción sexual de los hongos, nombrada plasmogamia, cariogamia y meiosis. La plasmogamia supone la fusión de dos protoplastos. Esto conduce a unir dos núcleos compatibles en células idénticas. El par de núcleos es llamado dicarion y la célula que los contiene se designa por dicariótica.

En los hongos inferiores, la plasmogamia es casi inmediatamente seguida por la cariogamia, o la fusión de los dos núcleos, pero en los hongos superiores estos dos procesos pueden ser separados en el tiempo. Además, en los hongos superiores, las células dicarióticas pueden multiplicarse, con una división simultánea de los dos núcleos en cada célula. Este proceso puede producir numerosas células dicarióticas. Esto es lo que se refiere a la fase dicariótica.

Cuando la fusión nuclear o la cariogamia sucede eventualmente, esta es seguida por la meiosis, volviendo las células fungales al estado haploide una vez más.

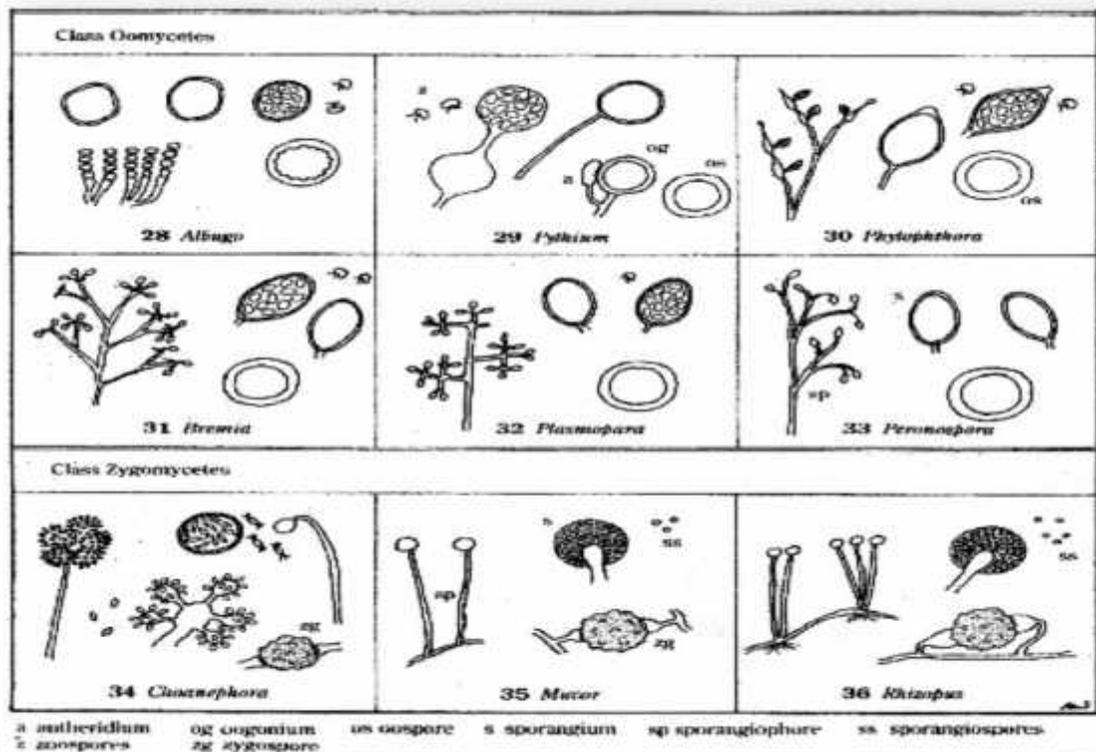
Los órganos sexuales de los hongos se denominan gametangios, estos son diferenciados desde las hifas vegetativas. En algunos hongos son indistinguibles unos de los otros, además otros gametangios machos y hembras son claramente diferentes. (Fitopatología General – Guías de Apoyo Capítulo3 Christian A. Reyes R.)

- **Reproducción sexual en los Ficomicetos.-**

En todos los Ficomicetos, el resultado de la reproducción sexual es producir esporas que germinan bajo condiciones favorables para producir el estado reproductivo asexual directamente, o poco después de la germinación. Los Ficomicetos acuáticos generalmente forman gametos móviles llamados zoosporas. Se fusionan para formar un cigoto móvil que solamente le queda entrar en una última fase. (Fitopatología General – Guías de Apoyo Capítulo3 Christian A. Reyes R.)

Figura 4

Morfología de los hongos inferiores (ficomicetes)



(George N Agrios)

2.4. GENERALIDADES DE LOS HONGOS EN ESTUDIO.-

2.4.1. ALTERNARÍA SP.-

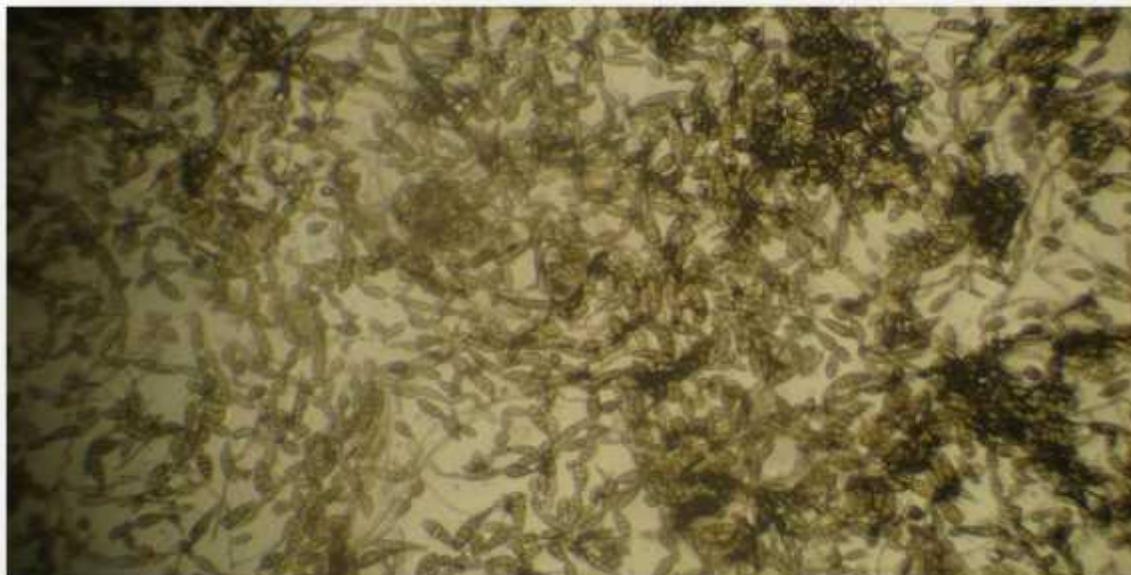
Cuadro 2
Clasificación científica de la Alternaría sp

Nombre Científico:	Alternaría sp
Clase:	Deuteromycetes,
Orden:	Moniliales
Familia:	Dematiaceae.

Fuente: (<http://web.entomology.cornell.edu/shelton/veg-insects-global/spanish/eblight.html>)

Hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular

Figura 5
Vista De Microscopio De La Alternaría 10x



Fuente propia

2.4.1.1. Descripción.-

Hifas septadas dematiáceas. Conidióforos septados, cafés, con una apariencia en zigzag, debido a la __presencia de cicatrices planas en el sitio donde se produjo la conidia (célula conidiogéna porógena). Conidias cafés, de __7-10 x 23-34 μm , con septos transversales y longitudinales, organizadas solitarias o catenuladas acropétalas, lisas o rugosas.

Laparte de la con colonias de crecimiento rápido (tres o cuatro días), vellosas, al principio de color gris, después el centro se oscurece (tonos negros más o menos intensos) pero los bordes siguen siendo grisáceos. Reverso de color negro.

Alternaría en cultivo presenta unas colonias de colores oscuros, grises, oliváceos, marrones o negros. Sus conidióforos son macronematosos, mononematosos, simples o ramificados, de color marrón claro a oscuro.

La célula conidiogéna es integrada, terminal o intercalar, generalmente simpodial. Los conidios, muy característicos por su tabicación longitudinal, transversal u oblicua, son del tipo dictiospóreo y presentan forma ovoide u obclavada, con superficie lisa o rugosa y de coloración marrón claro a oscuro.

Sus esporas están en suspensión en el aire, sobre el suelo, sobre los objetos y en el agua, tanto fuera, como dentro de casa. Las esporas se pueden distribuir de una en una, o en largas cadenas, y pueden crecer en colonias visibles, de color negro o gris (Manual de enfermedades de las plantas - Página 593 I. M. Smith – 1992)

2.4.1.2. Síntomas.-

Lesiones necróticas color cafés redondas, círculos concéntricos en hojas más bajas y más viejas. En tubérculos pequeñas lesiones hundidas con reborde levantado 1-2cm de diámetro putrefactas secas cafés.

Figura 6
Síntomas De Alternaría



Fuente: (<http://www.galeon.com/mundoagricola/index.htm>)

2.4.1.3. Etiología.- alternaría sp (deuteromicetes)(Enfermedades en Bolivia Juan Antonio calderón 1984)

2.4.1.4. Ciclo de la Enfermedad.-

El hongo puede sobrevivir en el suelo, en residuos de cultivos infestados y malezas. El hongo puede sobrevivir en semillas y este es dispersado con la ayuda del viento, agua, insectos, trabajadores y maquinaria agrícola. Las esporas que aterrizan en las plantas de tomate germinan e infectan las hojas cuando éstas están húmedas. Las esporas pueden penetrar las hojas, tallos o frutos. El hongo es más activo cuando ocurren temperaturas moderadas o calientes y el ambiente está húmedo. Esta enfermedad es mayor problema en la época lluviosa. El tizón temprano es más severo cuando las plantas están estresadas por mucho fructificación, ataque de nematodos, o deficiencias de nitrógeno.

Hospederos.- Tomate, papa, berenjena, chile verde, chile picante y otras plantas de la familia solanácea

(CIIFAD, La Universidad de Cornell 1996)

2.4.2. FUSARIUM SP.

Cuadro 3
Clasificación científica del Fusarium sp

Nombre Científico:	Fusarium sp
Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Nectriaceae
Género:	Fusarium

(LINK EX GREY, 1821)

2.4.2.1. Características de la enfermedad.-

Esta enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo causando grandes pérdidas en el cultivo de tomate. El hongo sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra y posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo por espacio de 6 años.

Es favorecido por temperaturas cálidas (20°C) asociada a alta humedad relativa. El hongo penetra en la planta a nivel del suelo ya sea por el tallo o raíces superficiales, luego por los haces vasculares es trasladado a toda la planta.

2.4.2.2. Organismo causal.-

El organismo causal es el hongo perteneciente a la clase deuteromycete denominado *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Este presenta numerosas estructuras llamadas esporodoquios donde

se agrupan las esporas. Existen dos tipos de conidios, los macroconidios que son hialinos, tabicados, generalmente con tres tabiques y microconidios más pequeños hialinos, unicelulares.

Fusarium 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. Posee células de paredes engrosadas que actúan como estructuras de resistencias denominadas clamidiosporas pueden ser terminales o intercalares.

Las esporas del hongo son fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de canoa. Algunas especies producen micotoxinas en los cereales y que pueden afectar a la salud de personas y animales si estas entran en la cadena alimentaria. Las principales toxinas producidas por estas especies de *Fusarium* son fumonisinas y tricotecenos.

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 Fitopatógenos causando la enfermedad conocida como fusarium. (Manual de enfermedades de las plantas - Página 604 I. M. Smith – 1992)



Figura 7: Macro y micro conidias de *Fusarium oxysporum*

2.4.2.3. Síntomas.-

Lo primero que se observa a campo es un amarillamiento en las hojas basales posteriormente se marchitan se secan pero permanecen adheridas a la planta. Esta sintomatología va progresando hacia la parte superior de la planta a veces sólo toma un sector de la misma. Al comienzo las plantas muestran marchites en las horas más calurosas del día recuperándose al final del mismo pero finalmente se marchitan y mueren. Las raíces principales y la base del tallo presentan necrosis vascular. Cuando se corta el tallo se observa el sistema vascular de color marrón.

Oscurecimiento (marrón) de los vasos (xilema), observable mediante corte transversal y/o longitudinal del tallo a unos 30 cms sobre el nivel del suelo.

Curvamiento hacia arriba de los folíolos y posible necrosis marginal e internervial posteriormente.

Marchitez unilateral de hojas, inicialmente. Al principio de las plantas se marchitan durante el día y se recuperan por la noche. En los estados avanzados la marchitez es irreversible.

Amarilleamiento de las hojas basales, inicialmente.

Los síntomas aparecen primero en las hojas basales y luego progresan en sentido ascendente.

Muerte prematura de la planta puede ocurrir si persisten las condiciones favorables al patógeno.

(<http://www.galeon.com/mundoagricola/index.htm>)

2.4.2.4. 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.

2.4.2.5. Ciclo de la enfermedad.-

Fusarium oxysporum f.sp lycopersic. Es un patógeno de tomate, Sobrevive en restos vegetales o como clamidiosporas en el suelo que perduran por varios años. La transmisión a distancia se da mayoritariamente por semilla, plantines infectados y maquinaria. Localmente se propaga por agua de riego o aire así como trasplante con material afectado

2.4.2.6. Condiciones favorables.-

Es un hongo de temperatura cálidas el desarrollo óptimo se presenta a 20 °C el rango va de 12 a 28°C. Esta temperatura acompañada de alta humedad relativa, días cortos de baja intensidad lumínica favorecen el desarrollo de la enfermedad. Otros factores son los suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio. (Fernández Valiela 1979. introducción a la fitopatología. inta. b. aires. argentina. 435-440).

2.4.3. BOTRITIS SP.

Cuadro 4
Clasificación científica del Botrytis sp

Nombre Científico:	Botrytis sp
Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Subfilo:	Pezizomycotina
Clase:	Leotiomycetes
Orden:	Helotiales
Familia:	Sclerotinicaeae
Género:	Botryotinia
Especie:	B. fuckeliana

(DE BARY WHETZEL 1945)

Las enfermedades causadas por Botrytis quizá sean las más comunes y más ampliamente distribuidas de hortalizas, plantas ornamentales, frutales, etc. Son las enfermedades más

comunes de las plantas cultivadas en los invernaderos. Estas enfermedades aparecen principalmente en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones del fruto, pero también como chanchos o pudriciones del tallo, ahogamiento de las plántulas, manchas foliares y como pudriciones del tubérculo, como un bulbo y raíces. Bajo condiciones húmedas el hongo produce una capa fructífera conspicua de moho gris sobre los tejidos afectados.

Infecta más de 200 especies vegetales distintas, determinando serias pérdidas económicas antes y después de la recolección. El patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo y puede infectar cualquier parte de la planta. Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas que tienen en cultivos de importancia tales como vid, tomate, frutilla, ornamentales.

En el ciclo de infección las esporas de *B. cinérea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportado grandes distancias por corrientes de aire. Es un hongo cosmopolita, ubicuo y sumamente polífago, que sobrevive como saprofito en restos vegetales así como, en forma pasiva, como esclerocios. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.

Algunas de las enfermedades más importantes ocasionadas por *Botrytis* incluyen al moho gris de la fresa, la pudrición por el moho gris de las hortalizas tales como la alcachofa, frijol, remolacha, col, zanahoria, pepino y berenjena, la pudrición del extremo de la punta de los plátanos, lechuga, pimiento, calabaza, tomate, etc., la pudrición del cuello y tizón de la cebolla, la pudrición del extremo del cáliz de las manzanas, el tizón de las ramitas e inflorescencias de arándanos, el tizón o moho gris de plantas ornamentales como la violeta africana, begonia, ciclamino, crisantemo, dalia, geranio, jacinto, lirio, rosal, tulipán, etc.

Botrytis también ocasiona las pudriciones blandas secundarias de frutos y hortalizas cuando se almacenan, transportan y venden en el mercado.

2.4.3.1. Morfología.-

Figura 8
Vista Desde El Microscopio 10x Botrytis



Fuente propia

El patógeno *Botrytis* sp. Produce gran cantidad de micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris.

Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. *Botrytis* inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición.

2.4.3.2. Ciclo de vida del hongo:

Al parecer, este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios del tamaño de esas semillas o sobre restos de plantas a los que ha infectado. Las etapas de invernación también se propagan mediante cualquier cosa que mueva el suelo o los restos vegetales que pudieran portar esclerocios o micelio del hongo. Este último requiere un clima húmedo y moderadamente frío (18 a 23° C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germinen sus esporas y para que produzca la infección.

El patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en cosechas que se han mantenido almacenadas durante largos periodos, aun cuando las temperaturas estén entre 0 y 10° C. Las esporas que han germinado rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero lo hacen en tejidos de la planta a través de heridas o después de que se han desarrollado durante un cierto tiempo y han formado micelio sobre los pétalos de flores senescentes, follaje moribundo de las plantas, escamas de bulbos muertos, etc.

2.4.3.3. Síntomas.-

Un síntoma particularmente sorprendente en los frutos es el denominado “mancha fantasma”. En realidad, se trata de ataques de *Botrytis* abortados. Alrededor de un punto central muy pequeño y necrótico se observa un tenue anillo de 5 a 10 mm de diámetro, blanquecino sobre el fruto verde y amarillo en el fruto maduro. La calidad gustativa del fruto no sufre, pero si la presentación. (AGRIOS, G.N. 1996. Fitopatología. Ed. Limusa, S.A. México. 838 pp.)

En el cultivo de Tomate, los síntomas pueden aparecer en cualquier parte de la planta y en cualquier estadio de desarrollo, pero los daños más importantes se presentan en plantas adultas. Hay que destacar, sin embargo, que el hongo puede atacar a plantines y causar su muerte luego del trasplante, especialmente si se entierran muy profundos en condiciones predisponentes para la enfermedad. En este caso, la infección proviene de los cotiledones secos y de allí desciende hacia el cuello de la planta rodeándolo de una necrosis parda que por último la estrangula y causa su muerte.

Más frecuentes son los síntomas de necrosis en flores, tallos, hojas y pecíolos de plantas adultas en invernáculo. La invasión en las hojas se produce en los puntos donde se depositan los pétalos infectados desprendidos de las flores; también pueden ayudar a la penetración del hongo restos de estambres y polen que actúan como fuente exógena de energía. Por supuesto las heridas, especialmente de podas mal hechas, actúan como puerta de infección. Las lesiones se van expandiendo progresivamente a partir del punto de entrada dando necrosis parda con anillos concéntricos, invadiendo a toda la hoja, pecíolo y tallo. En éste las lesiones pueden alcanzar

hasta 10 cm. De largo, rodeándolo y produciendo el marchitamiento de la planta por arriba de este punto.

La pudrición del fruto comienza por el cáliz o pistilo, muchas veces a partir de restos de pétalos que quedan adheridos a él, también heridas por insectos. Se produce una pudrición blanda, de rápido avance, color verde grisáceo, el hongo fructifica con alta humedad formando un micelio gris pardo.

Un síntoma característico pero poco frecuente, en los cultivos de tomate a campo, es la mancha fantasma la que aparece sobre frutos en condiciones de alta humedad y frío seguida por tiempo seco, el micelio que infecta no logra dar pudrición formando anillos blancos concéntricos de aproximadamente 8 mm. De diámetro, afectando solamente la calidad comercial del fruto. (Dal Bello, G.; Mónaco, C.; Ronco, L.; Larrán, S.2005. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. III. Página/s: 639. Hospedero: Tomate – Referencia: 104.)

2.4.4. OÍDIUM SP.

2.4.4.1. Características.-

El Oídio es un hongo externo, se desarrolla sobre la superficie, no penetra en las hojas, y por lo tanto, se puede atacar con fungicidas de forma curativa, una vez que ha infectado. Los demás hongos penetran en la hoja y los fungicidas sólo sirven para prevenir, para evitar que realicen la infección.

Su principal síntoma es el hecho de que las hojas se cubren, principalmente en la parte axial, con una capa algodonosa de micelio gris blancuzco a blanco en forma de estrella. En un ataque fuerte las hojas se ponen amarillas y posteriormente se secan

La mayoría de las veces su aparición está causada por abonos excesivamente cargados de nitrógeno, condiciones de poca luz, exceso de humedad, abuso de tratamientos químicos, o una mezcla de éstas causas. La pobreza genética también es una causa a tener en cuenta.

Figura 9
Vista Desde El Microscopio 10x Oídium



Fuente propia

2.4.4.2. Ciclo vegetativo del oídio.-

Las ascosporas el micelio se desarrolla sobre las plantas jóvenes y los conidióforos emiten conidias por infecciones en las hojas por conidias transportadas en el aire

Las cleistotecas se desarrollan en las hojas para el invierno pasan como el micelio y cleistotecas entre los restos de los cultivos y las siembras de otoño

Para primavera las conidias y ascosporas comienzan las infecciones y el desarrollo de las mismas

2.4.4.3. Síntomas y daños.-

El Oídio es un hongo que se diagnostica bien. Se manifiesta como polvo blanco o cenizo muy típico, en hojas, brotes y también en frutos. Las hojas y tallos atacados se vuelven de color amarillento y terminan por secarse. En la flor es menos frecuente.

Figura 10
Signos del oidium



Fuente propia

- Es una enfermedad muy común y que causa graves daños. En Rosal, por ejemplo, aparece año tras año.
- Son más sensibles al oídio el Rosal, Geranios, Dalias, etc...
- Las esporas del hongo son transportadas por el viento y caen sobre las hojas, germinando ahí introduciendo unas raicillas para absorber las sustancias nutritivas.
- Algunas plantas son más sensibles al Oídio, pero en general, casi todas pueden sufrir su ataque si se dan las condiciones favorables.
- Son muy sensibles el Rosal, Laurel real, Evónimo, Roble, Plátano de sombra, Árbol de Júpiter, Geranio, Dalia, Flox, Begonia, Hibisco, etc., por poner algunos ejemplos. El Melocotonero es el más vulnerable. En Albaricoquero, Cerezo y Ciruelo es menos grave.
- También los frutos se cubren de manchas blancas y redondeadas. Melocotones, Cerezas y Ciruelas así, dejan de ser comestibles.

(Manual de enfermedades de las plantas - Página 613 I. M. Smith – 1992)

2.4.4.4. Condiciones favorables.-

- Le favorece las primaveras muy húmedas (en torno al 70-80%) y temperatura suave.
- Desaparece en pleno verano, siempre que el termómetro pase de 35°C, para resurgir en otoño.
- No quieren agua líquida para su desarrollo, pero sí humedad. Se diseminan por el viento.
- Puede llegar a ser muy grave dependiendo de la zona. En fincas cercanas a un río la humedad es más alta y son más graves los ataques.
- Afecta más a las plantas más débiles y a las que estén a la sombra, de hecho, la ubicación de las plantas al sol puede ser suficiente para que desaparezca. Por ejemplo, los Evónimos a la sombra son muy atacados, pero puestos al sol, lo son mucho menos (<http://www.botanical-online.com/oidio.htm>)

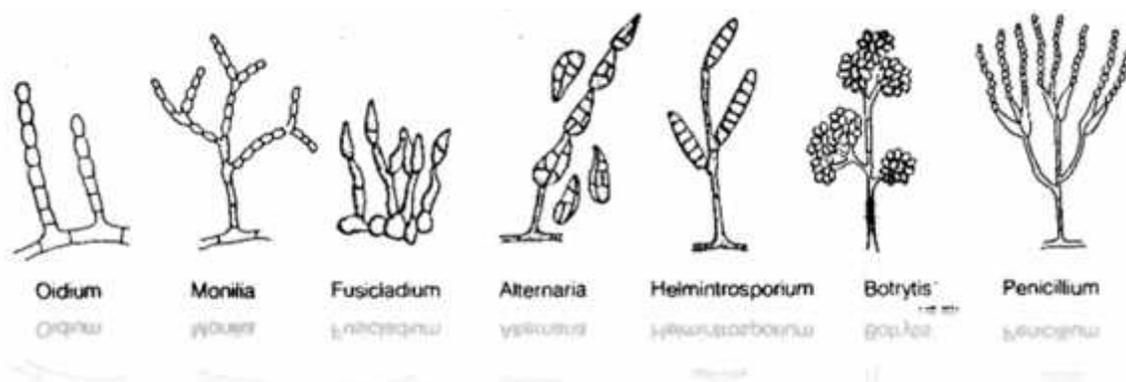
2.5. IDENTIFICACIÓN HONGOS FITOPATÓGENOS.-

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

Las características más importantes de los hongos que se utilizan para su identificación son sus esporas y cuerpos fructíferos (o estructuras portadoras de las esporas) 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 a la 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 en los cuerpos fructíferos que produzca en esos medios. En el caso de algunos hongos, permitan cultivar selectivamente solo a una determinada especie de hongo, permitiendo su rápida identificación.

Figura11
Morfología de los hongos



La forma, color, tamaño, y manera en que se disponen las esporas sobre los esporoforos o cuerpos fructíferos así como la forma, color, etc. de esas estructuras reproductoras, son características suficientes para sugerir cierta experiencia en taxonomía de hongos), la clase, orden, familia y género al cual pertenece un determinado hongo.

Una vez que se ha determinado el género al cual pertenece el cierto hongo, deben consultarse las descripciones específicas de las especie en monografías de los géneros de hongos (George N. Agrios 1996)

2.6. SINTOMAS QUE PRODUCEN LOS HONGOS EN LAS PLANTAS.-

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

- **Manchas foliares:** lesiones localizadas en las hojas de los hospedantes que constan de células muertas y colapsadas.
- **Tizón:** coloración café general y extremadamente rápida en las hojas, ramas, ramitas y órganos florales de una planta

- **Cancro:** herida localizada o lesión necrótica: con frecuencia sumida abajo la superficie del talo de una planta leñosa
- **Muerte descendente:** necrosis generalizada de las ramitas de las plantas que se inicia en sus puntas y avance hacia su base.
- **Pudrición de la raíz:** pudrición o desintegración de todo el sistema radical de una planta o parte de él (Fitopatología: Un Enfoque Agroecológico - Página 106 Luis Felipe Arauz Cavallini – 1998)

2.7. AISLAMIENTO DE HONGOS IN VITRO.-

Siempre que se debe aísla un hongo o bacteria patógena de los tejidos de una planta enferma, que se deben llevarse a cabo los siguientes procedimientos preliminares.

1.- Esterilización del material de cristalería, que incluye cajas Petri, tubos de ensayo, pipetas, mediante calor seco (de 150 a 160 ahora no puedes culparle la autoclave) o bien sumergidos ese material durante un minuto o más en una solución de ácido sulfúrico dicromato de potasio en cloruro mercurio 1:1000, en formalina al 5% o en alcohol etílico al 95%. Todo el material de cristalería que se trate químicamente debe enjuagar por lo menos tres veces en agua estéril.

2.- Preparación de soluciones para tratar la superficie del tejido infectado con el fin de eliminar o reducir notablemente los contaminantes de superficie que pudieran interferir con el aislamiento del patógeno. Estas soluciones se utilizan como un limpiador superficial, los compuestos esterilizantes de superficie que se utilizan con mayor frecuencia incluyen una solución de hipoclorito de sodio al 5,25%, la cual se utiliza para limpiar los tejidos infectados o para sumergir cortes de esos tejidos en ella.

Alcohol etílico al 95% el cual es suave y se utiliza para sumergir hojas durante 3 segundos o más Cloruro mercurio en la proporción de 1:1000 durante un periodo de 15 a 45 segundos.

Los tejidos deben secarse en un trozo de papel estéril sean tratados con las dos primeras soluciones, pero deben pasarse por tres cambios de agua estéril cuando sean tratados con las dos últimas soluciones.

3.- Preparación de los medios de cultivos en los que se desarrollaran los hongos y bacterias patógenos. Pueden utilizarse un número casi infinito de medios de cultivo para cultivar a las bacterias y hongos Fitopatógenos. Algunos de ellos son totalmente sintéticos hechos a base de cantidades conocidas de ciertos compuestos químicos y por lo común son bastantes específicos para ciertos patógenos. La mayoría de los medios de cultivo son la papadextrosa-agar (PDA), el cual es buenos para la mayoría de los hongos (pero no para todos) el agar-agua-glucosa (de 1 a 3% de glucosa en agar-agua) que se utiliza para separar algunos hongos (pythium y fusarium)de bacterias; y por último, el agar nutritivo, el cual contiene peptnona y extracto de carne y es útil para aislar las bacterias Fitopatógenos en cultivo de los hongos puede también separase las bacterias.

Los hongos también pueden separase de las bacterias añadiendo 1 o 2 gotas de una solución de ácido láctico al 25% (el cual inhibe el crecimiento de las bacterias) a 10ml de medio de cultivo antes de verterlo en las cajas de Petri. Las soluciones de medio de cultivo se las preparan en matraces que posteriormente se tapan y colocan en la autoclave a 120°C y a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Los medios esterilizados se los deja enfriar durante un cierto tiempo y posteriormente se vierten en cajas Petri, los tubos de ensayo u otros recipientes apropiados previamente estériles. En caso de que el medio de cultivo se le añada agar, deberá dejarse que este se solidifique para que el medio de cultivo pueda entonces ser utilizado para cultivar hongos y bacterias.

(Métodos de investigación fitopatológica - Página 154 Eduardo R. French, Teddy Theodore Hebert – 1980)

La mayoría de los medios de cultivo contiene un extracto de una fuente natural de carbohidratos y otros nutrientes, tal como la papa, harina demaíz, frijol,limao habas, o extracto de malta, a los que se añaden cantidades variables de agar para solidificar el medioy formar un gel en el que el patógeno se desarrollara y podrá ser observado .Los medios de cultivo que con mayor frecuencia se utilizan son papa-dextrosa-agar(PDA) , el cual es bueno para la mayoría de los hongos (pero no para todos) , el agar-agua o agar-glucosa (de 1 a 3% de glucosa en agar -agua) ,que se utiliza

para separar algunos hongos (*Pythium* y *Fusarium*) de bacterias; por último, el agar nutritivo, el cual contiene peptona y extracto de carne y es útil para aislar bacterias fitopatógenas.

Los medios de cultivo esterilizados se dejan enfriar durante cierto tiempo y posteriormente se vierten en cajas de Petri, tubos de ensayo u otros recipientes apropiados previamente estériles. En caso de que al medio se le añada agar, deberá que este último se solidifique para que el medio de cultivo pueda entonces ser utilizado para cultivar hongos o bacterias. El vacío del medio de cultivo en cajas de Petri, tubos de ensayo, etc., debe llevarse a cabo lo más asépticamente posible, ya sea en una sala de cultivo apartada o en una pieza limpia libre de corrientes del aire y polvo. En cualquiera de los casos, la mesa de trabajo debe limpiarse con una solución de Clorox al 10%, las manos de la persona deben estar limpias y el material de laboratorio, tal como escalpelos, pinzas o agujas deben sumergirse en alcohol y flamearse para impedir la introducción de microorganismos contaminantes.

Debe tenerse en cuenta que, de los distintos fitopatógenos, la mayoría de los hongos y las bacterias son los únicos organismos en los que todos sus miembros pueden crecer en medios de cultivo. Aun cuando la mayoría de los hongos se cultivan con facilidad en medios nutritivos, algunos de ellos tienen requerimientos exigentes y específicos, por lo cual no se desarrollan en la mayoría de los medios de cultivo comúnmente usados.

Los grupos de hongos (denominados *Eryphales*) que producen las cenicillas y los *Peronosporales* (que producen los mildius), se consideran parásitos obligados estrictos, debido a lo que no se han podido cultivar en medios de cultivo artificial. Hasta hace poco se pensaba también que el grupo de los Uredinales (a causa de las royas de las plantas) estaba constituido por parásitos obligados estrictos.

Sin embargo, hasta hace solo algunos años pudieron mantenerse en cultivo de algunas etapas del ciclo de vida de algunas royas al añadir algunos componentes a los medios de cultivo, lo cual permitió que esos hongos ya no fueran considerados como parásitos obligados aunque, de hecho en la naturaleza, se comportan como tales. Aunque hasta ahora ha sido imposible mantener en

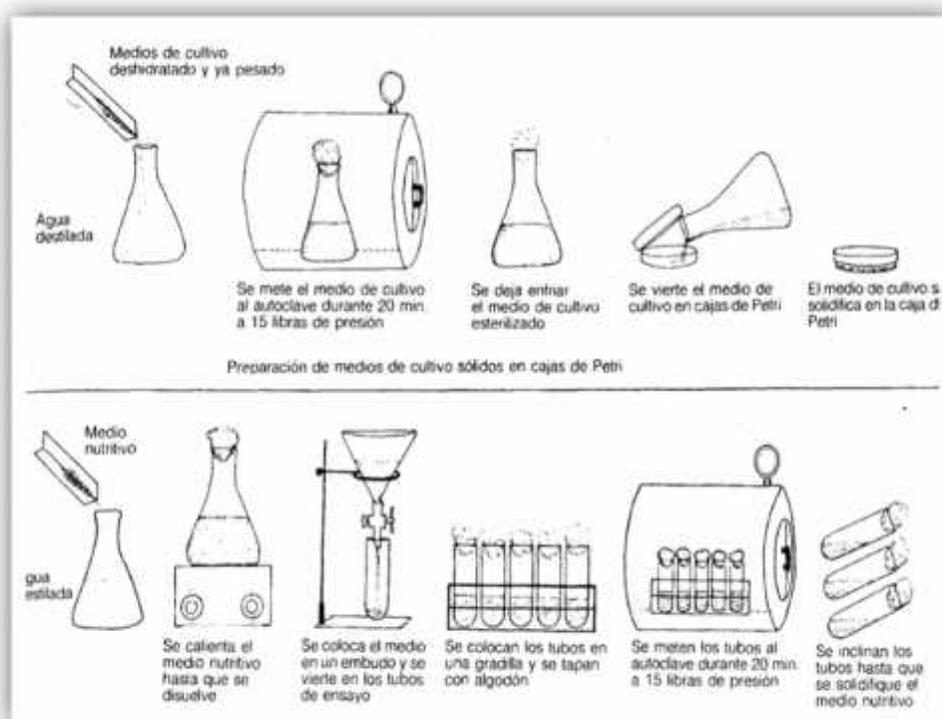
cultivo a las bacterias fastidiosas vasculares limitadas al floema y xilema de las plantas, cabe decir que se ha podido cultivar en medios nutritivos especiales complejos.

Del resto de los patógenos, solo algunos espiro plasmas se han podido crecer en medio de cultivo. Hasta ahora, no se ha podido mantener en medio de cultivos nutritivos ninguno de los 100 o más organismos semejantes a los micoplasmas, ni a los virus, nematodos o protozoarios, pero se espera que en breve se descubran otros medios para cultivar a los organismos semejantes a los micoplasmas.

(Fitopatología: Un Enfoque Agroecológico - Página 243 Luis Felipe Arauz Cavallini – 1998)

2.8. AISLAMIENTO DEL PATOGENO.-

Figura 12
Preparación De Medios De Cultivo Sólidos En Placas (Cajas De Petri)



(George N Agrios)

2.8.1. De Hojas:

En caso de que la infección de las hojas de una planta avance en forma de tizón o mancha foliar fungosa y en caso de que las esporas del hongo aparezcan sobre su superficie, algunas de esas deben depositarse sobre una caja de Petri que contenga medio de cultivo o bien deben recolectarse con la punta de una aguja estéril o un escalpelo y colocarse sobre la superficie del medio de cultivo. Si el hongo crece en un cultivo, al cabo de unos cuantos días aparecerán colonias de micelio aisladas debido a la germinación de las esporas. Estas se resembran en placas separadas y de esta forma se asegura que algunas de ellas contengan al patógeno libre de cualquier tipo de contaminante.

En ocasiones, el aislamiento del patógeno a partir de tizones y manchas foliares bacterianas o fungosas se logra mediante la esterilización superficial de la zona infectada con soluciones Clorox o de Rada, separando una pequeña porción del tejido infectado con un escalpelo estéril u otro objeto y colocándola en una caja de Petri que contenga un medio nutritivo.

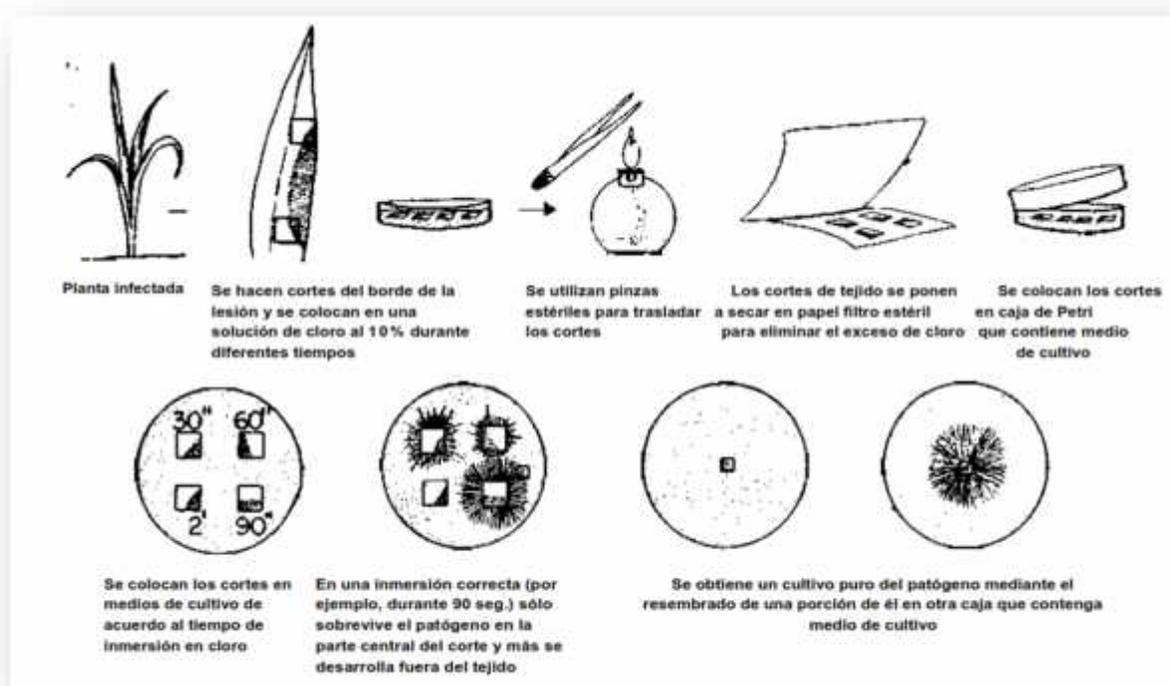
Sin embargo, el método más común para aislar a los patógenos de las hojas infectadas y de otros órganos de la planta es aquel en el que seleccionan varios cortes pequeños de 5 a 10 mm² a partir del borde de la lesión infectada, a fin de que contenga tejidos enfermos y tejidos al parecer sanos.

Esos cortes se colocan en una de las soluciones esterilizantes de superficie, lo cual asegura que estas superficies se humedezcan al cabo de 15 o 30 segundos los cortes se toman asépticamente uno por uno a intervalos regulares de tiempo (por ejemplo cada 10 o 15 segundos), a fin de cada uno de ellos se esterilice (a nivel de la superficie) a diferentes tiempos. Posteriormente, los cortes se secan con trozos limpios de papel estéril o se pasan por tres cambios con agua estéril, y por último se colocan por sobre el medio nutritivo (por lo común, de 3 a 5 por caja de Petri).

Los cortes esterilizados en su superficie durante menos tiempo generalmente contiene al patógeno y a varios contaminantes, mientras que los que se han esterilizados durante más tiempo no permiten el desarrollo de cualquier tipo de microorganismos debido a que han sido destruidos

por el esterilizante de superficie. Sin embargo, algunos de los cortes depositados en el esterilizante de superficies durante periodos intermedios permitirán que solo el patógenos se desarrolle y forme colonias puras en el cultivo, ya que ha permitido que el esterilizante actúe el tiempo suficiente para destruir a todos los contaminantes de superficie, pero no el tiempo necesario para destruir al patógeno, el cual se ha propagado desde el tejido enfermo hasta el tejido sano.

Figura 13
Aislamiento De Hongos Patógenos Del Tejido De Una Planta Infectada



(George N Agrios)

Posteriormente, las colonias del patógeno, se resiembran asépticamente para su posterior estudio. El hecho de que los cuerpos fructíferos del hongo (como es el caso de los picnidios y los peritecios) aparezcan sobre las hojas del hospedante, en ocasiones facilita su recolección y permite depositarlo durante varios segundos en el esterilizante de superficie, para más tarde sembrarlos en el medio del cultivo. Sin embargo, este procedimiento requiere de la mayor parte de la técnica se efectúe bajo el microscopio estereoscópico (binocular), debido a que los cuerpos fructíferos del hongo generalmente son demasiado pequeños para observarse y manipularse a simple vista.

Las estructuras reproductoras (después de haberlas tratado con un esterilizante de superficie) pueden también romperse en una pequeña gota de agua estéril y diluir después sus esporas en forma seriada en agua estéril contenida en cajas de Petri y en pequeños tubos de ensayo. Por último, algunas gotas de cada uno de los tubos de la dilución seriada se colocan en un medio nutritivo a fin de que se desarrollen en las colonias individuales libres de contaminantes a partir de las esporas que han germinado y que se han obtenido a partir de algunos de los tubos de dilución seriada.

El método de dilución seriada con frecuencia se utiliza para aislar bacterias patógenas de tejidos enfermos contaminados por otras bacterias. Después de haber efectuado la esterilización superficial de los cortes de tejidos enfermos a nivel del margen de la infección, los cortes se muelen asépticamente (pero con bastante cuidado) en un pequeño volumen de agua estéril y posteriormente parte de este homogenizado se diluye serialmente en volúmenes iguales o diez veces más el volumen del agua inicial. Por último, las placas con agar nutritivo se siembran con un asa que ha sido mojada en cada una de las distintas diluciones seriadas, a fin de que en ellas se desarrollen colonias individuales de la bacteria patógena a partir de las diluciones más altas que todavía contengan bacterias.

2.8.2. De tallos, frutos y otros órganos aéreos de la planta.-

La mayoría de los métodos que se han descrito para aislar bacterias y hongos patógenos de las hojas, pueden también utilizarse para aislar esos mismos patógenos de las infecciones superficiales de los tejidos mencionados.

Sin embargo, aparte de esos métodos, los patógenos con frecuencia pueden aislarse fácilmente de tallos, frutos y otros órganos que han sido infectados (aun cuando hayan penetrado profundamente en ellos) al cortar el tallo de la planta o al separar el fruto del lado sano para después separarlos de la zona infectada, exponiendo así los tejidos que antes no se encontraban expuestos a los contaminantes y que anteriormente no habían sido cortados o manipulados y que, por lo tanto, no estaban contaminados.

Finalmente deben hacer se pequeños cortes del tejido a partir de la zona carnosa expuesta del foco de infección mediante un escalpelo flameado para después colocarlos directamente en el medio del cultivo.

2.8.3. De raíces, tubérculos, raíces carnosas y frutos de hortalizas que se encuentran en contacto con el suelo.-

El aislamiento de los patógenos de cualquier tejido vegetal enfermo que se encuentre en contacto con el suelo, presenta una serie de problemas adicionales que ocasionan numerosos organismos saprofitos que invaden al tejido después de que ha sido destruido por el patógeno. Es por esta razón que debe tenerse en cuenta que, en primer término, el aislamiento de un patógeno implica el lavado repetido de los tejidos enfermos a fin de quitarles toda la tierra y la mayor parte del tejido vegetal descompuesto y descubierto, en el cual la mayoría de los organismos saprofitos se encuentran presentes.

En caso de que la raíz infectada sea pequeña, debe limpiarse minuciosamente y todos los patógenos que contengan deben aislarse de ella mediante cualquiera de los métodos descritos para aislar los patógenos de las hojas

Si en aislamiento se efectúa de raíces carnosas u otros tejidos carnosos y la penetración del patógeno en ello se producen solo lesiones ligeras y superficiales, la tierra que se encuentran impregnada en el tejido debe separarse y deben colocarse en una solución de Clorox o de Rada varios cortes de tejido obtenidos del borde de las lesiones. Si el patógeno ha penetrado profundamente en el tejido sano, puede usarse el método descrito anteriormente para tallos y frutos, que consiste en desgarrar los especímenes primero por la parte sana y después por la zona infectada, tomando porciones de tejido del borde de la pudrición (la cual no ha sido expuesta), y colocarlos directamente en el medio de cultivo .

(George N. Agrios 1996)

2.9. MICRO PROPAGACIÓN DE HONGOS IN VITRO.-

Los Sigüientes Puntos Constituyen La Metodología A Seguir Para Inocular Hongos In Vitro:

1. Para llevar a cabo la muestra se realizó con la técnica:
 - Recolecta De Muestras en el departamento de Tarija de los cuatro hongos a estudiar *fusarium*, *alternaría*, *botrytis*, *oidium*.
2. Las muestras son explantos previamente infectadas por un hongo al cual debemos proceder a la PREPARACIÓN DE PDA en cuartos de asepsia libre de agentes saprofitos y antagónicos en la Cabina de flujo laminar.
3. En el laboratorio de Fitopatología vegetal de la UAJMS, se realizara el diagnóstico y aislamiento y purificación de los hongos en estudio, obteniendo cepas monosporicas.

III. MATERIALES Y METODOS.-

3.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO.-

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho” ubicado en el departamento de Tarija, Provincia Cercado, zona El Tejar.

3.2. MATERIALES.-

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.-

El material vegetal que se utilizó para el presente trabajo de investigación son cepas de *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Botrytis sp* y *Oidium sp*. Que son aisladas, purificadas e identificadas en el Laboratorio.

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO.-

A. Recolección de muestras:

- Toallas de papel
- Bolsas de papel
- Rótulos para identificar el material

B. Área de Preparación:

- | | |
|------------------------|--------------|
| • Cajas Petri | 144 unidades |
| • Balanza de precisión | |
| • Potenciómetro | |
| • Pipetas | 20 ml |
| • Erlenmeyer | 12 unidades |
| • Batidor imantado | |
| • Papas partidas | 600 gr |
| • Dextrosa (glucosa) | 60 gr |
| • Agar | 54 gr |
| • Cloranfenicol | 1500 mg |
| • Agua destilada | 3000 ml |

C. Área de esterilización:

- Autoclave
- Estufa de esterilización para el material in vitro
- Hipoclorito de sodio
- Alcohol 70%

D. Área de siembra:

- Cámara de flujo laminar
- Mechero
- Pinzas
- Agujas
- Bisturís
- Tijeras
- Estereoscopio
- Microscopio
- Bisturí
- Agua destilada
- Vaso precipitado
- Cinta adhesiva
- Papel filtro
- Batidor de imán

E. Área de crecimiento

- Incubadora

3.3. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS.-**3.3.1. Clima.-**

Sobre la llanura fluvio-lacustre de la parte central de la provincia Cercado entre los 1001 a 2000 msnm.

3.3.2. Temperatura.-

De acuerdo a los datos obtenidos de las 9 estaciones climatológicas que se hallan en la provincia la temperatura media anual de 1.4° C, la máxima media de 25.5° C, mínima de 9.4° C, se tiene en verano extrema máxima de 39.4° C, y extrema mínima de invierno de -8.6° C.

3.3.3. Precipitación.-

Dentro de las precipitaciones en la provincia Cercado, oscilan entre los 800 a 1100 mm.

3.3.4. Humedad.-

La humedad relativa califica de moderada, con un promedio de 62 por ciento, sobrepasando el 60 por ciento durante los meses de diciembre a abril. Una de las características interesantes con respecto a la humedad es la presencia de masas de aire húmedo y frío (surazos) en algunos días de la estación de invierno que acompañados de vientos, dan origen a una sensación térmica diferente a la observada en los termómetros.

3.3.5. Suelo.-

Las tierras de uso agrícola bajo riego corresponden a tierras aprovechadas para agricultura intensiva. Las principales características de esta unidad son la sobre utilización y parcelación. Son suelos de mediana a baja fertilidad.

El sobre pastoreo, debido a la actividad pecuaria sin manejo adecuado, en conjunto con la extracción selectiva de las especies leñosas y arbóreas, es posiblemente el factor causante de la erosión antrópica más importante en la zona.

La capa superficial de 0 – 20 cm pardo arenoso expone una textura moderadamente gruesa, estructura blocosa débil, media fina, no adherente y no plástico en mojado, friable en húmedo, ligeramente en seco, pocos poros finos, El PH es neutro a suavemente alcalino de 6.4.

La sección de 20 – 90 cm. es franco arcilloso presenta una textura moderadamente fina, media a gruesa, adherente y plástico en mojado, firme en húmedo, muy duro en seco, pocos poros fino y muy finos con in PH de 7.2.

3.4. METODOLOGIA.-

3.4.1. Recolección de Muestras.-

Se recolectó las muestras de campo de tomate y frutilla, según el análisis presuntivo hecho en campo, considerando los síntomas que presentan cada tipo de hongo.

En el caso del fusarium se tomaron frutos y parte de tallos infección, se colocó la muestra con algodón para que amortigüe los golpes y estar recubiertos de papel para que no se deteriore al llevarlo al laboratorio, esto se hizo según la metodología que tiene la institución SENASA.

La recolección de muestras del hongo Fito patógeno botrytis, según el análisis presuntivo se tomó el fruto del tomate infectado, luego se procedió a acondicionar con algodón y papel.

Para la recolección de la alternaría en campo se recogió partes de hojas y frutos infectados, se colocó en una bolsa de polietileno sellada evitando que esta pierda la humedad que tiene según la metodología al perder estas la humedad y secarse dificulta la proliferación del hongo, impidiendo el desarrollo de este se debe mantener a una temperatura 4 a 7°C y en lugares húmedos.

Se recoleto hojas jóvenes en estado inicial o intermedio de la enfermedad, las hojas daños avanzados no sirven para el ensayo.

No se mezcló las muestras de diferente naturaleza en el mismo recipiente. Por ejemplo, al mezclar raíces con hojas o con frutos en una misma bolsa, la humedad del suelo y raíces causan la pudrición de las partes aéreas.

Se llevó muestras de plantas con raíces, se sacudió el exceso de suelo de las mismas, dejando solo lo suficiente para mantenerlas con alguna humedad natural hasta su arribo al laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales.

- a) **Toallas de papel.-** Las pruebas de tejido de tomate infectado, (hojas o tallos) que se colectó se envuelve en una toalla de papel que sirve, además, para absorber su humedad.
- b) **Bolsas de papel.-** Las muestras de tejido infectado se envolvió en papel absorbente No se usó bolsas plásticas porque no son porosas y contribuyen, por ello, a la acumulación de humedad en su interior; esta humedad favorece el crecimiento de microorganismos

sapofitos, los cuales dificultan el aislamiento del patógeno que se hace partiendo de tejidos.

c) **Rótulos para marcar las muestras.-** se identificó claramente la muestra con la información de donde se extrajo la demostración, fecha y la enfermedad que según nuestro análisis presuntivo determino.

d) **Pasos del proceso.**

• **Paso 1**

Se tomó una evidencia de la parte de la planta enferma (hojas, fruto o tallos) que presente los síntomas causados por el patógeno

• **Paso 2**

Procedió a envolver la señal en una toalla de papel, colocarlo en una bolsa de papel y se adhirió a ésta el rótulo que corresponda para que esta esté bien organizado una vez en laboratorio.

• **Paso 3**

Se llevó la muestra a laboratorio, donde se hizo la identificación y posteriormente el aislamiento de cada uno de los hongos estudiados.

3.4.2. Propóleos para la elaboración del Trabajo.-

Los propóleos se adquirieron del apiario de las provincia de Uriondo, Chocloca centro experimental de la Universidad Juan Misael Saracho, preparados por la ingeniera Roxana de Ahuanta, estos son comercializados en la región donde se elaboran y en la provincia Cercado de Tarija.

Los mismos que son elaborados de la siguiente manera:

- Se pesaron 30 g de los propóleos crudos que se sometieron a extracción exhaustiva con etanol 96% (3 mL × 100 mL, en un agitador magnético, durante 48h, a temperatura ambiente y en oscuridad).

- Luego, el material se filtró en un embudo con papel de filtro núm. 1. A los filtrados combinados se les eliminaron las ceras mediante precipitación y filtración, previa adición de 50 mL de agua destilada y refrigeración del extracto a -12 °C.
- Posteriormente, se evaporó el solvente de los filtrados por destilación al vacío en un rotoevaporador a presión reducida y temperatura de 40 °C. Los extractos etanólicos se almacenaron en viales ámbar refrigerados a -12 °C hasta su evaluación.
- Mediante el enfriamiento a -20 °C y centrifugación de la disolución etanólica se logró un refinamiento del extracto debido a la precipitación de las ceras, las cuales son insolubles en agua y en el solvente de extracción (etanol 96%) a bajas temperaturas.
- Características físico químicas de la elaboración del propóleo:
 - Cenizas: Una porción de muestra (100 g) fue calcinada en mufla a 500 °C, y llevada a peso constante.
 - Humedad: Método termo gravimétrico, consiste en secar una porción de muestra de 100 g en estufa a 105 °C ± 2 °C, hasta peso constante.
 - Posteriormente, el solvente fue destilado y secado el extracto en estufa a 105 °C hasta peso constante.
 - Posteriormente, se destiló el alcohol a presión reducida, y la resina obtenida se secó en estufa a 105 °C hasta peso constante. Se define un contenido mínimo del 30%.
 - Material insoluble: después de la extracción con etanol, el residuo remanente en el dedal se secó en estufa a 40 °C hasta peso constante.

3.4.3. Cámaras Húmeda.-

A partir de las muestras que se obtuvo en campo, se extrajo partes de tejido infestado representativos cortándolo con la ayuda de un bisturí y de una pinza.

Se pasó a colocar papel filtro en la base de la caja Petri, esto para que la humedad que se tiene se mantenga lo suficiente para humedecer el papel, luego que se colocó la muestras se cerró la caja con su tapa superior.

Se dejó en incubación en cámaras húmedas a temperatura ambiente, hasta el desarrollo del hongo, para su posterior identificación y aislamiento siguiente.

El hongo muestra signos de desarrollo del micelio a los 3 a 4 días de haber colocado en cámaras húmedas.

3.4.4. Asepsia.-

Se mantuvo el cuidado en la limpieza del material y laboratorio mismo que es fundamental para realizar el trabajo más confiable.

El medio ambiente se encuentra por lo general cargado de microorganismos diversos que pueden contaminar el ámbito de trabajo por ello no se descuidó la limpieza de los materiales, instrumentos y equipo necesario para el trabajo.

Los materiales de vidrio y cualquier otro elemento se lavaron y secaron, para luego envolverlos en papel periódico y desinfectarlos en horno a 150C°.

3.4.5. Lavado.-

Durante el trabajo de tesis en el lavado del material de vidrio se enjuagó dos veces con agua destilada, todo esto para eliminar todo residuo de detergente antes de ser esterilizado.

3.4.6. Esterilización.-

La forma de esterilización por medio de calor seco o húmedo fueron las que se utilizó en el trabajo de tesis.

La esterilización por calor seco se consiguió con el uso del horno o estufa.

Se envolvió los materiales de vidrio en papel periódico como las cajas Petri, matraces, tubos de ensayos, también se envolvió los materiales de metal como el porta bisturí, los sacabocados.

Se expuso a una temperatura de 150C en 120 minutos.

La esterilización por presión de vapor de agua se lo hizo en la autoclave, fundamento de la autoclave es que a mayor presión existe mayor temperatura de ebullición del agua, el tiempo es el factor que permite que el calor penetre en la masa de esterilización y se absorba.

Se esterilizo los medios de cultivo en matraces, se tapó con algodón para permitir la circulación del vapor también se esterilizo los palillos colocándolos en frascos.

3.4.7. Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento en estufa).-

El alcohol es utilizado para desinfectar la cámara de flujo laminar así como de las superficies de trabajo, se desinfecto todo antes de proceder, como las manos se deben empapar en alcohol y colocarse los guantes quirúrgicos también se desinfecto la cámara de flujo laminar cada vez que se usó.

La estufa no se abrió con mucha frecuencia esto para controlar la temperatura ambiente siempre que esté en los 22C.

3.5. IDENTIFICACIÓN.-

3.5.1. Por observación directa.-

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

Según los análisis presuntivos se observó en el estereoscopio sus estructuras una vez que se haya manifestado el micelio del hongo puesto en las cámaras húmedas.

Se pudo reconocer el hongo oídium en el estereoscopio de una muestra traída de campo el cual aprueba que estuvo solo presente el hongo oídium como se ve en la figura 14.

Figura 14
Oídium en hoja de papa



Fuente propia

Muchas veces es posible identificar con seguridad al hongo de una determinada enfermedad por observación directa de los síntomas y/ o signos en los órganos afectados como en el caso de la botrytis se identificó en observación directa de una muestra de fruto traída de campo puesta en cámaras húmeda observado en el estereoscopio como vemos en la figura 15.

Figura 15
Botrytis en fruto de tomate



Fuente propia

3.5.2. Cultivándolo en medios sintético.-

Este método es en general el más sencillo y solo para algunas especies puede llegar a ser muy laborioso esto depende de los requerimientos nutricionales de cada especie en particular así de cómo sus exigencias en cuanto a los otros factores que intervienen en su desarrollo de las esporas y micelio. La base de este sistema de identificación de hongos Fitopatógenos se hizo los medios sólidos.

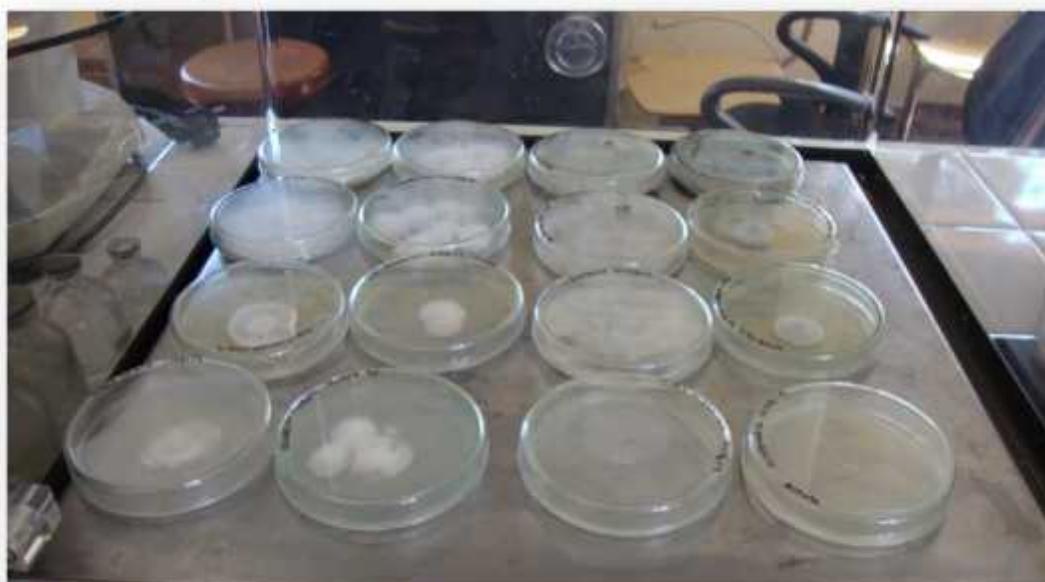
Para la identificación precisa de los hongos que causan enfermedades en las plantas, se obtuvo sus cuerpos fructíferos, su forma, números de esporas que contienen.

Se identificó la *alternaria* sp, *botrytis* sp, *fusarium* sp, cultivándola en medio de cultivo (PDA) básico por 14 a 10 días a temperatura condicionada de 22C observando las esporas de los hongos se logró identificar los 3 hongos según las claves como se muestra en las figura 16 cultivadas en medios de PDA.

El procedimiento de identificación se hizo las veces que sea necesario hasta obtener el hongo que tenga esporas representativas.

Figura 16

Hongos cultivados en medios PDA para su aislamiento



Fuente propia

3.6. MEDIO DE CULTIVO.-

El medio preparado en el ensayo es el agar papa dextrosa el cual la mayoría de los hongos se desarrolla.

La preparación de los medios de cultivo presenta distintos grados de complejidad.

3.6.1. Metodología.-

- 1: Se peló las papas y luego se las partió en cuadritos, se puso a calentar para que se desprendan el almidón que contienen ya que este nos sirve para el medio.
- 2: En otro recipiente se disolvió el agar, se calentó para ayudar que este se disuelva mejor
- 3: Se coló el caldo de papa a través de 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 se homogenice.
- 4: Se dividió la sustancia preparada en matraces de 250 ml, se tapó los matraces con tapón de algodón.

Figura 17
Colocando las dosis en los matraces



Fuente propia

5: esterilizando los matraces en la autoclave u olla de presión de 15-20 libras/pulgadas (120C durante 20 minutos) contando a partir del momento en que se alcanza la presión esperada.

Figura 18
Colocando los medios de cultivo a esterilizar en la autoclave



Fuente propia

6: una vez obtenida la presión esperada se abrió la autoclave hasta que baje la presión a cero. Dejando enfriar el medio al contacto del aire, una vez tibio se vació a cajas de Petri en condiciones asépticas logrando esto solo en la cámara de flujo laminar con la ayuda de un mechero se flameo la caja de Petri esto para evitar la entrada de microorganismos.

7: No se movió las cajas de Petri hasta que solidifiquen, la ventajas que ofrecen de la caja de Petri es la mayor superficie para el desarrollo del hongo.

3.7. AISLAMIENTO.-

El aislamiento consiste en el proceso de separación de microorganismo a partir de sus sustratos naturales (plantas) o de otras sustancias para hacerles crecer en un medio de cultivo artificial puras.

Las técnicas para aislar hongos son diversas y dependen del hongo a estudiar, en este caso utilizamos la técnica de George N Agrios.

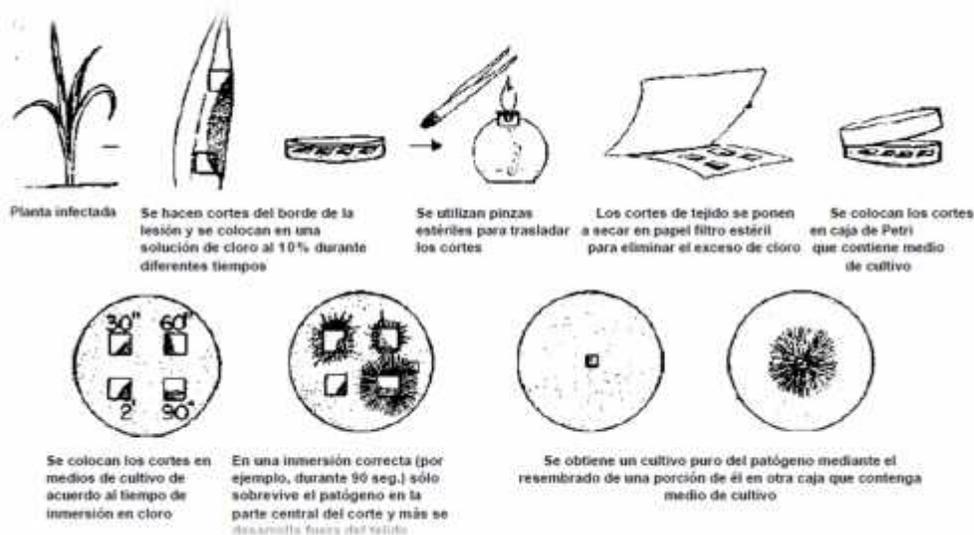
3.7.1. INDUCCIÓN AL DESARROLLO MICELIAR.-

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

3.7.1.1. 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 cortando con un bisturí.
- 3:** 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 a 30 segundos en la mezcla.
- 4:** luego se sumergió luego en alcohol etílico al 70% por un periodo de 20 segundos, no se debe usar alcohol al 95% porque es muy peligroso por su flameabilidad.
- 5:** Se enjuago los explantos en 3 vasos de agua destilada estéril y se secó en papel
- 6:** se colocó 4 a 5 explantos alrededor de la caja de Petri con PDA, luego se selló la caja con cinta parafina para evitar la contaminación.
- 7:** luego se colocó en la incubadora la cual mantiene a los hongos a una temperatura constante de 20 a 25 C. (Agrios GN 2007 Fitopatología LIMUSA México 285-290p.)

Figura 19
Aislamiento del inducción al desarrollo miceliar



(George N Agrios)

3.8. MULTIPLICACIÓN DE LAS CEPAS.-

3.8.1. Cultivos Monosporicos.-

Para establecer una serie de hongos puros es necesario a partir de aislamiento 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.

3.8.1.1. Procedimiento.-

a) Método De Dilución.-

- Con una aza pequeña de platino de más de 2 pulgadas de largo en el vástago, se preparó una caja de Petri con PDA.
- Luego se depositó 5 gotas de agua destilada y esterilizada en una caja de Petri.
- Luego se localizó las esporas de la colonia, con abundante esporulación luego del aislamiento
- Bajo el microscopio estereoscópico desprenda las esporas con la punta del asa mojada en unas gotas de agua en la caja Petri.
- Se diluyó la suspensión transfiriendo de gota a gota el contenido en una sola asa.

- Luego se pasó a examinar las gotas de agua en el microscopio a bajo poder a fin de localizar una gota con una cantidad mediana de esporas en suspensión.
- Con el asa se transfirió parte de la suspensión de la gota seleccionada al centro de otra caja de Petri esterilizada.
- Se disolvió y enfrió el agar agua contenido en un tubo de ensayo sobre la gota localizada en el centro de la caja de Petri

b) Método De Raya.-

- Una vez que el PDA contenido en las cajas de Petri se haya solidificado tomamos un asa recta y una aguja $\frac{1}{2}$ cm de la punta. Se esterilizo la aguja a la en la llama del mechero y se recogió las esporas simplemente frotando la aguja con las estructuras del hongo.
- Se pasó a observar por el microscopio estereoscopio y localizó una espora que esté completamente aislada de las demás.
- Recogimos con un pedazo de agar y procedimos de nuevo al método anterior esto se repitió hasta conseguir un cultivo puro.
- Se necesita 4 días como mínimo para que el hongo empezar a desarrollar.

Figura 20
Método de la raya



Fuente propia

3.9. SIEMBRA DE BIOENSAYOS DE HONGOS.-

- a)** Se envolvió material como las cajas, pinzas, sacabocado, porta bisturí con papel periódico se metió en el horno a 150C durante 2 horas, las cajas se deben devolver en dos según metodología.
- b)** Se preparó 250 ml por tratamiento de medio de cultivo APD (agar papa dextrosa) en los matraces se rotulo para no confundir las dosis.
- c)** En el tratamiento del testigo no se incluyó ninguna dosis de propóleo, en el tratamiento dosis T1 se incluyó en el medio 1,25ml de propóleo con la ayuda de una pipeta de capacidad 5ml, en el T2 se añadió 2,50 ml de propóleos, en el tratamiento T3 se añadió 5ml.
- d)** Se implantó en medios de cultivo PDA (Agar de Papa Dextrosa) explantos de 0.3cm de diámetro con la ayuda de un sacabocado se colocó en las cajas Petri de las cepas aisladas de fusarium, alternaría, botrytis, oidium.
- e)** Una vez desinfectado se sacó dejando enfriar para que esta solidifique en la cámara de flujo laminar, se escogen cajas de Petri que ya hayamos asilado y se las identifica en el estereoscopio donde están las esporas más desarrolladas con la ayuda de un sacabocados que tiene de diámetro interior 3mm, se sacó un explanto del hongo y se sembró en medio de la caja vacía solo con PDA (agar papa dextrosa)
- f)** Rotulando todas las cajas con la fecha el tratamiento y la repetición y el hongo a estudiar ejemplo: (08/10/14) testigo R2 fusarium. Luego se selló con parafina para que no se contamine con los microorganismos del ambiente.
- g)** Una vez realizado todo el procedimiento previsto se llevó todas las cajas de Petri a la cámara de crecimiento y dejando que mantenga la temperatura a 22C
- h)** Haciendo cada 24 horas la medición del diámetro del crecimiento del micelio.

3.9.1.1. Aplicación del Propóleo.-

La aplicación de las dosis de propóleo se lo realizara, conjuntamente con la preparación de los medios de cultivo. Las dosis a usar están en base a concentraciones preestablecidas en ensayos materializados. Las dosis establecidas son: 0% 0,5%, 1%, 2%.

Figura 21
Dosificando el propóleo en los matraces



3.10. SIEMBRA DE BIOENSAYO EN PLANTAS DE LA FAMILIA SOLANÁCEAS.-

Se realizó pruebas de control con las dosis de propóleo en un bioensayos para esto se utilizó 3 plantas por hongo estudiado esto se hizo en el laboratorio de fitopatología de la universidad Juan Misael Saracho en macetas medianas.

En el cultivo de la papa de la variedad marcela, se enfermó con el método del raspado de las hojas y tallos el cual se raspo suave con la ayuda de un bisturí en el envés y en otras en el haz, las muestras traídas e identificadas en el estereoscopio en el caso del oídium se froto las partes afectadas en las hoja de la papa raspadas como así también en el tallo.

Se hizo en tomate también el hongo botrytis se inoculo por el método del raspado, se raspo de igual manera que la papa solo que de los hongos aislados en las cajas Petri se pasó a alzar con un bisturí y colocar en la parte raspada de la hoja para que este entre por los estomas de las hojas.

Para la alternaría ya que ataca a las hojas y frutos se hizo el mismo procedimiento anterior a los otros hongos

En el caso del fusarium se hizo el mismo procedimiento que la anterior solo que aquí también se utilizó una aguja de insulina que se empató total con el hongo fusarium que se introdujo suavemente en el tallo tratando de no dañar demasiado a la planta.

Se utilizó la fórmula de ogawa(1986) siendo expresada en porcentaje de acuerdo a la selección a los 7 días se muestreo todos los bioensayos

Porcentaje de incidencia

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

Con esta fórmula se midió los porcentajes de incidencia y el porcentaje de inhibición a los 7 dias

Porcentaje de inhibición

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

3.10.1.1. Conteo De Esporas.-

Se realizó con el préstamo del laboratorio de bioquímica un hematocimetro o cámara de Neubauer, el cual tiene 1ml cuadrado de área, tiene el área toda cuadrículada por lo que se utiliza para medir los glóbulos de la sangre.

En la cámara de flujo laminar con la ayuda de un sacabocados de diámetro 5cm, se sacó muestras de cada una de las cajas evaluadas y medidas para pasarlas en 20ml de agua destilada, se licuo toda la muestra con la ayuda de una batidora especial para homogenizar la prueba, esto se efectuó para todas las evidencias por separado tratando de evitar la contaminación, una vez

preparada la demostración con la ayuda de una micro pipeta se sacó una muestra de 12 micromilitros colocando en las dos partes de la cámara de Neubauer, se realizó 4 conteos de la mismo tratamiento y hongo en el microscopio con un aumento de 10x, este conteo se cumplió a los 21 días de la inoculación del hongo.

Figura 23
Vista del microscopio de la cámara de Neubauer con 10x aumento



Fuente propia

3.11. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO.-

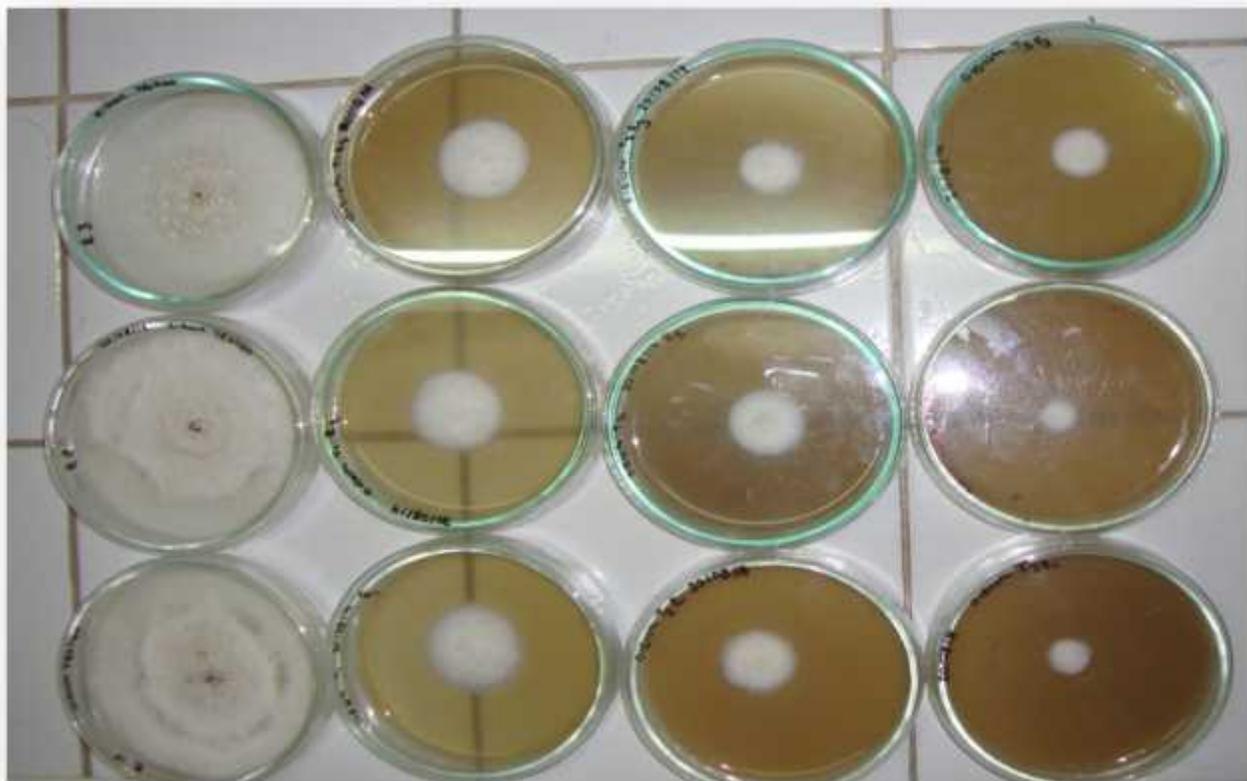
En cajas Petri estériles de 93mm de diámetro se adicionaron 20 ml de medio de cultivo PDA esterilizado a 121 °C por 15 minutos.

Se preparó el medio de cultivo con las dosis de propóleo añadiendo 0ml – 0%, 1,25ml - 0,5%, 2,5ml – 1%, 5ml – 2% del extracto del propóleos y se dejó gelificar a temperatura ambiente.

Seguidamente, se colocó el inóculo del hongo en discos de 3 mm de diámetro, en el punto medio de cada caja Petri con la ayuda de un sacabocado haciendo esto para los tres hongos aislados siempre desinfectando cada vez que se cambie de hongo.

Las placas se incubaron 21 días a 22 °C y se midió el diámetro micelio con la ayuda de un vernier en milímetros cada 24 h a partir del segundo día. Se efectuaron los controles absoluto y solvente.

Figura 24
Actividad Antifúngica del propóleo



Fuente propia

3.12. EVALUACIÓN.-

Se midió el porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Diámetro micelio testigo} - \text{diámetro de micelio tratamiento}}{\text{Diámetro de micelio testigo}} * 100$$

Se sacó los resultados y se los tabulo en una gráfica representativa

El conteo de esporas se midió mediante la siguiente fórmula:

Conteo realizado x 100 x volumen = al nro. de esporas en la cámara de Neubauer.

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 factorial de acuerdo al siguiente orden:

Factor A: 4cepas de hongos

Factor B: 4dosis de propóleos en medios de cultivo (0,0%, 0,5%, 1,0%, 3,0%)

Nº de repeticiones: 3

Nº de tratamientos: 16

Unidad experimental: 3cajas Petri

Total de unidades experimentales: 48 (144 cajas Petri)

Diseño completamente al azar con arreglo factorial

Factor A: cepas de los hongos fusarium=1, Alternaría=2, oídium=3, botrytis=4

Factor B: 4 dosis de propóleos en medios de cultivo (**0=1, 0.5%=2, 1%=3, 3%=4**)

3.12.1. Variables a evaluar.-

- El diámetro del crecimiento del micelio (5, 14 y 21 días).
- El porcentaje de inhibición de crecimiento (5, 14 y 21 días).
- El número de conidios a los 21 días después de la inoculación.
- Se realizará un registro fotográfico a detalle de todos los procesos a desarrollo.
- En bioensayos en plantas de la familia solanáceas (incidencia).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.-

4.1. RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL PROPÓLEOS.-

4.1.1. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.-

Se tomó los datos a los 5, 14 y 21 días que son los más representativos para todos los hongos estudiados hizo tres réplicas de los hongos fusarium, alternaría, botrytis, oídium.

4.1.2. INHIBICIÓN EN EL DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DE LOS HONGOS.-

Cuadro 5
Repetición 1 Medición a los 5 días

TRATAM./REP		I	II	III	Σ	X
Oídium O	D0O	2	2,1	2,2	6,3	2,10
	D1O	1,8	1,9	1,8	5,5	1,83
	D2O	0,8	0,9	0,7	2,4	0,80
	D3O	0,4	0,4	0,4	1,2	0,40
Fusarium F	D0F	1,5	1,6	1,8	4,9	1,63
	D1F	0,9	1	0,8	2,7	0,90
	D2F	0,7	0,6	0,6	1,9	0,63
	D3F	0,3	0,4	0,3	1	0,33
Botrytis B	D0B	3,5	3,2	3,3	10	3,33
	D1B	1,5	1,6	1,4	4,5	1,50
	D2B	0,7	0,8	0,9	2,4	0,80
	D3B	0,3	0,3	0,3	0,9	0,30
Alternaría A	D0A	1,5	1,7	1,6	4,8	1,60
	D1A	0,8	0,9	1	2,7	0,90
	D2A	0,6	0,5	0,7	1,8	0,60
	D3A	0,3	0,3	0,3	0,9	0,30
Σ	ΣBlog.	17,6	18,2	18,1	53,9	1,12

Se observa que el mayor crecimiento en el oídium en el testigo con 2,10 cm de diámetro y una mínima de 0,40cm de diámetro.

En el caso de la botrytis el testigo expreso un crecimiento medio de 3,33cm y una mínima de 0,30cm, la alternaría se observó un crecimiento máximo en el testigo con 1,60cm y una mínima de 0,30 cm en la dosis D3 con un contenido de 5mlde propóleo.

Cuadro 6
Repetición 1 TABLA DE ANOVA a los 5 días

Fv	Gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	DF
TOTAL	47	31,2			1,8	2,33	
BLOQUES	2	0,0	0,0	0,1	3,35	5,49	NS
TRATA	15	29,3	2,0	32,6	2,08	2,83	**
ERROR	30	1,8	0,1		1,88	2,33	
Fact. hongos	4	245,6	61,4	1022,0	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3	22,9	7,6	127,2	2,96	4,69	**
hongos/dosis	12	239,2	19,9	331,7	2,96	4,6	NS
CV							11,6720644

Elaboración propia

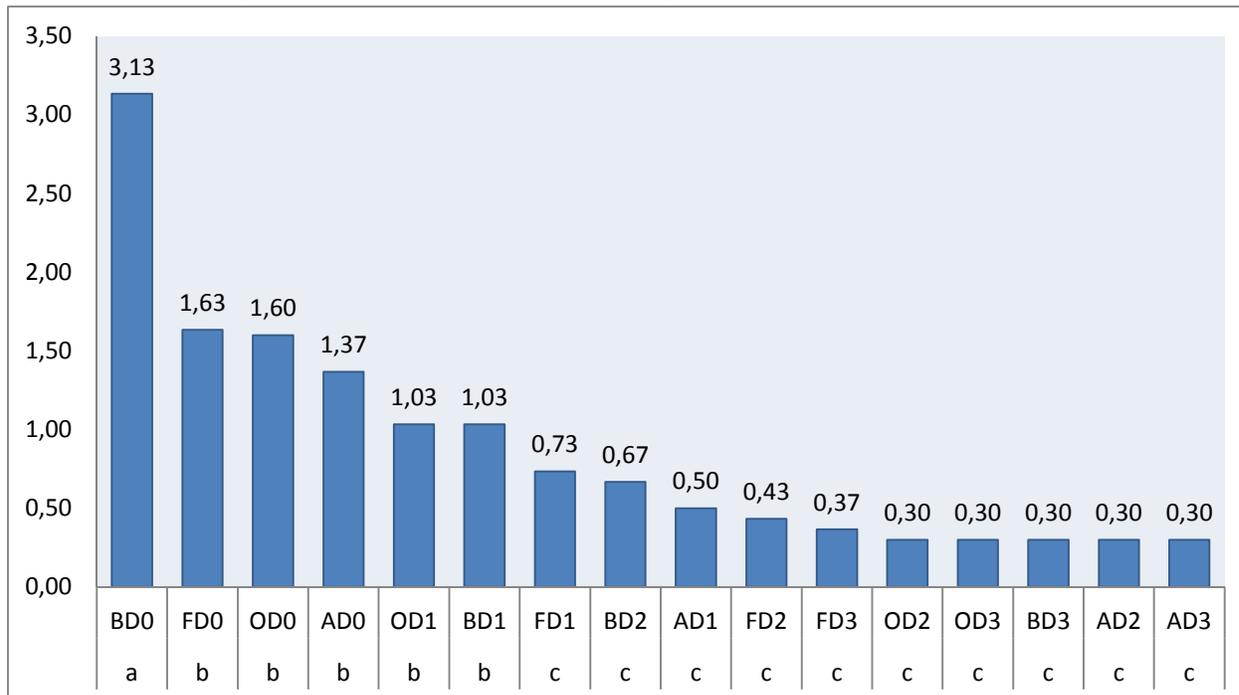
Según el análisis estadístico nos expresa datos que en el factor dosis existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $127,2F_c > 2,9F_t$ con una significativa diferencia y al 1% con una diferencia significativa de $127,2F_c > 4,69F_t$ siendo significativamente diferente en el factor dosis.

En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $1022,0F_c > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $1022,0F_c > 4,96F_t$ siendo significativamente diferente.

En los tratamiento se obtuvo al 5% y 1% una diferencia significativa del $2,08F_t 5% < 32,6F_c$ y al $2,83F_t 1% < 32,6F_c$ siendo significativamente diferente

En los bloques no existió ninguna diferencia significativa en el 5% con un dato del $0,1F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $0,1F_c < 5,49F_t$ no existiendo diferencia alguna

Cuadro 7
Repetición 1 Prueba DMS Al 5% para el diámetro del micelio



Elaboración propia

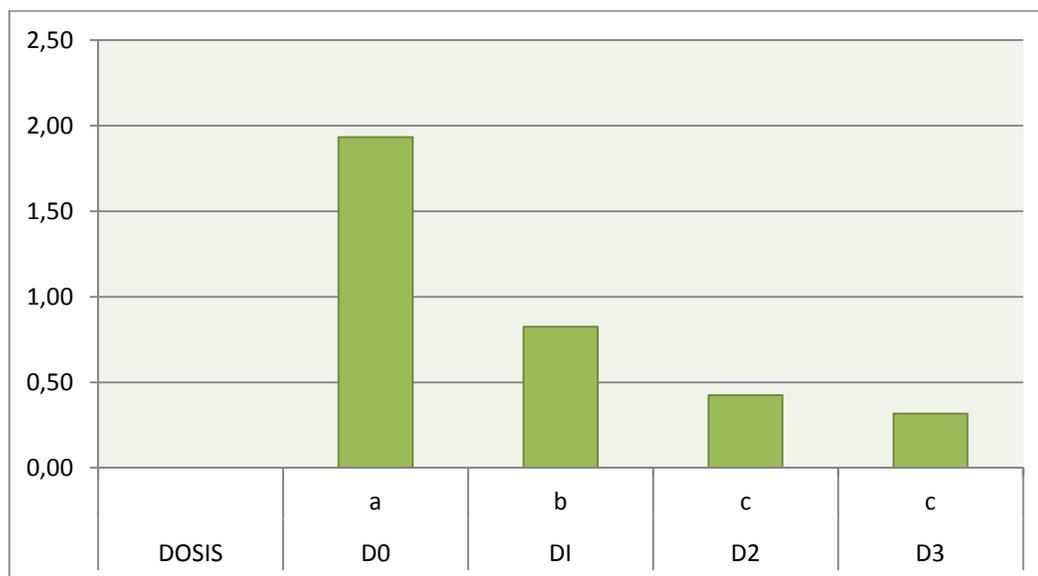
Se puede observar en la prueba que los tratamientos BD0, tienen una diferencia significativa con los demás tratamientos de 3,13cm, siendo el mayor crecimiento.

En los tratamientos FD3 con 0,37cm, FD2 con 0,43cm, AD1 con 0,50 también con BD2 con 0,67 y 0,73 en FD1 tienen diferencia significativa con los demás tratamientos testigos el más significativo es el tratamientos BD0 que está en el rango A se puede decir que hubo un mayor crecimiento siendo el mejor desarrollado en los hongos

Siendo el mejor tratamiento el AD3 con un crecimiento de 0,30cm

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, botrytis y el fusarium.

Cuadro 8
Prueba DMS Al 5% para el diámetro del micelio de las dosis de propóleo a los 5 días



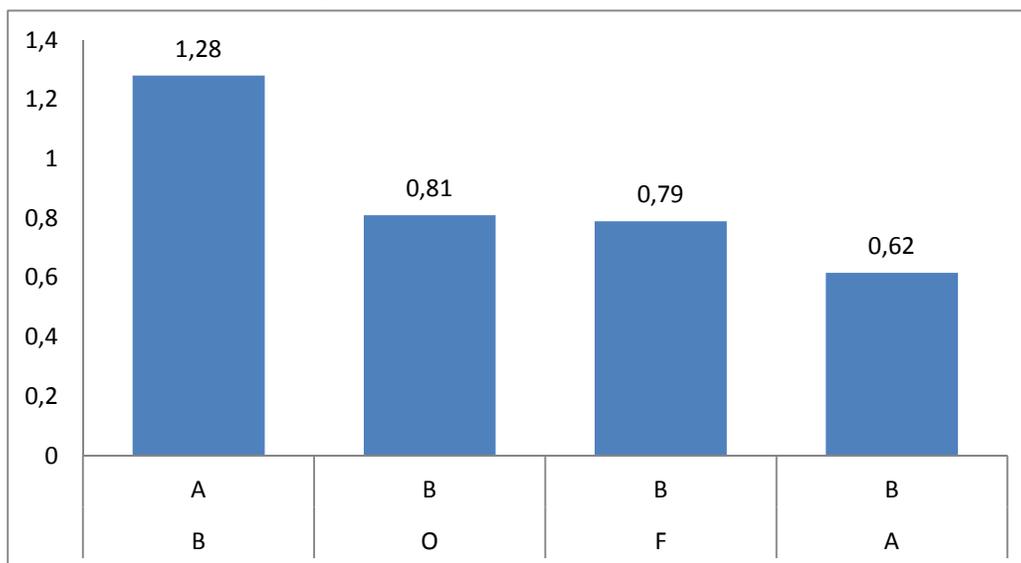
Elaboración propia

En el factor dosis con mayor crecimiento fue la D0 con un rango de A que le da a su inhibición siendo diferente de todos por su enorme crecimiento distinto de los demás apreciando el crecimiento mínimo en las dosis D3 siendo la más óptima junto con la D2 optando con el rango de B.

Los factores de dosis expresan que no existe diferencia entre las dosis D1 con 1,25ml de propóleo, D2 con 2,5ml de propóleo y D3 con 5ml de propóleo

Expresando que la mejor dosis es la D3 con una inhibición de crecimiento máxima por acción del propóleo gracias a su poder antifúngico también se puede recomendar la dosis D2 que no expresa mucha diferencia de crecimiento en la tabla.

Cuadro 9
Prueba DMS Al 5% para el diámetro del micelio de los hongos a los 5 días



Fuente propia

Leyenda B= botrytis O= oídium F= fusarium A= alternaría

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la alternaría y el fusarium siendo los mejores controlados por el propóleo.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa de 1,28cm como la alternaría fusarium y oídium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría con 0,62cm.

Discusión

Siendo positivo para la zona de Tarija teniendo un buen efecto inhibidor de crecimiento ya que en la (universidad de Guanajato 2013) se estudiaron dos tipos de propóleo teniendo una base de cepas en la universidad haciendo mucho más rápido y eficiente el trabajo, en nuestro trabajo se tuvo que identificar y aislar para poder realizar el trabajo de investigación siendo mucho más moroso y difícil de dar un hongo monosporico por el ambiente en que se trabaja.

Cuadro 10
Repetición 1 Crecimiento miceliar a los 14 días

TRATAM./REP		I	II	III	Σ	X
Oídium O	D0	4,8	4,6	4,2	13,6	4,53
	D1	1,6	1,3	1,2	4,1	1,37
	D2	0,5	0,5	0,3	1,3	0,43
	D3	0,3	0,3	0,4	1	0,33
Fusarium F	D0	4,4	4,2	4,1	12,4	4,13
	D1	1,5	1,4	1,4	4,5	1,50
	D2	1,2	1,3	1,4	3,9	1,30
	D3	0,8	0,6	0,7	1,9	0,63
Botrytis B	D0	8,9	8,7	8,6	26,3	8,77
	D1	5,6	5,4	5,7	17	5,67
	D2	4,4	4,6	4,4	13,9	4,63
	D3	2,9	3,1	2,9	8,9	2,97
Alternaría A	D0	3,9	4,2	3,8	12,2	4,07
	D1	1,2	1,2	1,5	3,9	1,30
	D2	0,8	0,8	0,9	2,5	0,83
	D3	0,6	0,6	0,5	1,7	0,57
Σ	ΣBlog.	43,4	42,8	42	129,1	

Elaboración propia

De acuerdo a los datos obtenidos, como se observa en el cuadro en el caso del hongo fusarium en la dosis FD3 se observó un crecimiento miceliar de una media de 0,63cm.

En el hongo oídium se expresó un crecimiento máximo del OD0 4,53cm de media y el mínimo de OD3 0,33cm de crecimiento miceliar, en el hongo alternaría se observó una máxima de AD0 4,07cm de media y una mínima de AD3 0,57cm

En el caso del hongo botrytis se observó que obtuvo una media máxima de BD0 8,77cm y una mínima de BD3

Cuadro 11
Repetición 1 TABLA DE ANOVA a los 14 días

Fv	GI	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	DF
TOTAL	47	256,3			1,8	2,33	
BLOQUES	2	0,1	0,0	0,0	3,35	5,49	NS
TRATA	15	523,1	34,9	3,9	2,08	2,83	**
ERROR	30	266,9	8,9		1,88	2,33	
Fact. hongos	4	1492,2	373,1	41,9	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3	126,0	42,0	4,7	2,96	4,69	NS
hongos/dosis	12	843,0	70,3	7,9	2,96	4,6	**
CV							2,33

Fuente propia

Según el análisis estadístico nos arroja los siguientes datos que en el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $4,7F_c > 2,9F_t$ no existe diferencia significativa y al 1% donde no existe diferencia significativa de $4,7F_c > 4,69F_t$.

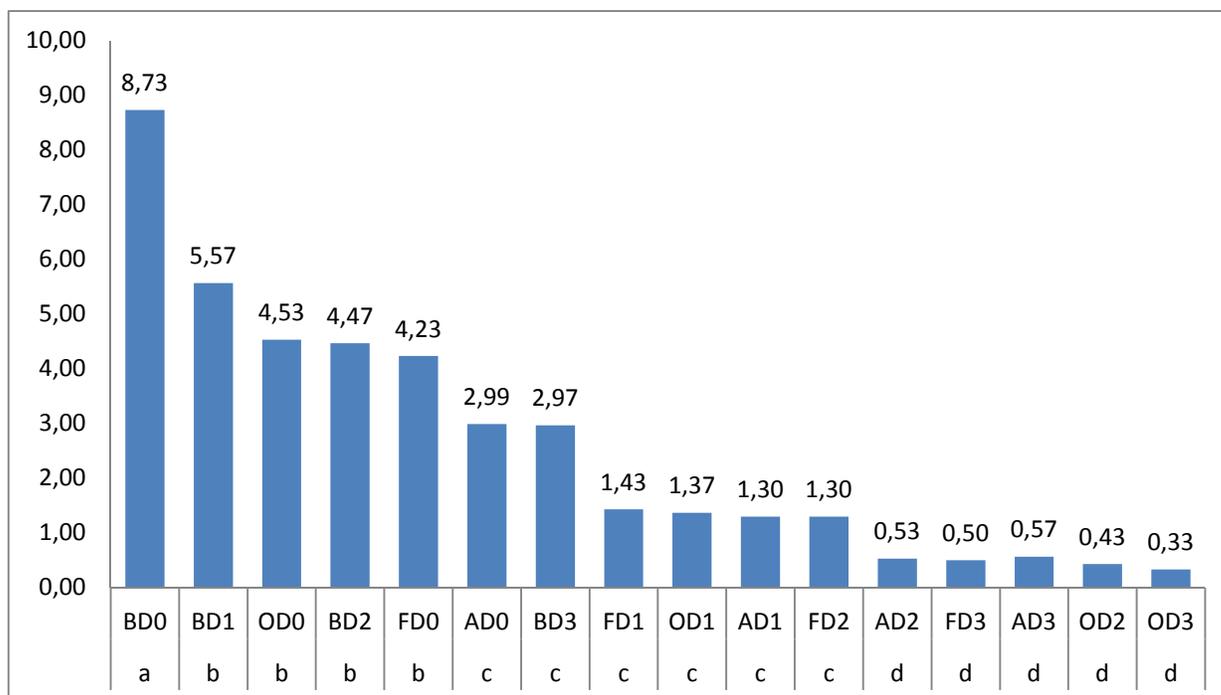
En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $41,9F_c > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $41,9F_c > 7,68F_t$ siendo significativamente diferente.

En los tratamiento se obtuvo al 5% y 1% una diferencia significativa del $2,08F_t < 3,9F_c$ y al $2,83F_t < 3,9F_c$ siendo significativamente diferente

En los bloques no existió ninguna diferencia significativa en el 5% con un dato del $0,0F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $0,0F_c < 5,49F_t$ no existiendo diferencia alguna

En la relación de hongos/dosis existe una diferencia significativa de $7,9F_c > 2,96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo ninguna diferencia significativa de $7,9F_c > 4,6F_t$.

Cuadro 12
Prueba DMS Al 5% Para el diámetro del micelio



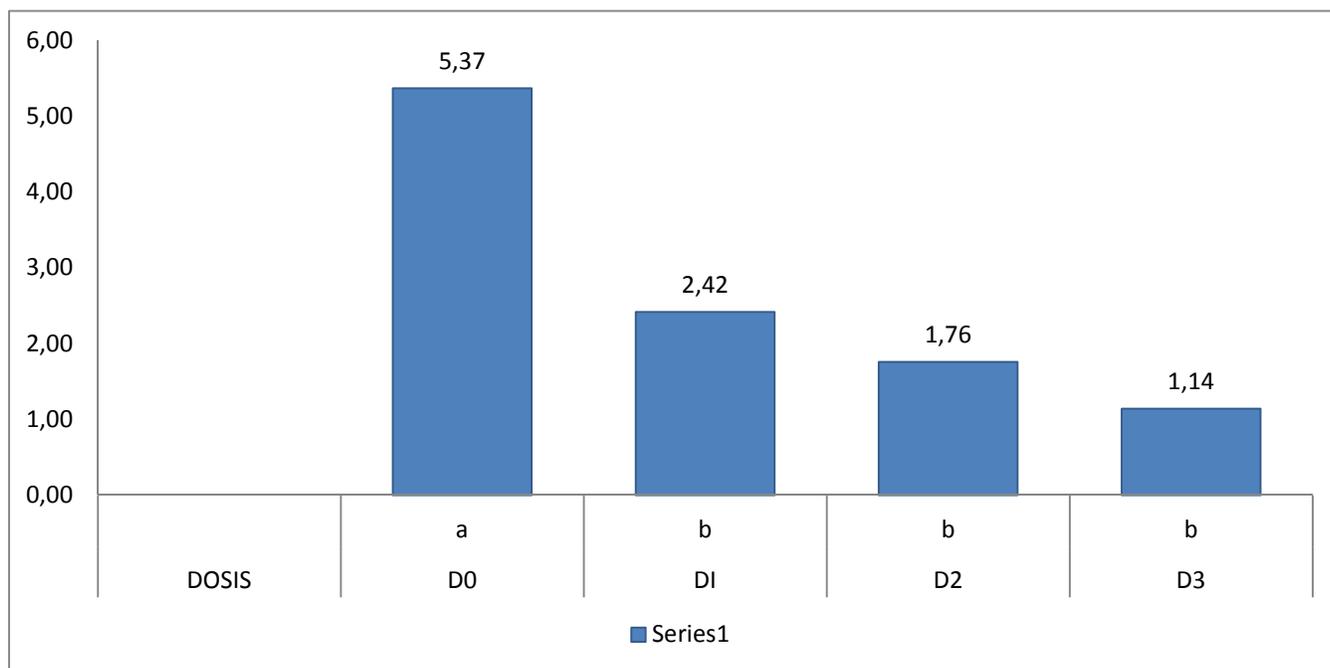
Se puede observar en la prueba que los tratamientos BD0, tienen una diferencia significativa con los demás tratamientos 8,73m en todos, siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo.

En los tratamientos FD2, 1,37 OD1 con 1,30cm, tienen diferencia significativa con los demás tratamientos testigos el más significativo es el tratamientos BD0 con 8,73cm que está en el rango A se puede decir que hubo un mayor crecimiento siendo el mejor desarrollado en los hongos

No existiendo un crecimiento alto en los demás tratamientos siendo categorizados en el rango de B.

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, botrytis y el fusarium.

Cuadro 13
Prueba DMS Al 5% Para el diámetro del micelio de las dosis de propóleo a los 14 días



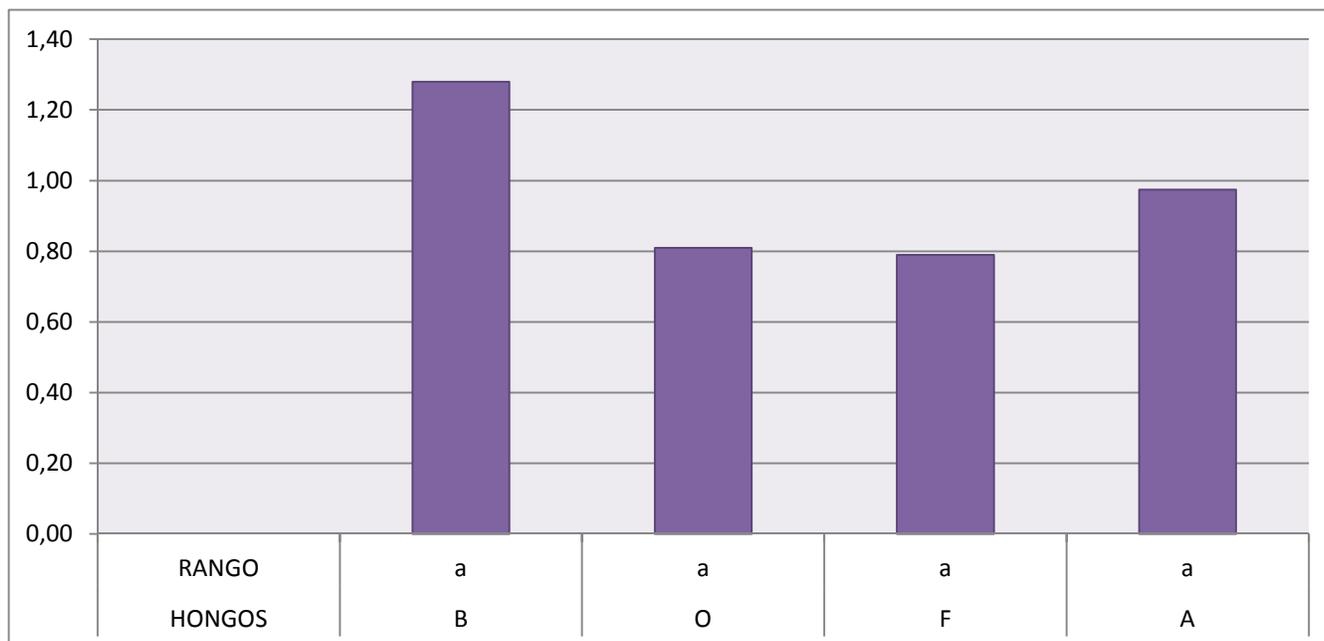
Fuente propia

En el factor dosis la dosis con mayor crecimiento fue la D0 con un rango de A que le da a su inhibición siendo diferente de todos por su enorme crecimiento distinto de los demás apreciando el crecimiento mínimo en las dosis D3 siendo la más óptima junto con la D2 optando con el rango de B.

Los factores de dosis expresan que no existe diferencia entre las dosis D1 con 1,25ml de propóleo, D2 con 2,5ml de propóleo y D3 con 5ml de propóleo

Expresando que la mejor dosis es la D3 con una inhibición de crecimiento máxima por acción del propóleo gracias a su poder antifúngico también se puede recomendar la dosis D2 que no expresa mucha diferencia de crecimiento en la tabla.

Cuadro 14
Prueba DMS Al 5% Para el diámetro del micelio de los hongos a los 14 días



Leyenda B= botrytis O= oídium F= fusarium A= alternaría

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la oídium y el fusarium siendo los mejores controlados por el propóleo.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa como la alternaría y fusarium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría.

El oídium mantuvo su efecto inhibitorio como reacción del hongo ante la dosis del propóleo.

Discusión.-

Se tuvo un efecto inhibitorio significativo en todos los hongos estudiados esto se debe a que su composición ayuda a inhibir siendo más efectivo si se hace una cromatografía como se hizo en (Costa Rica Amparo Londoño 2010) ya que en el país no existe una cromatografía a detalle que se pueda realizar pero solo se obtuvo las propiedades físicas como en el estudio de la (UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE argentina 2013) el cual también no cuenta con un análisis cromatógrafo el cual solo se basó en la preparación solo obteniendo los resultados de la preparación como resultados de análisis.

Cuadro 15
Repetición 1 Crecimiento miceliar a los 21 días

TRATAM./REP		I	II	III	Σ	X
oídium O	D0	9,4	8,9	8,2	26,5	8,83
	D1	3,7	3,4	3,3	10,4	3,47
	D2	2,3	2,3	2	6,6	2,20
	D3	1,2	1	1,6	3,8	1,27
Fusarium F	D0	7,7	7,2	6,9	21,8	7,27
	D1	3,7	3,7	3,2	10,6	3,53
	D2	3,1	3,2	3,2	9,5	3,17
	D3	2,5	2,3	2,7	7,5	2,50
Botrytis B	D0	9,4	9,4	9,4	28,2	9,40
	D1	9,4	9,4	9,4	28,2	9,40
	D2	9,4	9,4	9,4	28,2	9,40
	D3	9,4	9,4	9,4	28,2	9,40
Alternaría A	D0	8	7	7,6	22,6	7,53
	D1	4,3	3,7	3,9	11,9	3,97
	D2	2,2	2,5	2,3	7	2,33
	D3	1,6	1,8	1,5	4,9	1,63
Σ	ΣBlog.	87,3	84,6	84	255,9	

En la medición de la dosis D2F se estimó un incremento de igual manera la media fue 2,20cm tomando en cuenta que la dosis fue mucho menor a la D3F con una media de 1,27cm, el mejor tratamiento para el hongo fusarium la dosis D3F, el testigo cumplió un crecimiento con mucha significancia a los tratamientos siendo efectivas las dosis, el mayor crecimiento en el D0FR1 teniendo un 7,7cm total de tamaño.

En el caso de la alternaría expreso un crecimiento miceliar en el tratamiento D2A con un mínimo de 2,2cm y máximo de 2,5cm y el tratamiento D3A siendo el mejor tratamiento con una media de 1,63cm con un diámetro mínimo de 1,5cm y un diámetro máximo de 1,8cm.

De acuerdo a los datos obtenidos, como se observa en el cuadro 15 el crecimiento miceliar a los 21 días el hongo botrytis se pudo observar que el testigo tiene una media significativa de 9,4 completando en todos los tratamientos el crecimiento del micelio con una medición de 9,4cm

Cuadro 16
Repetición 1 TABLA DE ANOVA a los 21 días

Fv	GI	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	DF
TOTAL	47	471,3			1,8	2,33	
BLOQUES	2	1017,5	508,8	2,6	3,35	5,49	NS
TRATA	15	7414,4	494,3	2,5	2,08	2,83	*
ERROR	30	5925,5	197,5		1,88	2,33	
Fact. hongos	4	5706,4	1426,6	7,2	4,21	7,68	*
Fact. dosis	3	146,5	48,8	0,2	2,9	4,6	NS
hongos/dosis	12	1854,4	154,5	0,8	2,96	4,6	NS
CV					10,96		

Elaboración propia

Según el análisis estadístico nos arroja los siguientes datos que en el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $2,96F_c > 2,9F_t$ no existe diferencia significativa y al 1% donde no existe diferencia significativa de $2,9F_c > 4,69F_t$.

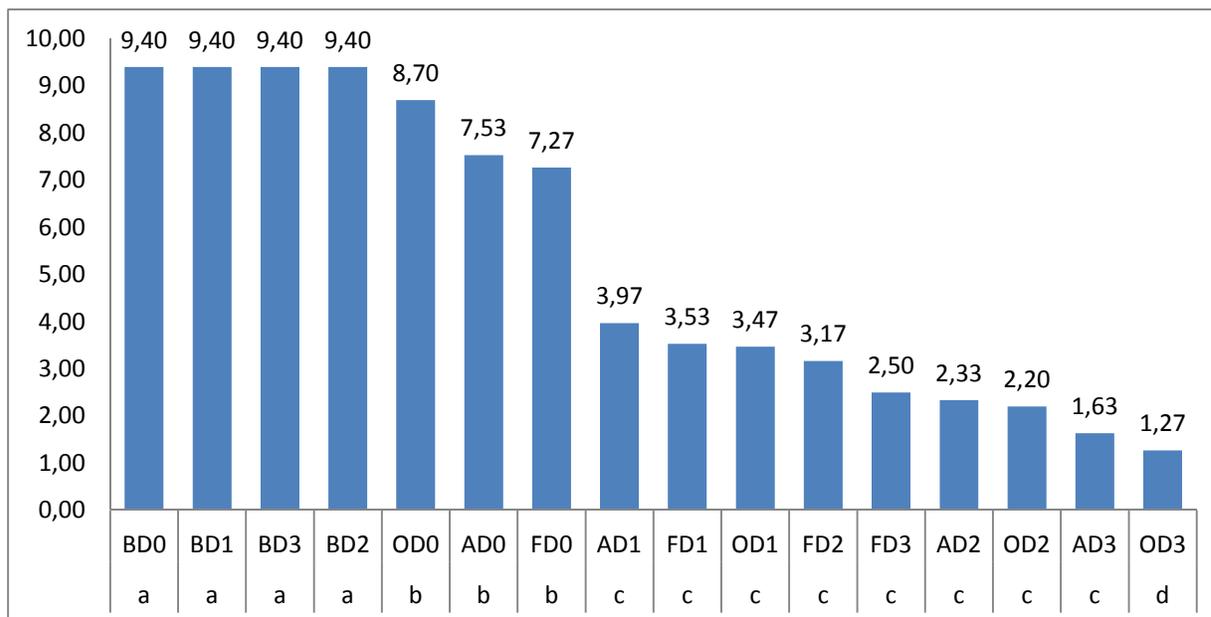
En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $7,2F_c > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $7,2F_c > 7,68F_t$ no existiendo significativamente diferencia.

En los tratamiento no se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $2,08F_t5\% < 2,5F_c$ y al $2,83F_t1\% < 2,5F_c$ siendo significativamente diferente

En los bloques no existió ninguna diferencia significativa en el 5% con un dato del $2.6F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $2.6 F_c < 5,49F_t$ no existiendo diferencia alguna

En la relación de hongos/dosis existe una diferencia significativa de $0.8F_c > 2,96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo ninguna diferencia significativa de $0.8F_c > 4,6F_t$

Cuadro 17
Prueba DMS Al 5% Para el diámetro del micelio



Elaboración propia

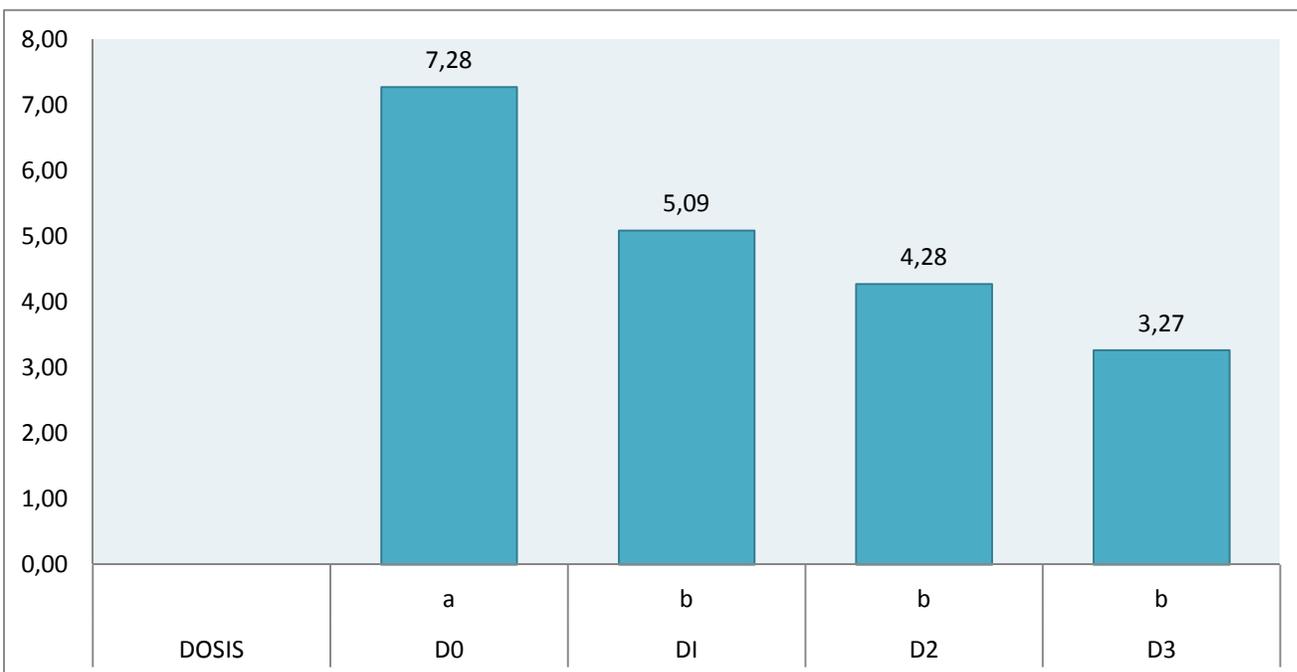
Se puede observar en la prueba que los tratamientos FD3, AD2, AD3, OD2, OD3, AD3, tienen una diferencia significativa con los demás tratamientos teniendo un rango de 1,27cm a 2,50cm, siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo.

En los tratamientos BD0, BD1, BD3 BD2, con 9,4cm, tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos más significativos que están en el rango A se puede decir que hubo un mayor crecimiento siendo el mejor desarrollado en los hongos

No existiendo un crecimiento alto en los demás tratamientos siendo categorizados en el rango de B y C.

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, y el fusarium.

Cuadro 18
Prueba DMS Al 5% para el diámetro del micelio de las dosis de propóleo a los 21 días

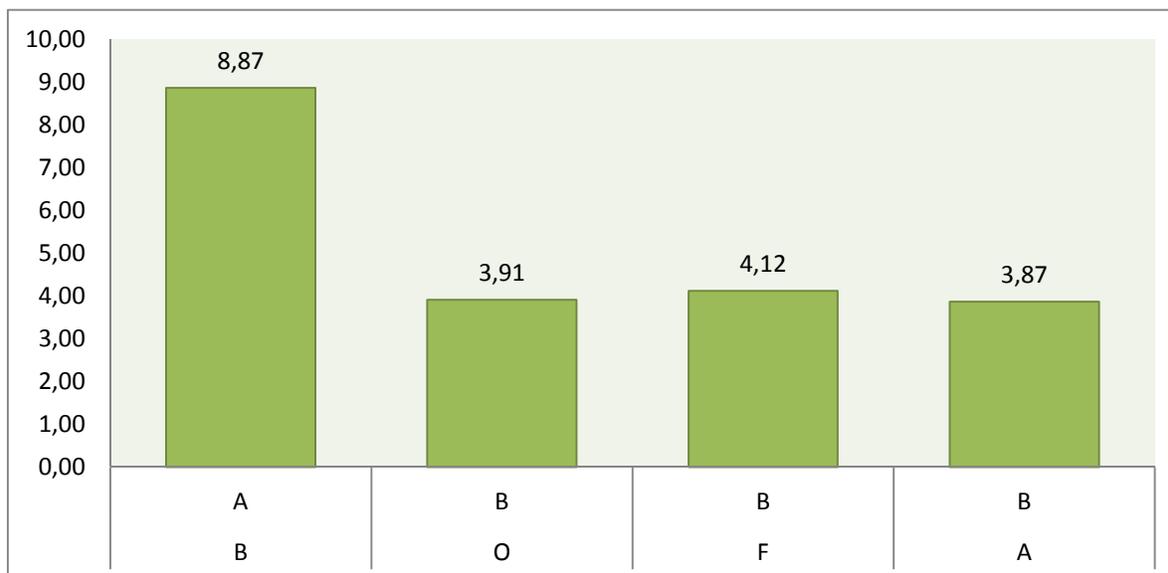


En el factor dosis la dosis con mayor crecimiento fue la D0 con un rango de A que le da a su inhibición siendo diferente de todos por su enorme crecimiento distinto de los demás apreciando el crecimiento mínimo en las dosis D3 siendo la más óptima junto con la D2 optando con el rango de B.

Los factores de dosis expresan que no existe diferencia entre las dosis D1 con 1,25ml de propóleo, D2 con 2,5ml de propóleo y D3 con 5ml de propóleo

Expresando que la mejor dosis es la D3 con una inhibición de crecimiento máxima por acción del propóleo gracias a su poder antifúngico también se puede recomendar la dosis D2 que no expresa mucha diferencia de crecimiento en la tabla.

Cuadro 19
Prueba DMS Al 5% para el diámetro del micelio de los hongos a los 21 Días



Elaboración propia

Leyenda B= botrytis O= oídium F= fusarium A= alternaría

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la oídium y el fusarium siendo los mejores controlados por el propóleo.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa como la alternaría y fusarium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría.

El oídium mantuvo su efecto inhibitorio como reacción del hongo ante la dosis del propóleo

Discusión.

En los estudios de la segunda replica se obtuvo resultados más óptimos ante la primera replica esto se debe a la experiencia obtenida en la primera, efecto que tuvo por la asepsia y la limpieza en el trabajo como lo menciona el trabajo de doctorado de Costa Rica Amparo Londoño 2010 quien enfatiza a las condiciones de un laboratorio de primer nivel, teniendo cepas en nuestro trabajo el aislamiento y identificación tuvo un cierto grado de complejidad

Cuadro 20
Repetición 2 Medición a los 5 días

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
oídium	OD0	2,1	2	2,2	6,3	2,10
	OD1	1,7	1,6	1,7	5	1,67
	OD2	0,7	0,9	0,8	2,4	0,80
	OD3	0,3	0,3	0,3	0,9	0,30
fusarium	FD0	1,6	1,7	1,8	5,1	1,70
	FD1	0,8	0,7	0,6	2,1	0,70
	FD2	0,4	0,4	0,5	1,3	0,43
	FD3	0,4	0,4	0,3	1,1	0,37
botrytis	BD0	3,6	3,65	3,55	10,8	3,60
	BD1	1	0,9	1,05	2,95	0,98
	BD2	0,5	0,4	0,4	1,3	0,43
alternaría	BD3	0,4	0,3	0,3	1	0,33
	AD0	1,7	1,9	2,2	5,8	1,93
	AD1	0,6	0,7	0,5	1,8	0,60
	AD2	0,4	0,5	0,4	1,3	0,43
	AD3	0,3	0,3	0,3	0,9	0,30
	ΣBlog.	43,4	42,8	42	128,2	1,04

Elaboración propia

En el caso de la alternaría no se manifestó ningún crecimiento miceliar en el tratamiento D3A siendo el mejor tratamiento con una media de 0,3cm. En el caso del testigo expreso una media de crecimiento del 1,93cm siendo mayor que el crecimiento de la dosis D1A con una media de 0,60cm, el mayor crecimiento el D0AR3 con un tamaño de 2,2cm

La botrytis tuvo un crecimiento máximo de BD0 con 3,60cm y una mínima de BD3 con 0,33cm, en el hongo fusarium obtuvo un crecimiento máximo de 1,70 cm en el testigo y una mínima de FD3 con 0,37.

En el hongo oídium se manifestó una máxima de 2,10cm en el testigo y una mínima de 0,30cm en BD3

Discusión.

En el hongo fusarium se observó una disminución en el crecimiento esto debido al propóleo teniendo una excelente composición química y física como lo menciona (manual de apicultura) en la teoría que las abejas lo utilizan para su defensa para sellar sus colmenas y mantener en condiciones asépticas como también se lo utiliza en las personas que sufren diabetes y tienen

heridas externas el tratamiento consiste en colocar propóleo sobre la parte afectada, concluyendo su capacidad aséptica es óptima.

Cuadro 21
Repetición 2 TABLA DE ANOVA a los 5 días

Fv	GI	SC	CM	Fc	F _T 5%	F _T 1%	FV
TOTAL	47	38,8			1,8	2,33	
BLOQUES	2	290,3	145,1	15,0	3,35	5,49	**
TRATA	15	38,0	2,5	0,3	2,08	2,83	NS
ERROR	30	289,5	9,7		1,88	2,33	
Fact. hongos	4	211,5	52,9	5,5	4,21	7,68	*
Fact. dosis	3	29,4	9,8	1,0	2,9	4,69	NS
hongos/dosis	12	144,0	12,0	1,2	2,9	4,6	NS
CV					2,42		

Elaboración propia

Según el análisis estadístico nos arroja los siguientes datos que en el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $1,0F_c > 2,9F_t$ no existe diferencia significativa al 1% donde no existe diferencia significativa de $1,0F_c > 4,69F_t$.

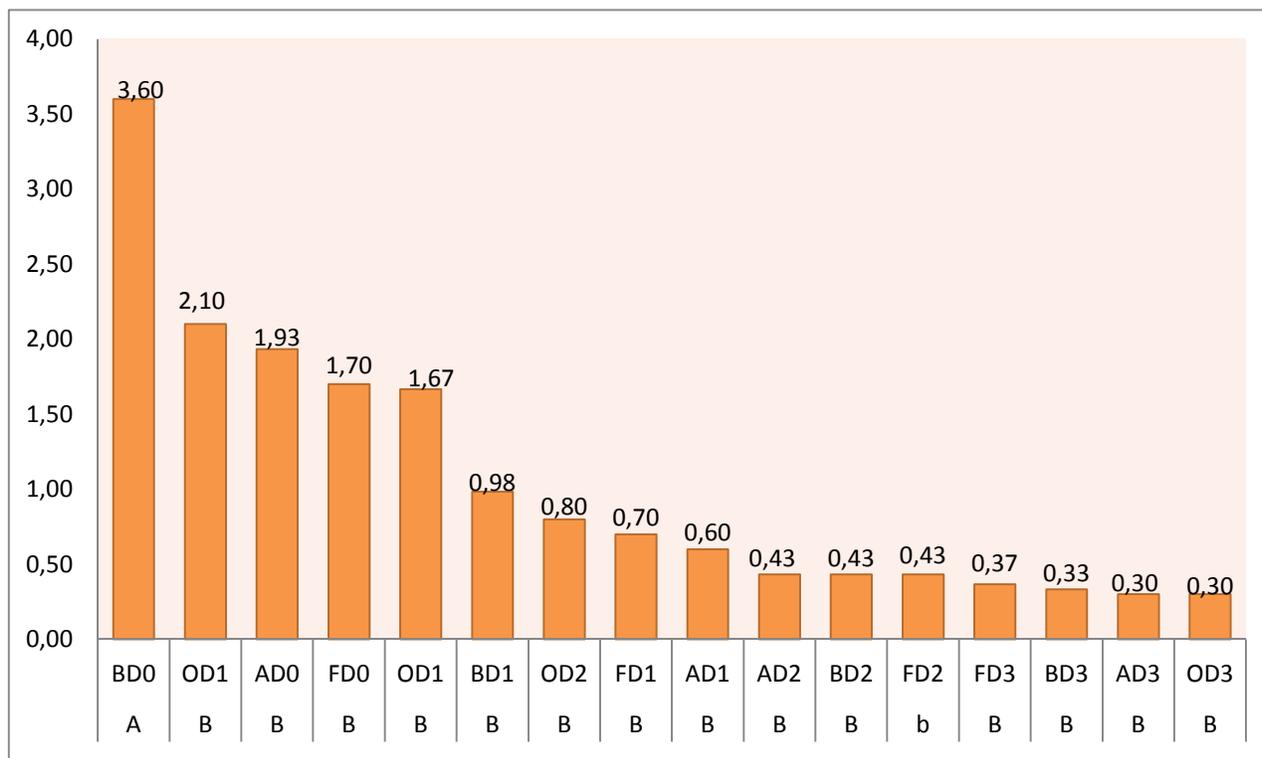
En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $5,5F_c > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $5,5F_c > 7,68F_t$ no existiendo significativamente diferencia.

En los tratamiento no se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $0,3F_t < 2,5F_c$ y al $0,3F_t < 2,5F_c$ siendo significativamente diferente

En los bloques existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $15,0F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $15,0F_c < 5,49F_t$ existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis no existe una diferencia significativa de $1,2F_c > 2,96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo ninguna diferencia significativa de $1,2F_c > 4,6F_t$

Cuadro 22
Prueba DMS Al 5% Para El Diámetro Del Micelio



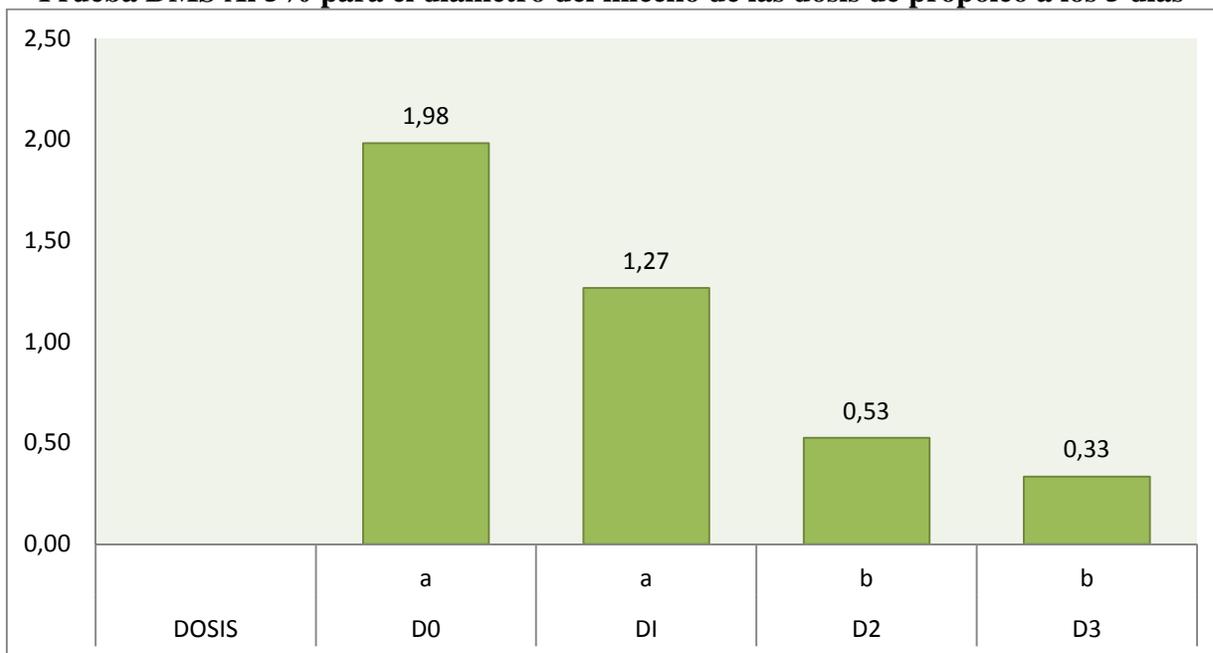
Elaboración propia

Se puede observar en la prueba que los tratamientos FD3, AD3, OD3, BD3 tienen una diferencia significativa con los demás tratamientos teniendo un rango de 0,37cm a 0,30cm , siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo.

En los tratamientos BD0, OD0, OD1, FD0, con 3,6 a 1,67cm de rango, tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos más significativos que están en el rango A se puede decir que hubo un mayor crecimiento siendo el mejor desarrollado en los hongos No existiendo un crecimiento alto en los demás tratamientos siendo categorizados en el rango de B.

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, y el fusarium.

Cuadro 23
Prueba DMS Al 5% para el diámetro del micelio de las dosis de propóleo a los 5 días



Elaboración propia

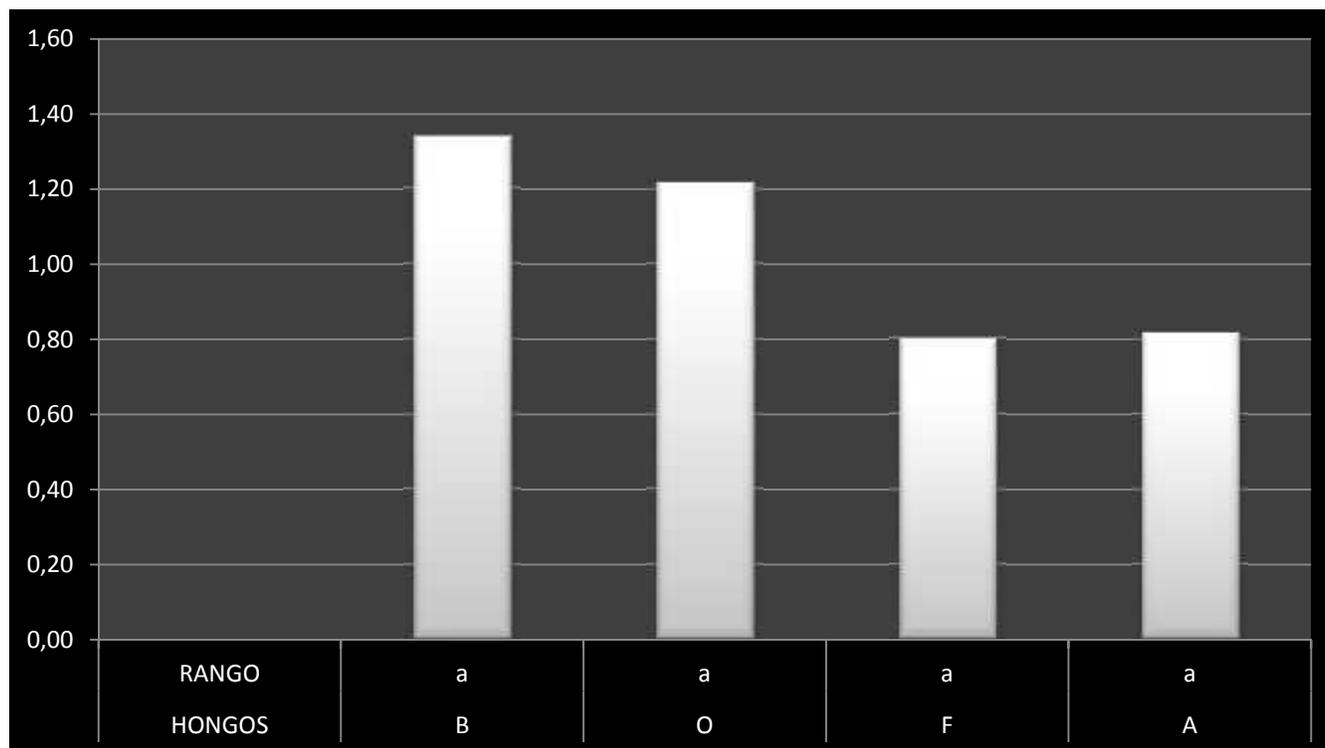
En el factor dosis la dosis con mayor crecimiento fue la D0 con un rango de A que le da a su inhibición siendo diferente de todos por su enorme crecimiento distinto de los demás apreciando el crecimiento mínimo en las dosis D3 siendo la más óptima junto con la D2 optando con el rango de B.

Los factores de dosis expresan que no existe diferencia entre las dosis D1 con 1,25ml de propóleo, D2 con 2,5ml de propóleo y D3 con 5ml de propóleo

Expresando que la mejor dosis es la D3 con una inhibición de crecimiento máxima por acción del propóleo gracias a su poder antifúngico también se puede recomendar la dosis D2 que no expresa mucha diferencia de crecimiento en la tabla.

Cuadro 24

Prueba DMS Al 5% Para El Diámetro Del Micelio De Los Hongos A Los 5 Días



Leyenda B= botrytis O= oídium F= fusarium A= alternaría

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la alternaría y el fusarium siendo los mejores controlados por el propóleo.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa como la alternaría y fusarium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría.

La alternaría mantuvo su efecto inhibitorio como reacción del hongo ante la dosis del propóleo

Cuadro 25
Repetición 2 Medición a los 14 días

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
oidium	OD0	4,5	4,3	4,2	13	4,33
	OD1	1,2	1	1,2	3,4	1,13
	OD2	0,5	0,4	0,4	1,3	0,43
fusarium	OD3	0,3	0,3	0,3	0,9	0,30
	FD0	3,9	4	4	11,9	3,97
	FD1	1,8	1,7	1,9	5,4	1,80
	FD2	1,2	1,3	1,3	3,8	1,27
botrytis	FD3	0,8	0,8	0,7	2,3	0,77
	BD0	9	8,7	8,6	26,3	8,77
	BD1	5,9	5,7	5,8	17,4	5,80
	BD2	4,4	4,4	4,4	13,2	4,40
alternaria	BD3	3,1	3,1	2,9	9,1	3,03
	AD0	3,9	4,1	3,7	11,7	3,90
	AD1	1,2	1,2	1,5	3,9	1,30
	AD2	0,8	0,8	0,9	2,5	0,83
	AD3	0,6	0,6	0,5	1,7	0,57
	ΣBlog.	43,4	42,8	42	128,2	2,66

Elaboración propia

En el caso de la alternaria no se observó ningún crecimiento micelial en el tratamiento D3A siendo este el mejor tratamiento con una media de 1,7cm y un diámetro máximo de 0,6cm y un diámetro mínimo 0,5cm.

De acuerdo a los datos obtenidos, como se observa en el cuadro 25 el crecimiento micelial a los 14 días el hongo botrytis se pudo observar que el testigo tiene una media significativa de 8,77cm con el tratamiento D1B con una media de 5,80cm en el caso del tratamiento D2B su crecimiento micelial de media es 4,40cm.

En la medición de la dosis D2Fse observó un incremento de igual manera la media fue 1,27cm tomando en cuenta que la dosis fue mucho menor a la D3F siendo el mejor tratamiento para el hongo fusarium la dosis D3F, el testigo tuvo un crecimiento con mucha significancia a los tratamientos siendo efectivas las dosis, el mayor crecimiento se desarrolló en el D0FR1 teniendo un 4,2 cm total del tamaño.

Cuadro 26
Repetición 2 TABLA DE ANOVA a los 14 días

Fv	GI	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	DF
TOTAL	47	255,6			1,8	2,33	
BLOQUES	2	2,2	1,1	0,1	3,35	5,49	NS
TRATA	15	533,8	35,6	3,8	2,08	2,83	**
ERROR	30	280,5	9,3		1,88	2,33	
Fact. hongos	4	1490,9	372,7	39,9	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3	117,3	39,1	4,2	2,9	4,6	NS
hongos/dosis	12	839,8	70,0	7,5	2,96	4,6	**
CV					2,42		

Elaboración propia

Según el análisis estadístico nos arroja los siguientes datos que en el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $4.2F_c > 2.9F_t$ no existe diferencia significativa al 1% donde no existe diferencia significativa de $4.2F_c > 4.69F_t$.

En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $39.9F_c > 4.21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $39.9F_c > 7.68F_t$ no existiendo significativamente diferencia.

En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $2.08F_t 5\% < 3.8F_c$ y al $2.83F_t 1\% < 3.8F_c$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

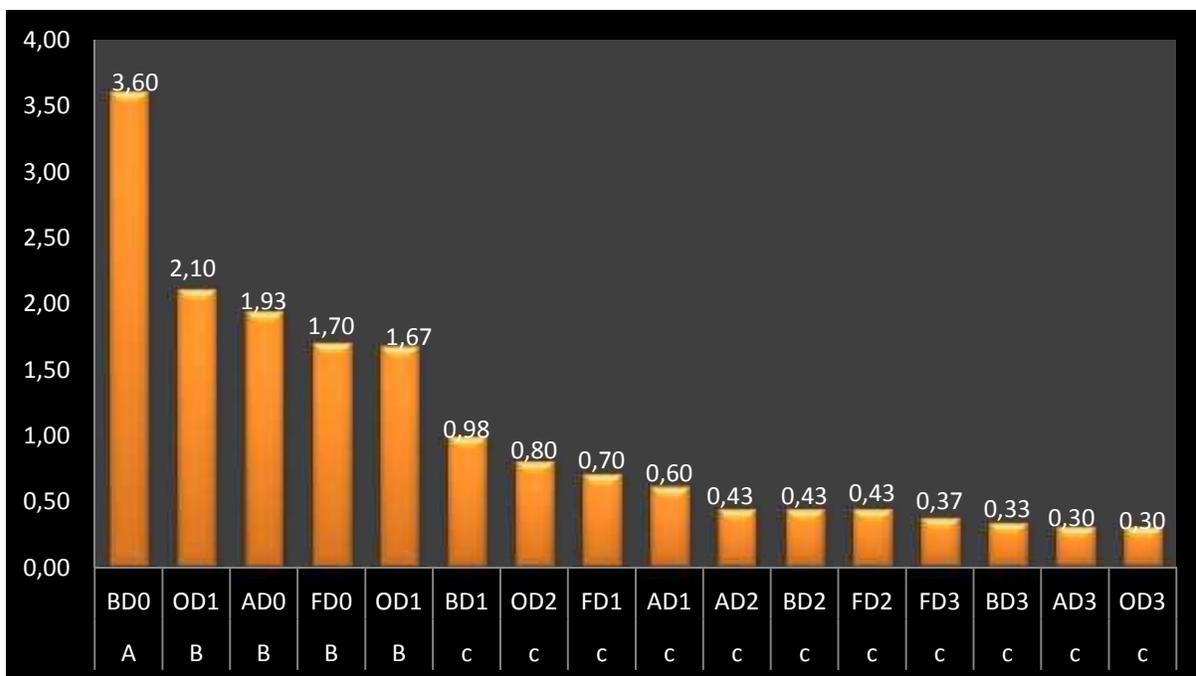
En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $1.0F_c < 3.35F_t$ como en el 1% que expreso $1.0F_c < 5.49F_t$ no existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis existió una diferencia significativa de $7.5F_c > 2.96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo una diferencia significativa de $7.5F_c > 4.6F_t$.

Siendo necesario hacer la prueba de MDS para determinar cuál será el mejor tratamiento y dosis

Cuadro 27

Prueba DMS Al 5% Para el diámetro del micelio de las dosis de propóleo a los 14 días



Elaboración propia

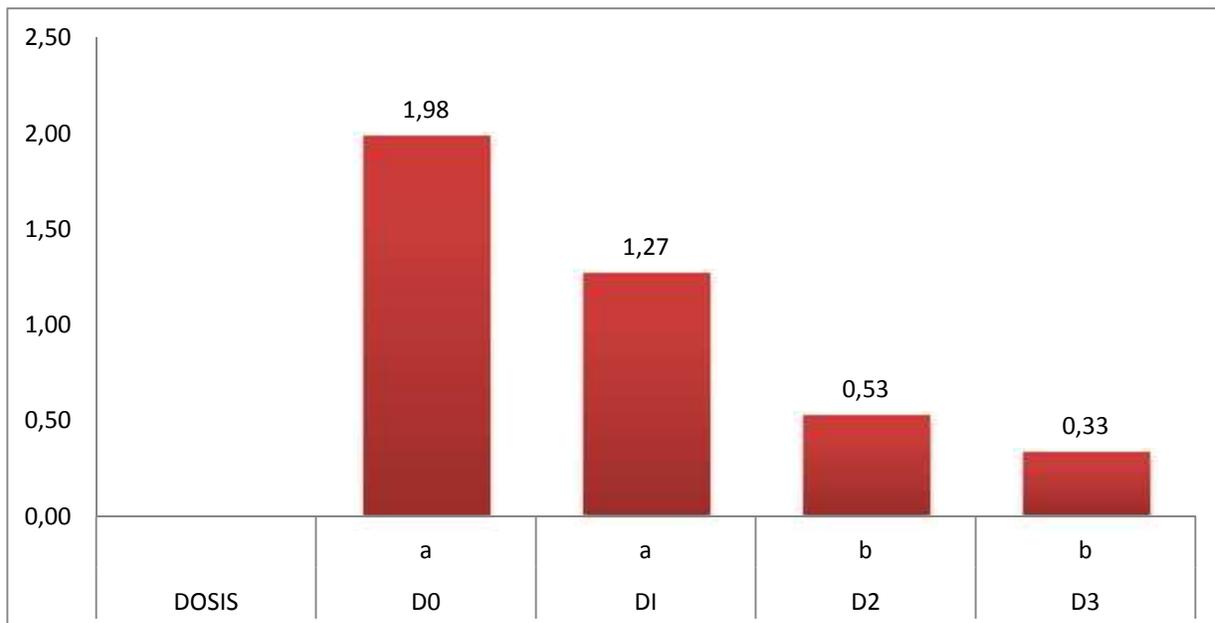
Se puede observar en la prueba que los tratamientos FD3, AD3, OD3, OD2, tienen una diferencia significativa con los demás tratamientos teniendo un rango de 0,77cm a 0,30cm , siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo.

En los tratamientos BD0, OD0, BD2, FD0, BD1, con 8,77cm a 3,90cm de rango, tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos más significativos que están en el rango A se puede decir que hubo un mayor crecimiento siendo el mejor desarrollado en los hongos

No existiendo un crecimiento alto en los demás tratamientos siendo categorizados en el rango de B.

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, y el fusarium.

Cuadro 28
Prueba DMS Al 5% Para el diámetro del micelio de las dosis de propóleo a los 14 días



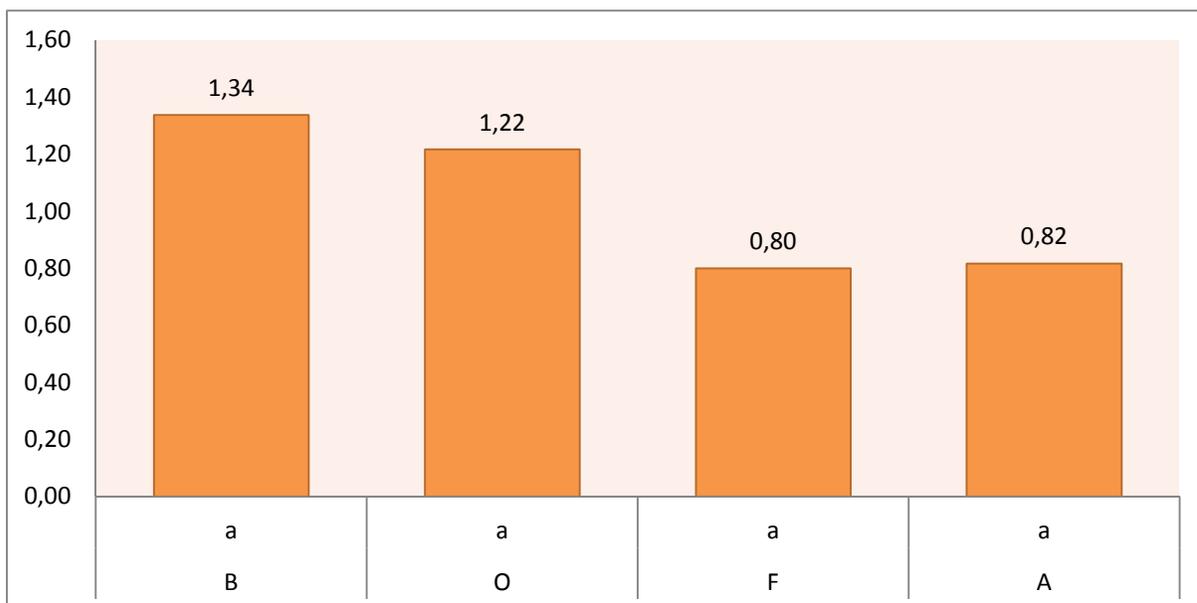
Fuente propia

En el factor dosis la dosis con mayor crecimiento fue la D0 con un rango de A que le da a su inhibición siendo diferente de todos por su enorme crecimiento distinto de los demás apreciando el crecimiento mínimo en las dosis D3 siendo la más óptima junto con la D2 optando con el rango de B.

Los factores de dosis expresan que no existe diferencia entre las dosis D1 con 1,25ml de propóleo, D2 con 2,5ml de propóleo y D3 con 5ml de propóleo

Expresando que la mejor dosis es la D3 con una inhibición de crecimiento máxima por acción del propóleo gracias a su poder antifúngico también se puede recomendar la dosis D2 que no expresa mucha diferencia de crecimiento en la tabla.

Cuadro 29
Prueba DMS Al 5% para el diámetro del micelio de los hongos a los 14 días



Leyenda B= botrytis O= oídium F= fusarium A= alternaría

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la alternaría y el fusarium siendo los mejores controlados por el propóleo.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa como la alternaría y fusarium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría.

La alternaría mantuvo su efecto inhibidor como reacción del hongo ante la dosis del propóleo.

Discusión

Se pudo evidenciar la capacidad antifúngica del propóleo en los tratamientos hechos por ende se puede decir que tiene una capacidad inhibidora.

En el caso de la botrytis se puede evidenciar que controló igual que el oídium ya que a los 4 días seco al hongo en su totalidad siendo positivo para el estudio.

Cuadro 30
Repetición 2 Medición a los 21 días

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
oídium	OD0	4,8	4,6	4,2	13,6	4,53
	OD1	1,6	1,3	1,2	4,1	1,37
	OD2	0,5	0,5	0,3	1,3	0,43
	OD3	0,3	0,3	0,4	1	0,33
fusarium	FD0	8,1	8,4	8,6	25,1	8,37
	FD1	4,5	4,3	4,1	12,9	4,30
	FD2	3,1	3,2	3,4	9,7	3,23
	FD3	1,5	1,3	1,7	4,5	1,50
botrytis	BD0	9,4	9,4	9,4	28,2	9,40
	BD1	9,4	9,4	9,4	28,2	9,40
	BD2	9,4	9,4	9,4	28,2	9,40
	BD3	9,4	9,4	9,4	28,2	9,40
alternaría	AD0	7,8	7,9	7,6	23,3	7,77
	AD1	4,3	4,6	4,5	13,4	4,47
	AD2	2,2	2,5	2,3	7	2,33
	AD3	1,6	1,8	1,5	4,9	1,63
	ΣBlog.	43,4	42,8	42	128,2	4,87

Elaboración propia

En la medición de la dosis DF2 sostuvo un incremento de igual manera la media fue 2,20cm tomando en cuenta que la dosis fue mucho menor a la DF3 con una media de 1,27cm, el mejor tratamiento para el hongo fusarium la dosis DF3, el testigo obtuvo un crecimiento con mucha significancia a los tratamientos siendo efectivas las dosis, el mayor crecimiento hubo en el D0FR1teniendo un 7,7cm total del tamaño.

La dosis D1Oaprecio una media general de crecimiento de 3,47cm mucho menor a la media de D0O que es 8,83cm el crecimiento de hongos que tuvieron la dosis de propóleo son inferiores al testigo, teniendo un crecimiento mayor de todos es el D0OR1 con 9,4 cm.

El menor crecimiento que se observó en el testigo en el décimo cuarto día fue la R3O con un diámetro de 8,9cm, el R2O manifestó un crecimiento de 8,2cm de diámetro y el máximo crecimiento que fue D0OR1 con 9,4cm.

De acuerdo a los datos obtenidos, como se observa en el cuadro el crecimiento miceliar a los vigésimo primeros días el hongo botrytis se pudo observar que el testigo tiene una media significativa de 9,4cm completando en todos los tratamientos el crecimiento del micelio con una medición de 9,4cm.

Cuadro 31
Repetición 2 TABLA DE ANOVA a los 21 días

Fv	Gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	DF
TOTAL	47	561,2			1,8	2,33	
BLOQUES	2	794,4	397,2	1,5	3,35	5,49	NS
TRATA	15	7505,5	500,4	1,9	2,08	2,83	NS
ERROR	30	7738,7	258,0		1,88	2,33	
Fact. hongos	4	4928,1	1232,0	4,8	4,21	7,68	*
Fact. dosis	3	129,3	43,1	0,2	2,96	4,69	NS
hongos/dosis	12	2706,7	225,6	0,9	2,96	4,6	NS
CV					12,53		

Elaboración propia

Según el análisis estadístico nos arroja los siguientes datos que en el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $0,2F_c > 2,9F_t$ no existe diferencia significativa al 1% donde no existe diferencia significativa de $0,2F_c > 4,69F_t$.

En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $4,8F_c > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $4,8F_c > 7,68F_t$ no existiendo significativamente diferencia.

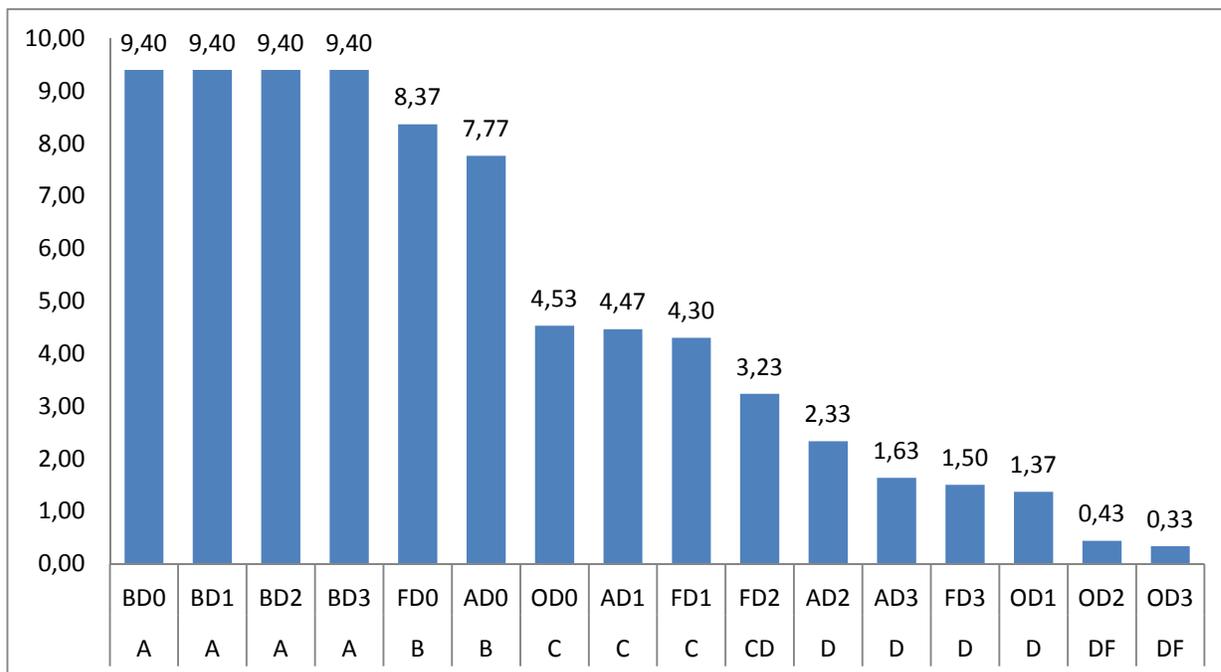
En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $2,08F_t < 1,9F_c$ y al $2,83F_t < 1,9F_c$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $1,5F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $1,5F_c < 5,49F_t$ no existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis no existió una diferencia significativa de $0,9F_c > 2,96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo ninguna diferencia significativa de $0,9F_c > 4,6F_t$.

Siendo necesario hacer la prueba de MDS para determinar cuál será el mejor tratamiento y dosis

Cuadro 32
Prueba DMS Al 5% Para el diámetro del micelio de las dosis de propóleo a los 21 días



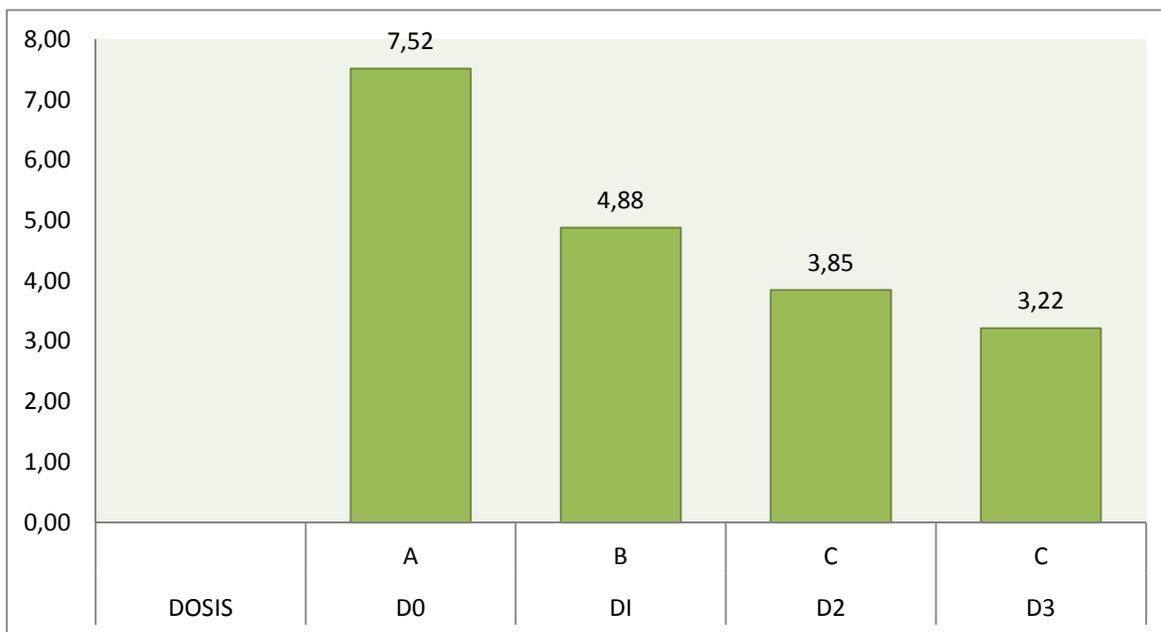
Se puede observar en la prueba que los tratamientos FD3, OD1, OD3, OD2, FD3, AD3 tienen una diferencia significativa con los demás tratamientos teniendo un rango de 1,63cm a 0,33cm, siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo.

En los tratamientos BD0, OD0, BD2, FD0, BD1, BD3, AD0 con 9,4cm a 7,77cm de rango, tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos más significativos que están en el rango A se puede decir que hubo un mayor crecimiento siendo el mejor desarrollado en los hongos

No existiendo un crecimiento alto en los demás tratamientos siendo categorizados en el rango de B.

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, y el fusarium.

Cuadro 33
Prueba DMS Al 5% Para el diámetro del micelio de las dosis de propóleo a los 21 días



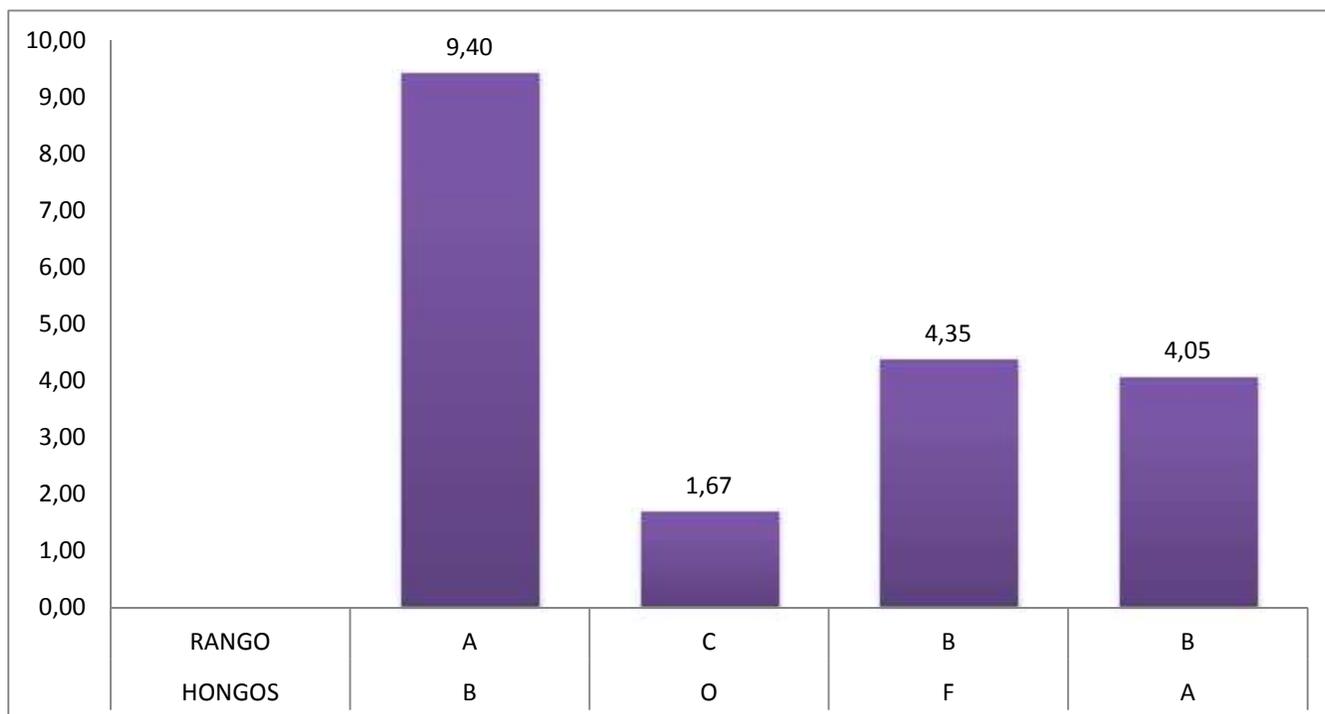
Elaboración propia

En el factor dosis la dosis con mayor crecimiento fue la D0 con un rango de A que le da a su inhibición siendo diferente de todos por su enorme crecimiento distinto de los demás apreciando el crecimiento mínimo en las dosis D3 siendo la más óptima junto con la D2 optando con el rango de B.

Los factores de dosis expresan que no existe diferencia entre las dosis D1 con 1,25ml de propóleo, D2 con 2,5ml de propóleo y D3 con 5ml de propóleo

Expresando que la mejor dosis es la D3 con una inhibición de crecimiento máxima por acción del propóleo gracias a su poder antifúngico también se puede recomendar la dosis D2 que no expresa mucha diferencia de crecimiento en la tabla.

Cuadro 34
Prueba DMS Al 5% Para el diámetro del micelio de los hongos a los 21 días



Leyenda B= botrytis O= oídium F= fusarium A= alternaría elaboración propia

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la alternaría y el fusarium siendo los mejores controlados por el propóleo.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa como la alternaría y fusarium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría.

La alternaría mantuvo su efecto inhibidor como reacción del hongo ante la dosis del propóleo.

4.1.3. PORCENTAJES DE INHIBICION DE LOS HONGOS.

Se tomo los dias 5,14, 21 para el porcentaje de crecimiento

Cuadro 35
Porcentaje de inhibicion a los 5 dias Replica 1

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
oídium	OD1	10,00	9,52	18,18	37,71	12,57
	OD2	60,00	57,14	68,18	185,32	61,77
	OD3	80,00	80,95	81,82	242,77	80,92
fusarium	FD1	40,00	37,50	55,56	133,06	44,35
	FD2	53,33	62,50	66,67	182,50	60,83
	FD3	80,00	75,00	83,33	238,33	79,44
botrytis	BD1	57,14	50,00	57,58	164,72	54,91
	BD2	80,00	75,00	72,73	227,73	75,91
	BD3	91,43	90,63	90,91	272,96	90,99
alternaría	AD1	46,67	47,06	37,50	131,23	43,74
	AD2	60,00	70,59	56,25	186,84	62,28
	AD3	80,00	82,35	81,25	243,60	81,20
	ΣBlog.	738,571429	738,244048	769,949495	2246,76497	62,41
CV					7,26	

Elaboración propia

En el cuadro nos muestra los resultados del porcentaje de inhibición de los hongos a los 5 días de la siembra en los medios de cultivos, obteniendo el mayor porcentaje de inhibición en los tratamientos BD3 con una media de 90,99% de inhibición de micelio del hongo botrytis

En el hongo oídium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 80.92 % de media, seguido del hongo fusarium siendo el mayor porcentaje de 79,44% de media del porcentaje de inhibición de micelio., en el caso de la alternaría obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del 81,80% de media.

Cuadro 36
Tabla de anova del porcentaje de inhibicion a los 5 dias

Fv	gl	SC	CM	F _C	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	47	16279,2			1,8	2,33	
BLOQUES	2	55,3	27,6	1,3	3,35	5,49	NS
TRATA	15	15608,7	1040,6	50,7	2,08	2,83	**
ERROR	30	615,2	20,5		1,88	2,33	
Fact. hongos	4	2223,7	555,9	27,1	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3	11886,8	3962,3	193,2	2,96	4,69	**
hongos/dosis	12	1498,2	124,9	6,1	2,96	4,6	**

Elaboración propia

En el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $193,2F_c > 2,9F_t$ existe diferencia significativa, al 1% donde existe diferencia significativa de $193,2F_c > 4,69F_t$.

En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $27,1F_c > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $27,1F_c > 7,68F_t$ existiendo significativamente diferencia.

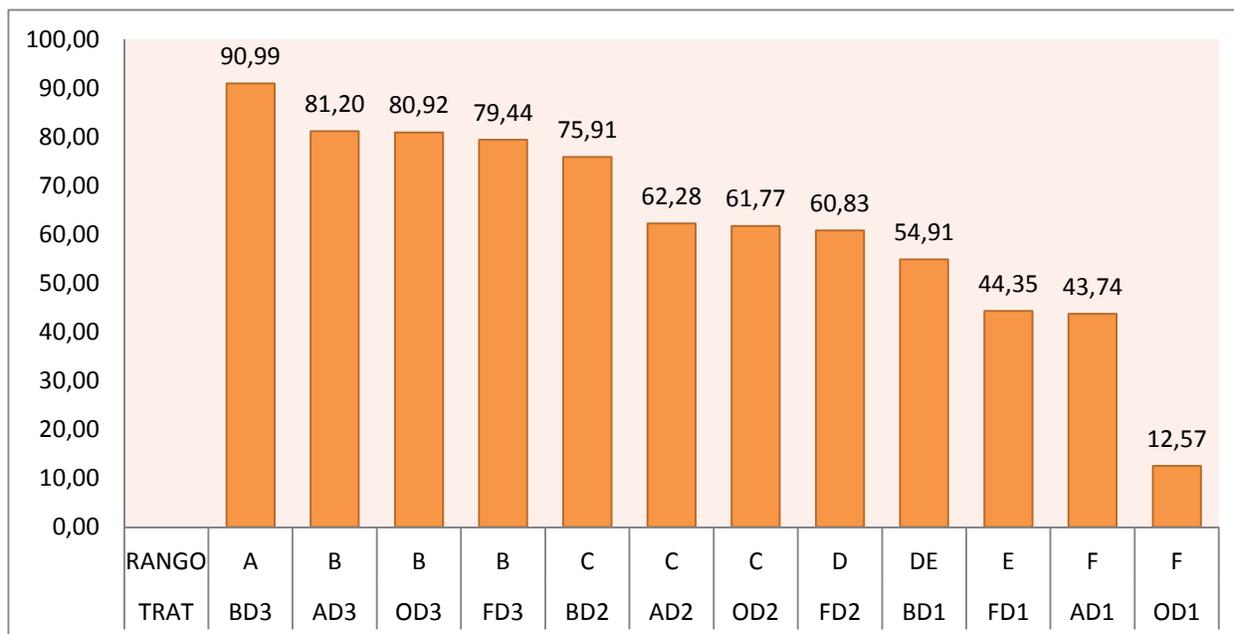
En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $50,7F_t < 1,9F_c$ y al $50,7F_t < 1,9F_c$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $1,3F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $1,3F_c < 5,49F_t$ no existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis existió una diferencia significativa de $6,9F_c > 2,96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo diferencia significativa de $6,9F_c > 4,6F_t$.

Siendo necesario hacer la prueba de MDS para determinar cuál será el mejor tratamiento y dosis

Cuadro 37
Prueba De MDS del porcentaje de inhibición a los 5 días de la siembra

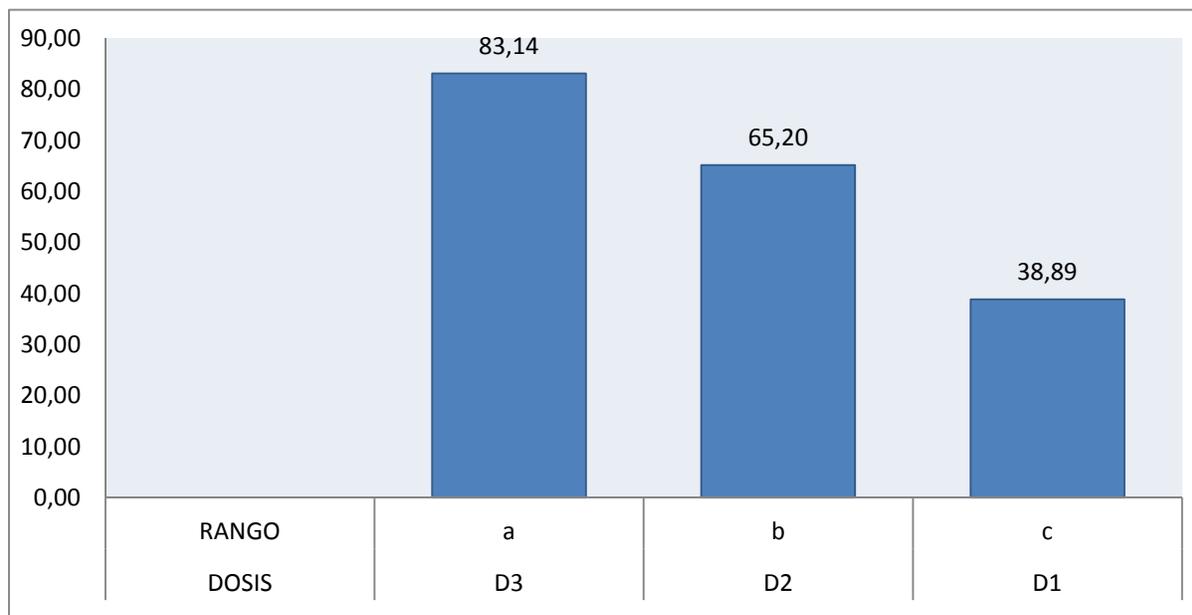


Se puede observar en la prueba que los tratamientos FD1, BD1, OD1, AD1 tienen una diferencia significativa con los demás tratamientos teniendo un rango de 12,57% a 54,91% de inhibición de micelio, siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo.

En los tratamientos BD3, OD3, BD2, FD3, AD3 con 90,99% a 79,44% de rango, tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos más significativos que están en el rango A y B se puede decir que hubo un mayor crecimiento siendo el mejor desarrollado en los hongos

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, botrytis y el fusarium.

Cuadro 38
Prueba DMS Al 5% para el porcentaje de crecimiento del micelio de las dosis de propóleo a los 5 días

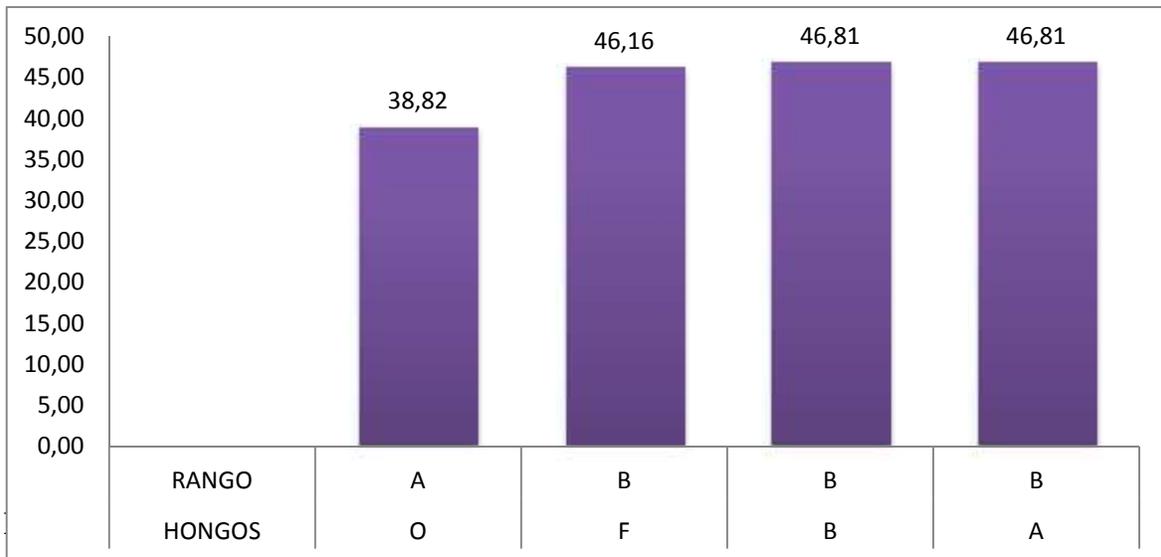


Elaboración propia

En el cuadro se puede interpretar que la mejor dosis es la D3 que contiene 5ml de propóleo en la dosis siendo la mejor inhibidora de crecimiento en porcentaje con un dato de 83,14% de inhibición, teniendo un porcentaje similar en la dosis D2 con un contenido de 2,5ml de propóleo teniendo un porcentaje de inhibición de 65,20% y la dosis mínima que es la D1 con un contenido de 1,25ml de propóleo con un porcentaje de inhibición de 38,89%.

Siendo la mejor dosis la D3 y D2 manifestando su acción sobre los hongos estudiados en la investigación.

Cuadro 39
Prueba DMS Al 5% Para el porcentaje de crecimiento del micelio de los hongos de propóleo a los 5 días



Elaboración propia

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la oídium siendo el mejor controlado por el propóleo.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa como la alternaría y fusarium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría.

La alternaría mantuvo no manifestó reacción del hongo ante la dosis del propóleo como el hongo oídium.

Cuadro 40
Porcentajes de inhibición a los 14 días Replica 1

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
oídium	OD1	66,67	71,74	71,43	209,83	69,94
	OD2	89,58	89,13	92,86	271,57	90,52
	OD3	93,75	93,48	90,48	277,70	92,57
fusarium	FD1	65,91	66,67	65,85	198,43	66,14
	FD2	72,73	69,05	65,85	207,63	69,21
	FD3	81,82	85,71	82,93	250,46	83,49
Botrytis	BD1	37,08	37,93	33,72	108,73	36,24
	BD2	50,56	47,13	48,84	146,53	48,84
	BD3	67,42	64,37	66,28	198,06	66,02
alternaría	AD1	69,23	71,43	60,53	201,19	67,06
	AD2	79,49	80,95	76,32	236,76	78,92
	AD3	84,62	85,71	86,84	257,17	85,72
	ΣBlog.	858,84	863,30	841,92	2564,06	71,22

Elaboración propia

En el cuadro nos muestra los resultados del porcentaje de inhibición de los hongos a los 14 días de la siembra en los medios de cultivos, obteniendo el mayor porcentaje de inhibición en los tratamientos BD3 con una media de 66.02% de inhibición de micelio del hongo botrytis

En el hongo oídium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 92,57 % de media, seguido del hongo fusarium siendo el mayor porcentaje de 83.49% de media del porcentaje de inhibición de micelio, en el caso de la alternaría obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del 85,72% de media.

Cuadro 41
Tabla de anova a los 14 días

Fv	gl	SC	CM	Fc	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	47,00	9309,03			1,80	2,33	
BLOQUES	2,00	21,21	10,60	2,23	3,35	5,49	NS
TRATA	15,00	9145,11	609,67	128,15	2,08	2,83	**
ERROR	30,00	142,72	4,76		1,88	2,33	
Fact. hongos	4,00	5815,91	1453,98	305,63	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3,00	2938,45	979,48	205,89	2,96	4,69	**
hongos/dosis	12,00	390,75	32,56	6,84	2,96	4,60	**
CV					3,06		

Elaboración propia

Al establecer el análisis de variancia para el porcentaje de regeneración, (Cuadro N° 41). En el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $205.89F_c > 2.9F_t$ existe diferencia significativa, al 1% donde existe diferencia significativa de $205.89F_c > 4.69F_t$.

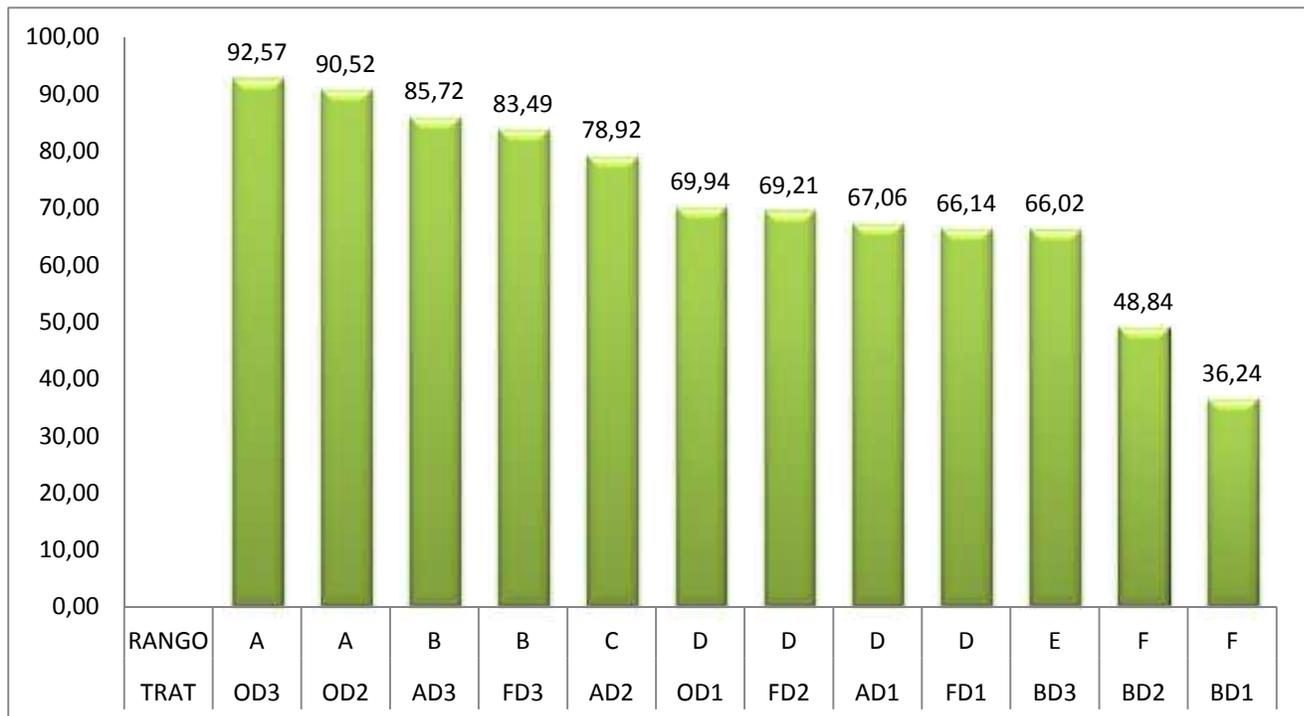
En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $305.63F_c > 4.21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $305.63F_c > 7.68F_t$ existiendo significativamente diferencia.

En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $50.7F_t < 128.15F_c$ y al $50.7F_t < 128.15F_c$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $2.23F_c < 3.35F_t$ como en el 1% que expreso $2.23F_c < 5.49F_t$ no existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis existió una diferencia significativa de $6.83F_c > 2.96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo diferencia significativa de $6.83F_c > 4.6F_t$.

Cuadro 42
Prueba De MDS del porcentaje de inhibición a los 5 días de la siembra



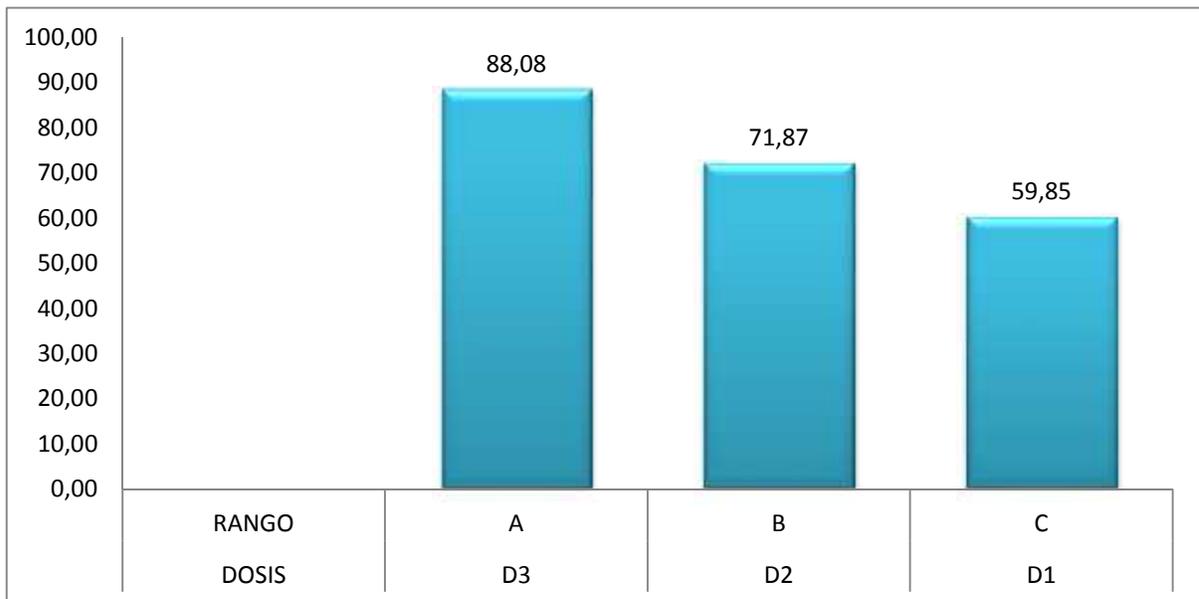
Elaboración propia

Se puede observar en la prueba que los tratamientos BD2, BD1, OD1, FD1 tienen una diferencia significativa con los demás tratamientos teniendo un rango de 36.24% a 66.02% de inhibición de micelio.

En los tratamientos BD3, OD3, BD2, FD3, AD3 con 92,57% a 90,52% de rango, tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos más significativos que están en el rango A se puede decir que en los hongos siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, botrytis y el fusarium.

Cuadro 43
Prueba DMS Al 5% Para el porcentaje de crecimiento del micelio de las dosis de propóleo a los 14 días

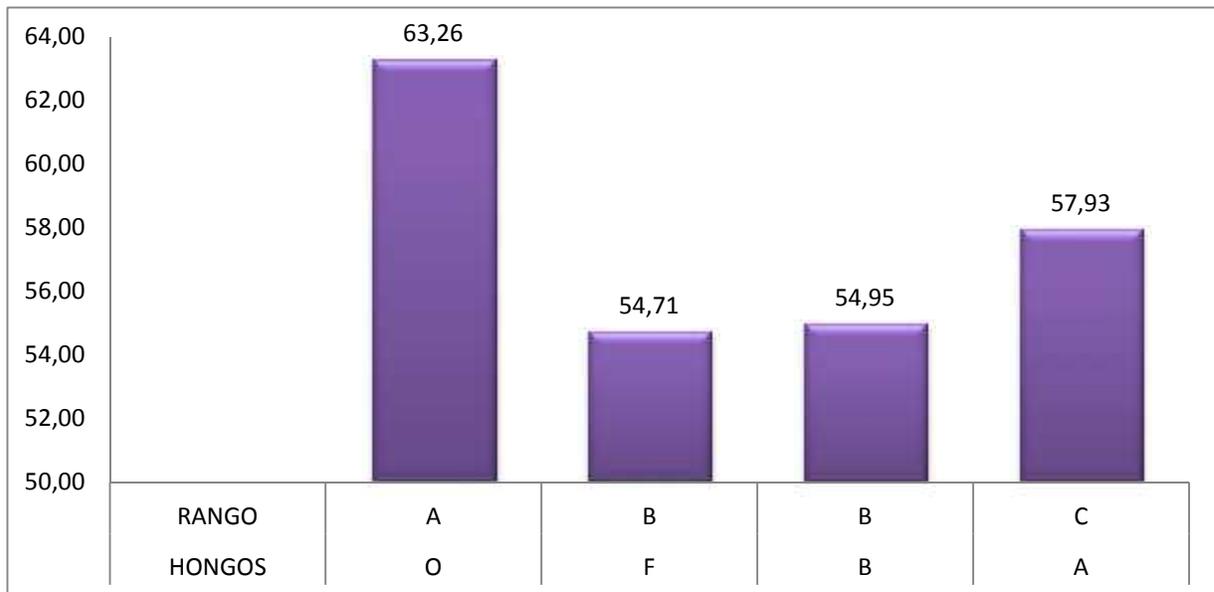


Elaboración propia

En el cuadro se puede interpretar que la mejor dosis es la D3 que contiene 5ml de propóleo en la dosis siendo la mejor inhibidora de crecimiento en porcentaje con un dato de 83,14% de inhibición, teniendo un porcentaje similar en la dosis D2 con un contenido de 2,5ml de propóleo teniendo un porcentaje de inhibición de 65,20% y la dosis mínima que es la D1 con un contenido de 1,25ml de propóleo con un porcentaje de inhibición de 38,89%.

Siendo la mejor dosis la D3 y D2 manifestando su acción sobre los hongos estudiados en la investigación.

Cuadro 44
Prueba DMS Al 5% para el porcentaje de crecimiento del micelio de los hongos de propóleo a los 14 días



Elaboración propia

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la oídium siendo el mejor controlado por el propóleo con un 38,82% de inhibición de crecimiento.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa como la alternaría y fusarium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría.

La alternaría, botrytis y fusarium no manifestaron reacción del hongo ante la dosis del propóleo como el hongo oídium con relación de $46,81 > 38,82$.

Cuadro 45
Porcentajes de inhibición a los 21 días Replica 1

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
oídium	OD1	60,64	61,80	59,76	182,19	60,73
	OD2	75,53	74,16	75,61	225,30	75,10
	OD3	87,23	88,76	80,49	256,49	85,50
fusarium	FD1	51,95	48,61	53,62	154,18	51,39
	FD2	59,74	55,56	53,62	168,92	56,31
	FD3	67,53	68,06	60,87	196,46	65,49
botrytis	BD1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	BD2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	BD3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
alternaría	AD1	46,25	47,14	48,68	142,08	47,36
	AD2	72,50	64,29	69,74	206,52	68,84
	AD3	80,00	74,29	80,26	234,55	78,18
	ΣBlog.	601,38	582,66	582,65	1766,68	49,07

En el cuadro nos muestra los resultados del porcentaje de inhibición de los hongos a los 21 días de la siembra en los medios de cultivos, obteniendo el porcentaje de inhibición en los tratamientos BD3 con una media de 0% de inhibición de micelio del hongo botrytis

En el hongo oídium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 85.50 % de media, seguido del hongo fusarium siendo el mayor porcentaje de 65.49% de media del porcentaje de inhibición de micelio, en el caso de la alternaría obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del 78.18% de media.

Cuadro 46
Tabla De Anova A Los 21 Días

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	47,00	32965,30			1,80	2,33	
BLOQUES	2,00	19,47	9,73	1,97	3,35	5,49	NS
TRATA	15,00	32797,61	2186,51	442,57	2,08	2,83	**
ERROR	30,00	148,21	4,94		1,88	2,33	
Fact. hongos	4,00	30063,96	7515,99	1521,30	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3,00	1838,29	612,76	124,03	2,96	4,69	**
hongos/dosis	12,00	895,36	74,61	15,10	2,96	4,60	**
CV					4,53		

Elaboración propia

En el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $124,03F_c > 2,9F_t$ existe diferencia significativa, al 1% donde existe diferencia significativa de $124,03F_c > 4,69F_t$.

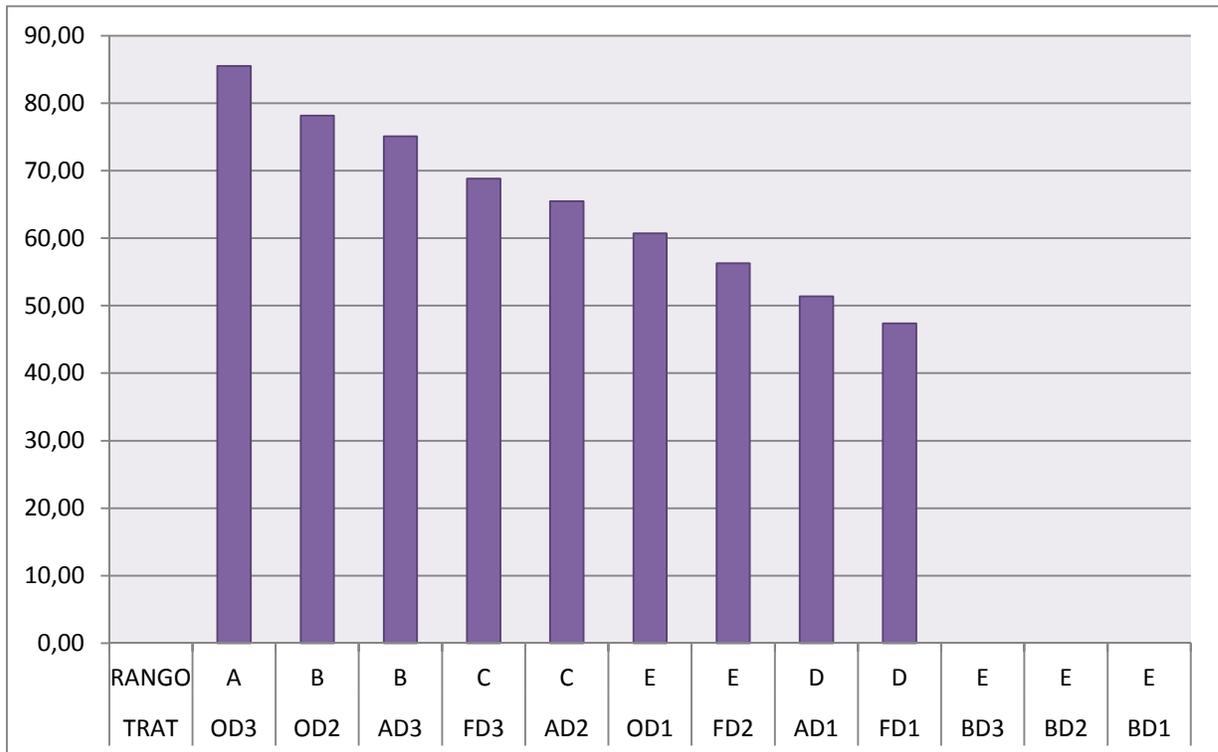
En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $1521,30 > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $1521,30F_c > 7,68F_t$ existiendo significativamente diferencia.

En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $50,7F_t < 5\% < 442,57F_c$ y al $50,7F_t < 1\% < 442,57F_c$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $1,97F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $1,97F_c < 5,49F_t$ no existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis existió una diferencia significativa de $15,10F_c > 2,96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo diferencia significativa de $15,10F_c > 4,6F_t$.

Cuadro 47
Prueba De MDS Del Porcentaje de inhibición a los 21 días de la siembra

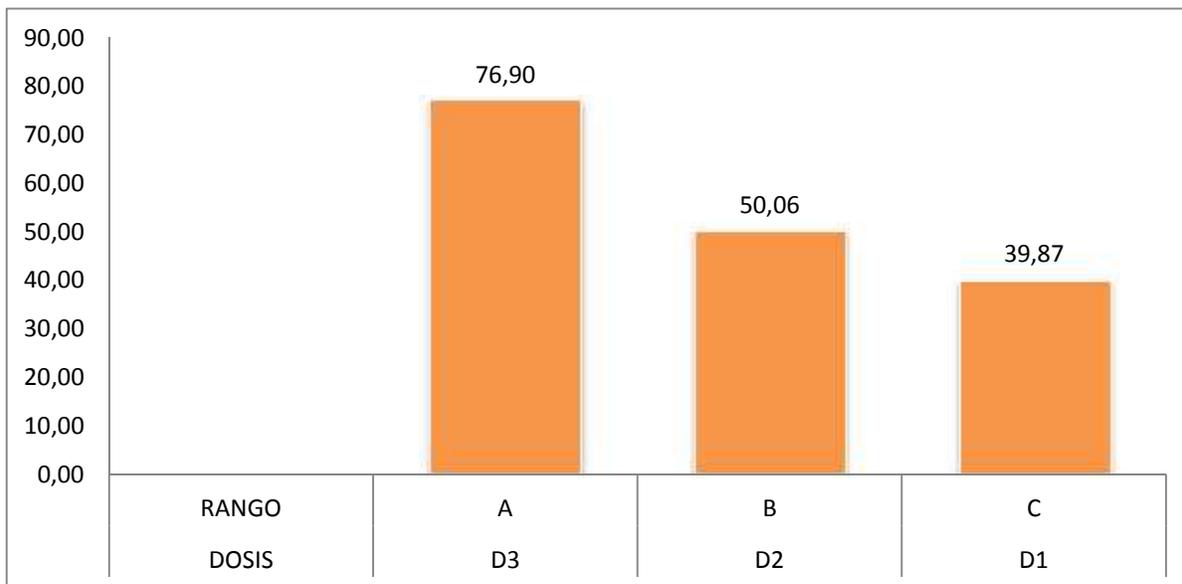


Fuente propia

Se puede observar en la prueba que los tratamientos BD2, BD1, BD3, perdieron en su totalidad EL efecto inhibitor con un porcentaje de 0%

En los tratamientos OD3, OD2, AD3, FD3 con 85.50% a 68.84% de rango, tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos más significativos que están en el rango A se puede decir que en los hongos siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, botrytis y el fusarium.

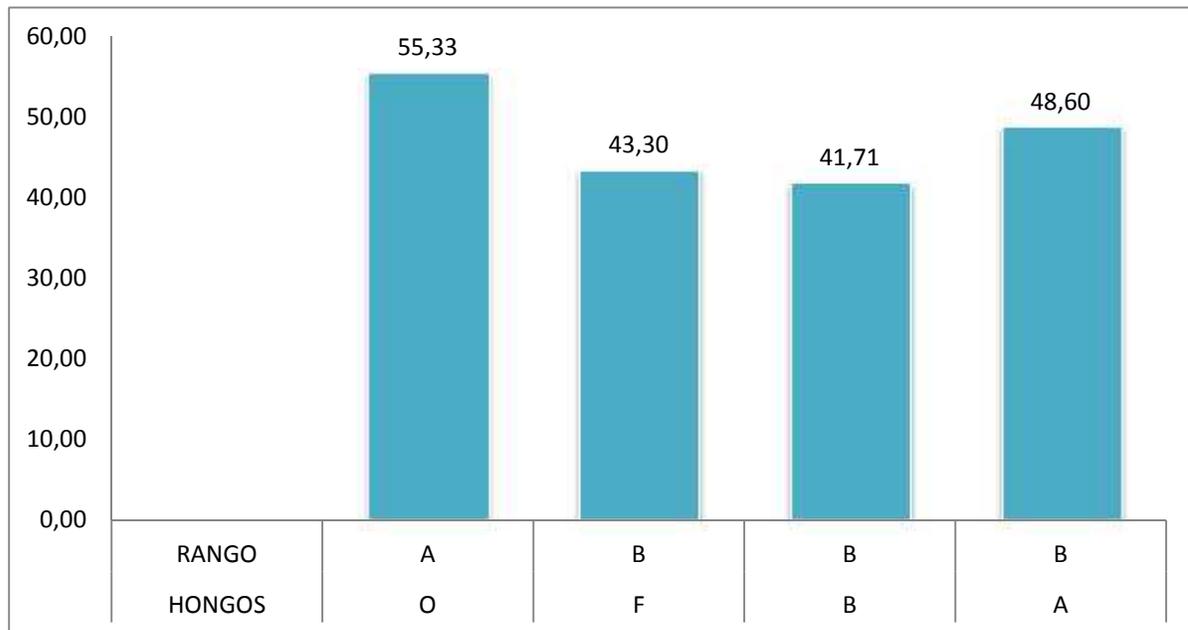
Cuadro 48**Prueba DMS Al 5% para el porcentaje de crecimiento del micelio de las dosis de propóleo a los 21 días**

Fuente propia

En el cuadro se puede interpretar que la mejor dosis es la D3 que contiene 5ml de propóleo en la dosis siendo la mejor inhibidora de crecimiento en porcentaje con un dato de 76.90% de inhibición, teniendo un porcentaje similar en la dosis D2 con un contenido de 2,5ml de propóleo teniendo un porcentaje de inhibición de 50.06% y la dosis mínima que es la D1 con un contenido de 1,25ml de propóleo con un porcentaje de inhibición de 39.87%.

Siendo la mejor dosis la D3 y D2 manifestando su acción sobre los hongos estudiados en la investigación.

Cuadro 49
Prueba DMS al 5% para el porcentaje de crecimiento del micelio de los hongos de propóleo a los 21 días



Fuente propia

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la oídium siendo el mejor controlado por el propóleo con un 38,82% de inhibición de crecimiento.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa como la alternaría y fusarium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría.

La alternaría, botrytis y fusarium no manifestaron reacción del hongo ante la dosis del propóleo como el hongo oídium con relación de $46,81 > 38,82$.

Cuadro 50
Porcentajes de inhibición a los 5 días replica 2

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
oídium	OD1	19,05	20,00	22,73	61,77	20,59
	OD2	66,67	55,00	63,64	185,30	61,77
	OD3	85,71	85,00	86,36	257,08	85,69
fusarium	FD1	50,00	58,82	66,67	175,49	58,50
	FD2	75,00	76,47	72,22	223,69	74,56
	FD3	75,00	76,47	83,33	234,80	78,27
botrytis	BD1	72,22	75,34	70,42	217,99	72,66
	BD2	86,11	89,04	88,73	263,88	87,96
	BD3	88,89	91,78	91,55	272,22	90,74
alternaría	AD1	64,71	63,16	77,27	205,14	68,38
	AD2	76,47	73,68	81,82	231,97	77,32
	AD3	82,35	84,21	86,36	252,93	84,31
	ΣBlog.	842,18	848,98	891,11	2582,27	71,73

Fuente propia

En el cuadro nos muestra los resultados del porcentaje de inhibición de los hongos a los 5 días de la siembra en los medios de cultivos, obteniendo el porcentaje de inhibición en los tratamientos BD3 con una media de 90,74% de inhibición de micelio del hongo botrytis

En el hongo oídium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 85.69 % de media, seguido del hongo fusarium siendo el mayor porcentaje de 78.27% de media del porcentaje de inhibición de micelio, en el caso de la alternaría obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del 84.31% de media.

Cuadro 51
Tabla de Anova a los 5 días

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	47,00	12339,35			1,80	2,33	
BLOQUES	2,00	117,08	58,54	5,21	3,35	5,49	*
TRATA	15,00	11885,08	792,34	70,49	2,08	2,83	**
ERROR	30,00	337,19	11,24		1,88	2,33	
Fact. hongos	4,00	3765,13	941,28	83,75	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3,00	5542,71	1847,57	164,38	2,96	4,69	**
hongos/dosis	12,00	2577,24	214,77	19,11	2,96	4,60	**
CV					4,67		

Elaboración propia

Al establecer el análisis de variancia para el porcentaje de regeneración, (Cuadro N° 51).

En el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $164,38F_c > 2,9F_t$ existe diferencia significativa, al 1% donde existe diferencia significativa de $164,38F_c > 4,69F_t$.

En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $83,75 > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $83,75F_c > 7,68F_t$ existiendo significativamente diferencia.

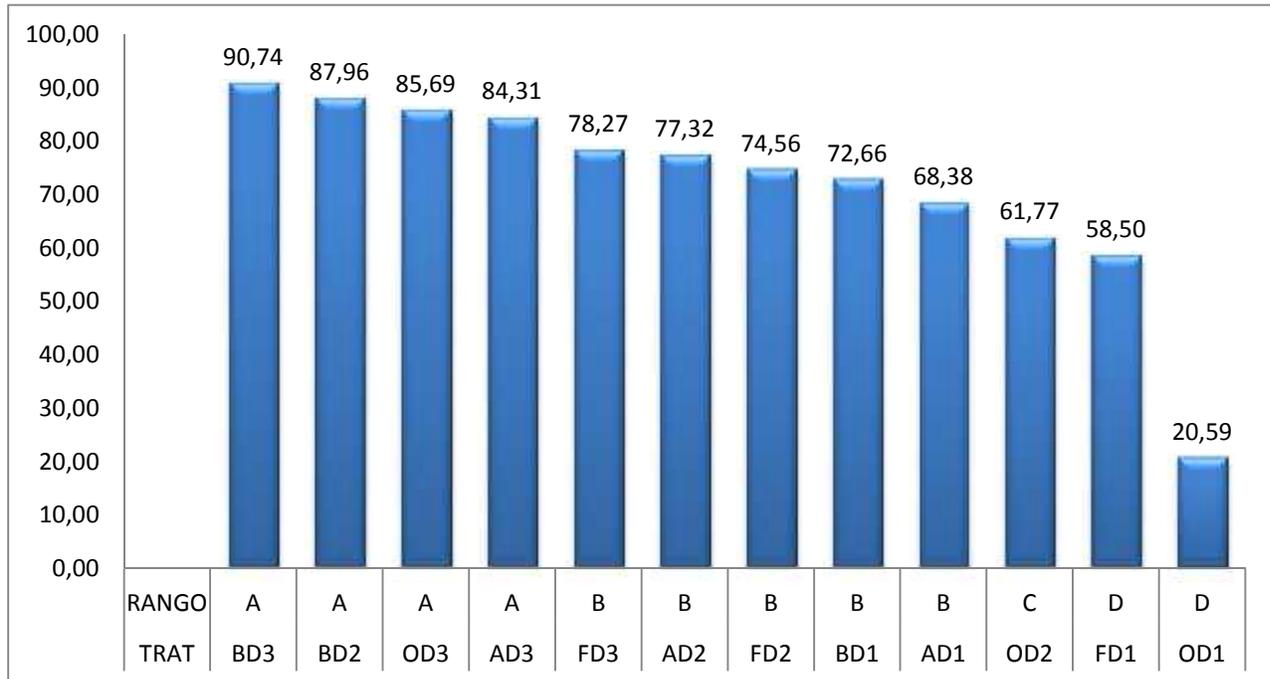
En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $3,35F_t < 70,49F_c$ y al $2,83F_t < 70,49F_c$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $5,21F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $5,21F_c < 5,49F_t$ no existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis existió una diferencia significativa de $19,11F_c > 2,96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo diferencia significativa de $19,11F_c > 4,6F_t$.

Cuadro 52

Prueba De MDS del porcentaje de inhibición a los 5 días de la siembra



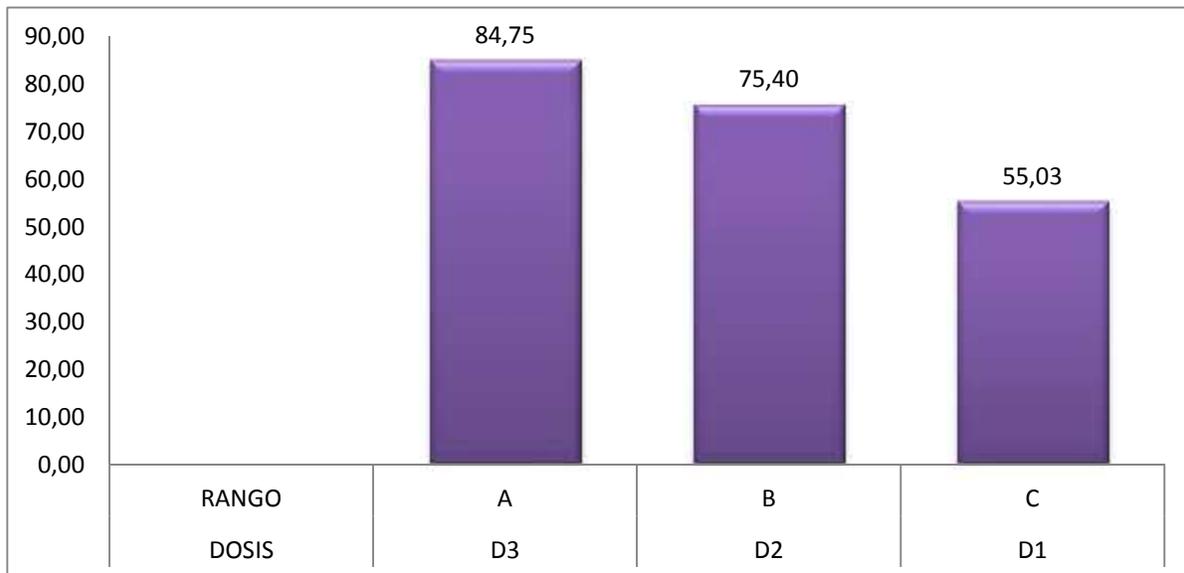
Fuente propia

Se puede observar en la prueba que los tratamientos OD1, BD1, FD1, OD1, AD1 perdieron en su totalidad el efecto inhibitor con un porcentaje de 20,59% de rango a 72,66%

En los tratamientos BD3, BD2, OD3, AD3, FD3 con 90.74% a 84,31% de rango, tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos más significativos que están en el rango A se puede decir que en los hongos siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, botrytis y el fusarium.

Cuadro 53
Prueba DMS Al 5% para el porcentaje de crecimiento del micelio de las dosis de propóleo a los 5 días

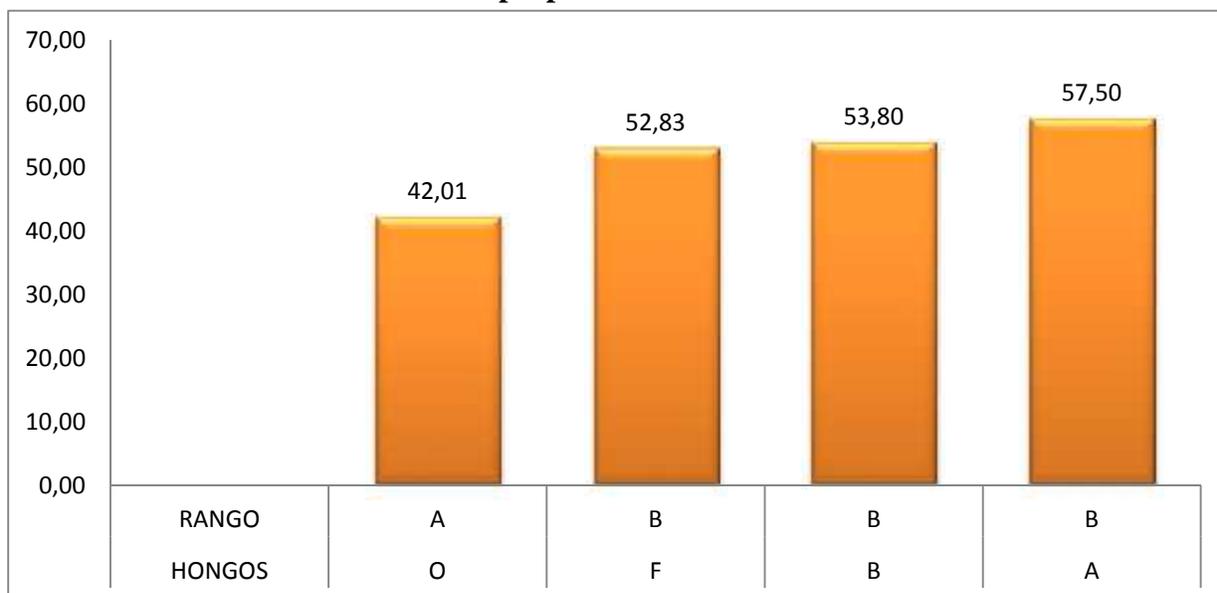


Fuente propia

En el cuadro se puede interpretar que la mejor dosis es la D3 que contiene 5ml de propóleo en la dosis siendo la mejor inhibidora de crecimiento en porcentaje con un dato de 84.75% de inhibición, teniendo un porcentaje similar en la dosis D2 con un contenido de 2,5ml de propóleo teniendo un porcentaje de inhibición de 75.40% y la dosis mínima que es la D1 con un contenido de 1,25ml de propóleo con un porcentaje de inhibición de 55.03%.

Siendo la mejor dosis la D3 y D2 manifestando su acción sobre los hongos estudiados en la investigación.

Cuadro 54
Prueba DMS al 5% para el porcentaje de crecimiento del micelio de los hongos de propóleo a los 5 días



Fuente propia

En el factor hongos en el que más existió inhibición fue la oídium siendo el mejor controlado por el propóleo con un 42.01% de inhibición de crecimiento.

En la botrytis se pudo evidenciar que no manifestó una buena inhibición significativa como la alternaría y fusarium teniendo una diferencia significativa con los demás hongos según el análisis estadístico elaborado el mejor hongo que obtuvo una positiva reacción al propóleo fue la alternaría.

La alternaría tuvo un porcentaje del 57,50% de inhibición del propóleo siendo el mejor que reacciona ante el mismo.

Discusión

En el cultivo del hongo fusarium según Quiroz Sarmiento 2008 encuentra un antagonismo con los demás hongos, comprobando esto en laboratorio en una de la replicas ante l hongo alternaría infectando y contaminando toda la muestra, tomando en cuenta la asepsia para el cultivo del mismo como lo menciona Quiroz Sarmiento.

Cuadro 55
Porcentajes de inhibición a los 14 días replica 2

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
oidium	OD1	73,33	76,74	71,43	221,51	73,84
	OD2	88,89	90,70	90,48	270,06	90,02
	OD3	93,33	93,02	92,86	279,21	93,07
fusarium	FD1	53,85	57,50	52,50	163,85	54,62
	FD2	69,23	67,50	67,50	204,23	68,08
	FD3	79,49	80,00	82,50	241,99	80,66
botrytis	BD1	34,44	34,48	32,56	101,49	33,83
	BD2	51,11	49,43	48,84	149,37	49,79
	BD3	65,56	64,37	66,28	196,20	65,40
alternaría	AD1	69,23	70,73	59,46	199,42	66,47
	AD2	79,49	80,49	75,68	235,65	78,55
	AD3	84,62	85,37	86,49	256,47	85,49
	ΣBlog.	842,56	850,33	826,56	2519,45	69,98

Elaboración propia

En el cuadro nos muestra los resultados del porcentaje de inhibición de los hongos a los 14 días de la siembra en los medios de cultivos, obteniendo el porcentaje de inhibición en los tratamientos BD3 con una media de 65.40% de inhibición de micelio del hongo botrytis

En el hongo oídium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 93.07 % de media, seguido del hongo fusarium siendo el mayor porcentaje de 80.99% de media del porcentaje de inhibición de micelio, en el caso de la alternaría obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del 85.49% de media.

Cuadro 56
Tabla de anova al día 14

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	47,00	10229,67			1,80	2,33	
BLOQUES	2,00	24,48	12,24	3,36	3,35	5,49	*
TRATA	15,00	10095,85	673,06	184,67	2,08	2,83	**
ERROR	30,00	109,34	3,64		1,88	2,33	
Fact. hongos	4,00	6385,65	1596,41	438,02	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3,00	3494,22	1164,74	319,58	2,96	4,69	**
hongos/dosis	12,00	215,98	18,00	4,94	2,96	4,60	**
CV					2,73		

Elaboración propia

Al establecer el análisis de variancia para el porcentaje de regeneración, (Cuadro N° 56). En el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $319,58F_c > 2,9F_t$ existe diferencia significativa, al 1% donde existe diferencia significativa de $319,58F_c > 4,69F_t$.

En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $438,02 > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $438,02F_c > 7,68F_t$ existiendo significativamente diferencia.

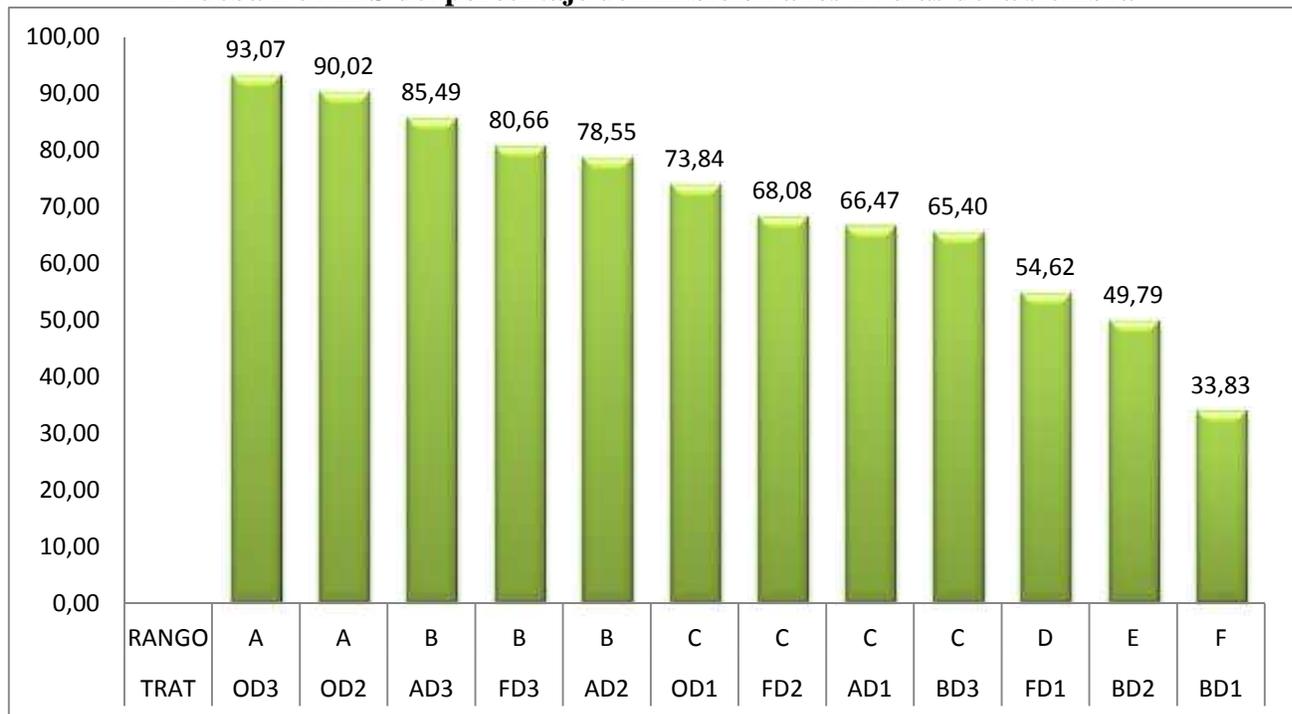
En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $3,35F_t < 184,67F_c$ y al $2,83F_t < 184,67F_c$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $3,36F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $3,36F_c < 5,49F_t$ existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis existió una diferencia significativa de $4,94F_c > 2,96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo diferencia significativa de $4,94F_c > 4,6F_t$.

Siendo necesario hacer la prueba de MDS para determinar cuál será el mejor tratamiento y dosis.

Cuadro 57
Prueba De MDS del porcentaje de inhibición a los 14 días de la siembra



Elaboración propia

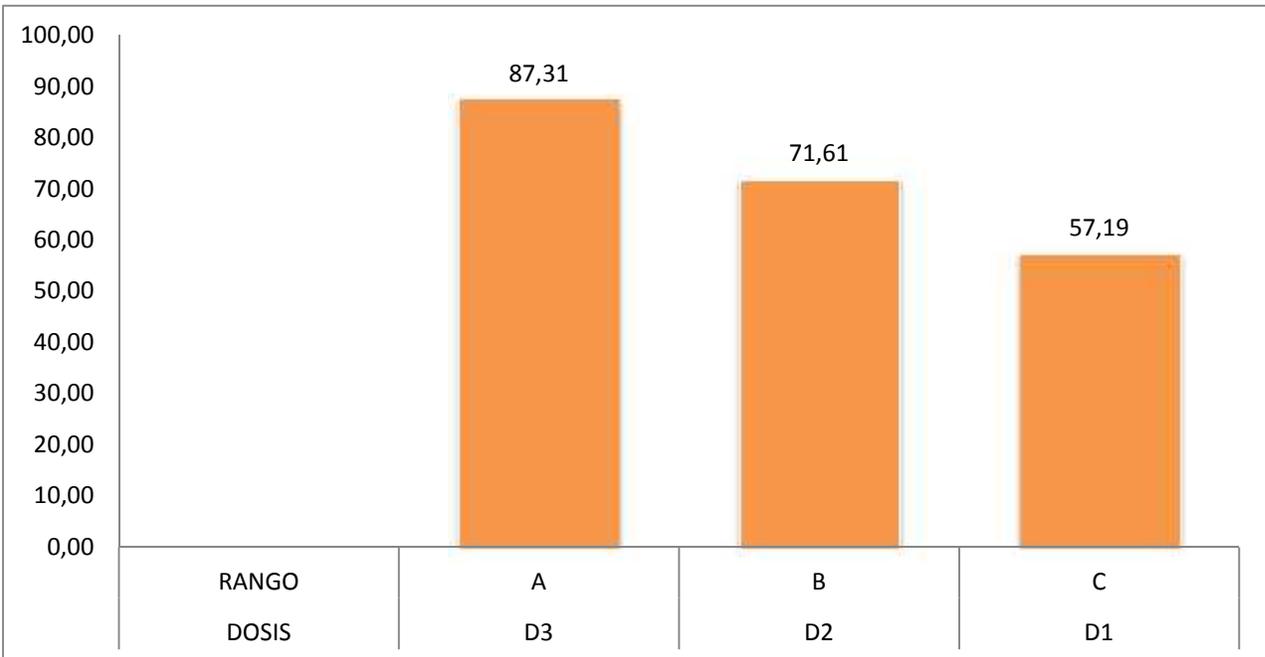
Se puede observar en la prueba que los existe diferencia en los tratamientos OD3 y OD2 con los demás con un rango de A.

En el tratamiento FD3 con un rango de B con un porcentaje de 80,66%, teniendo una mínima en la botrytis de BD1 con 33,83% de inhibición siendo diferentes de los demás con el rango F.

El mayor rango de la botrytis fue en BD3 con un porcentaje de 65,40% siendo el mayor con un rango de C

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, botrytis y el fusarium.

Cuadro 58
Prueba DMS Al 5% para el porcentaje de crecimiento del micelio de las dosis de propóleo a los 14 días

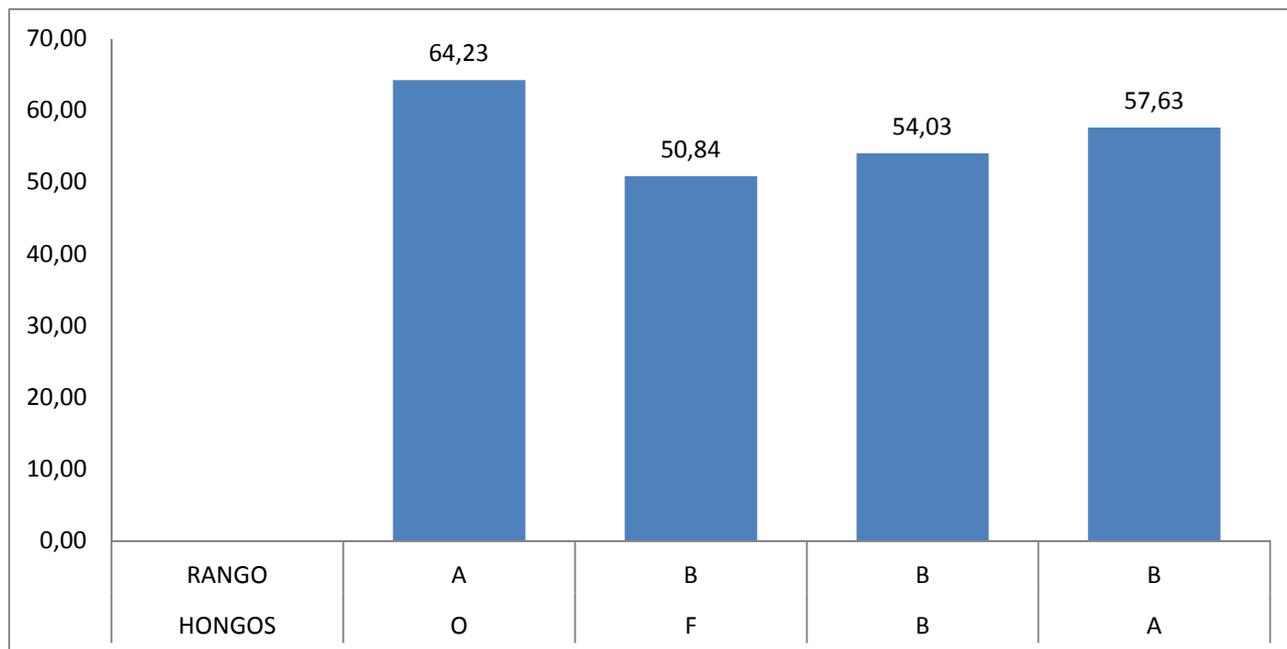


Fuente propia

En el cuadro se puede interpretar que la mejor dosis es la D3 que contiene 5ml de propóleo en la dosis siendo la mejor inhibidora de crecimiento en porcentaje con un dato de 87.31% de inhibición, teniendo un porcentaje similar en la dosis D2 con un contenido de 2,5ml de propóleo teniendo un porcentaje de inhibición de 71.61% y la dosis mínima que es la D1 con un contenido de 1,25ml de propóleo con un porcentaje de inhibición de 57.19%.

Siendo la mejor dosis la D3 y D2 manifestando su acción sobre los hongos estudiados en la investigación.

Cuadro 59
Prueba DMS al 5% para el porcentaje de crecimiento del micelio de los hongos de propóleo a los 14 días



Elaboración propia

En el hongo oídium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 64.23% de media, seguido del hongo fusarium siendo el mayor porcentaje de 50.84% de media del porcentaje de inhibición de micelio, en el caso de la alternaría obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del 57.63% de media.

Cuadro 60
Porcentajes De Inhibicion A Los 21 Dias replica 2

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
oídium	OD1	66,67	71,74	71,43	209,83	69,94
	OD2	89,58	89,13	92,86	271,57	90,52
	OD3	93,75	93,48	90,48	277,70	92,57
fusarium	FD1	44,44	48,81	52,33	145,58	48,53
	FD2	61,73	61,90	60,47	184,10	61,37
	FD3	81,48	84,52	80,23	246,24	82,08
botrytis	BD1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	BD2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	BD3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
alternaria	AD1	44,87	41,77	40,79	127,43	42,48
	AD2	71,79	68,35	69,74	209,89	69,96
	AD3	79,49	77,22	80,26	236,97	78,99
	ΣBlog.	633,81	636,93	638,57	1909,31	53,04

Elaboración propia

En el cuadro nos muestra los resultados del porcentaje de inhibición de los hongos a los 21 días de la siembra en los medios de cultivos, obteniendo el porcentaje de inhibición en los tratamientos BD3 con una media de 0% de inhibición de micelio del hongo botrytis

En el hongo oídium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 92.57% de media, seguido del hongo fusarium siendo el mayor porcentaje de 82.08% de media del porcentaje de inhibición de micelio, en el caso de la alternaria obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del 78.99% de media.

Cuadro 61
Tabla de anova al día 21

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	47,00	41184,92			1,80	2,33	
BLOQUES	2,00	0,98	0,49	0,16	3,35	5,49	NS
TRATA	15,00	41091,63	2739,44	890,32	2,08	2,83	**
ERROR	30,00	92,31	3,08		1,88	2,33	
Fact. hongos	4,00	36262,57	9065,64	2946,34	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3,00	3327,55	1109,18	360,49	2,96	4,69	**
hongos/dosis	12,00	1501,50	125,13	40,67	2,96	4,60	**
CV					3,31		

Elaboración propia

Al establecer el análisis de variancia para el porcentaje de regeneración, (Cuadro N° 61). En el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $360.49F_c > 2.9F_t$ existe diferencia significativa, al 1% donde existe diferencia significativa de $360.49F_c > 4.69F_t$.

En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $2946.34 > 4.21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $2946.34F_c > 7.68F_t$ existiendo significativamente diferencia.

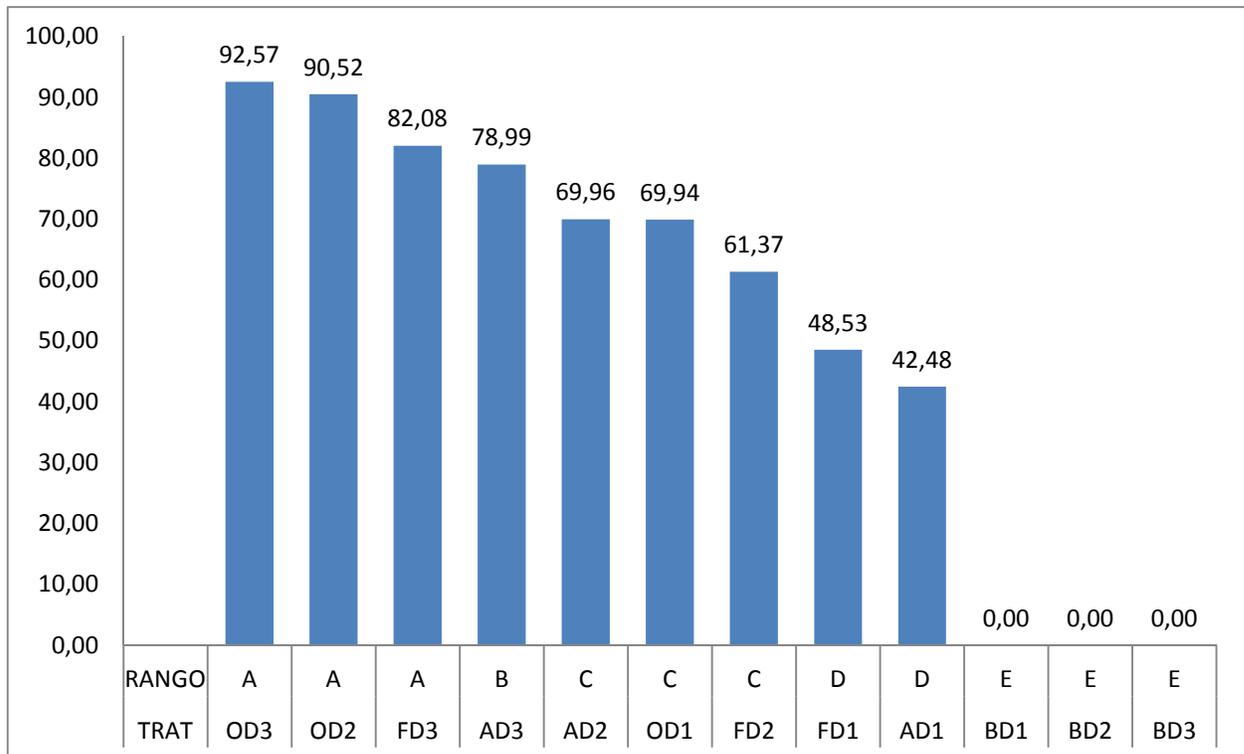
En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $3.35F_t < 0.16F_c$ y al $2.83F_t < 0.16F_c$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $0.16F_c < 3.35F_t$ como en el 1% que expreso $0.16F_c < 5.49F_t$ existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis existió una diferencia significativa de $40.67F_c > 2.96F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo diferencia significativa de $40.67F_c > 4.6F_t$.

Siendo necesario hacer la prueba de MDS para determinar cuál será el mejor tratamiento y dosis.

Cuadro 62
Prueba De MDS del porcentaje de inhibición a los 21 días de la siembra



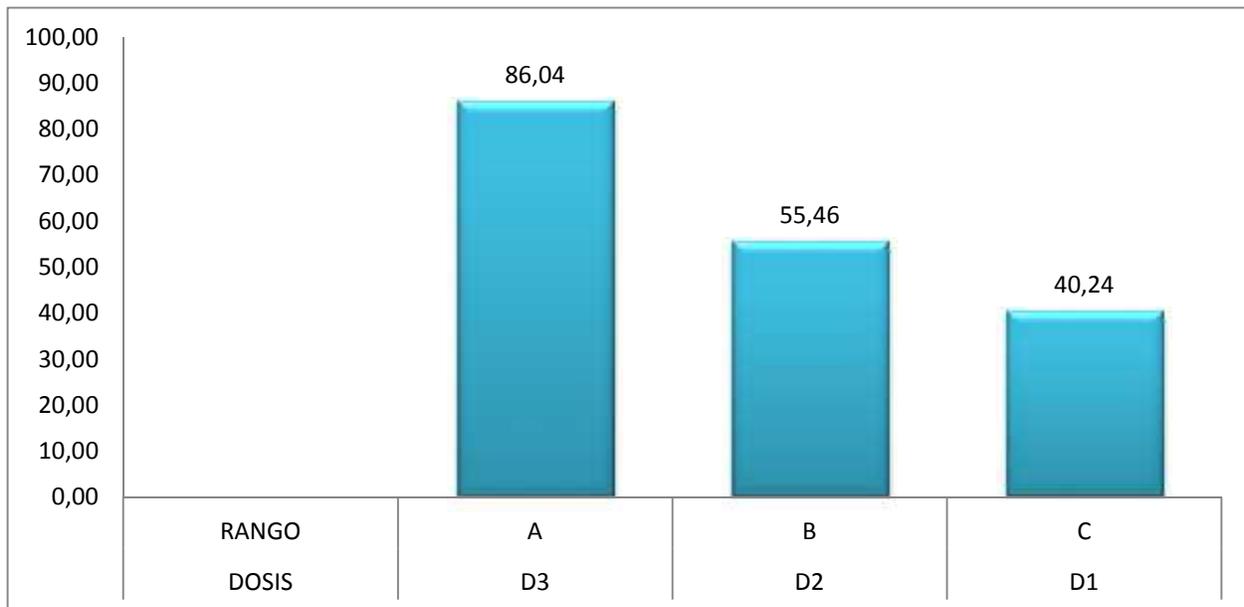
Elaboración propia

Se puede observar en la prueba que los tratamientos BD2, BD3, BD1, perdieron en su totalidad el efecto inhibitorio con un porcentaje de 0%

En los tratamientos AD3, AD2, OD3, OD3, FD3 con 92.57% a 69.66% de rango, tiene una diferencia significativa con los demás tratamientos testigos más significativos que están en el rango A se puede decir que en los hongos siendo los mejores tratamientos de inhibición de crecimiento según el análisis estadístico por acción del propóleo

Siendo el mejor tratamientos las Dosis D3 con una dosis de propóleo de 5ml de propóleo en los 4 hongos como la alternaría, el oídium, botrytis y el fusarium.

Cuadro 63
Prueba DMS Al 5% para el porcentaje de crecimiento del micelio de las dosis de propóleo a los 21 días

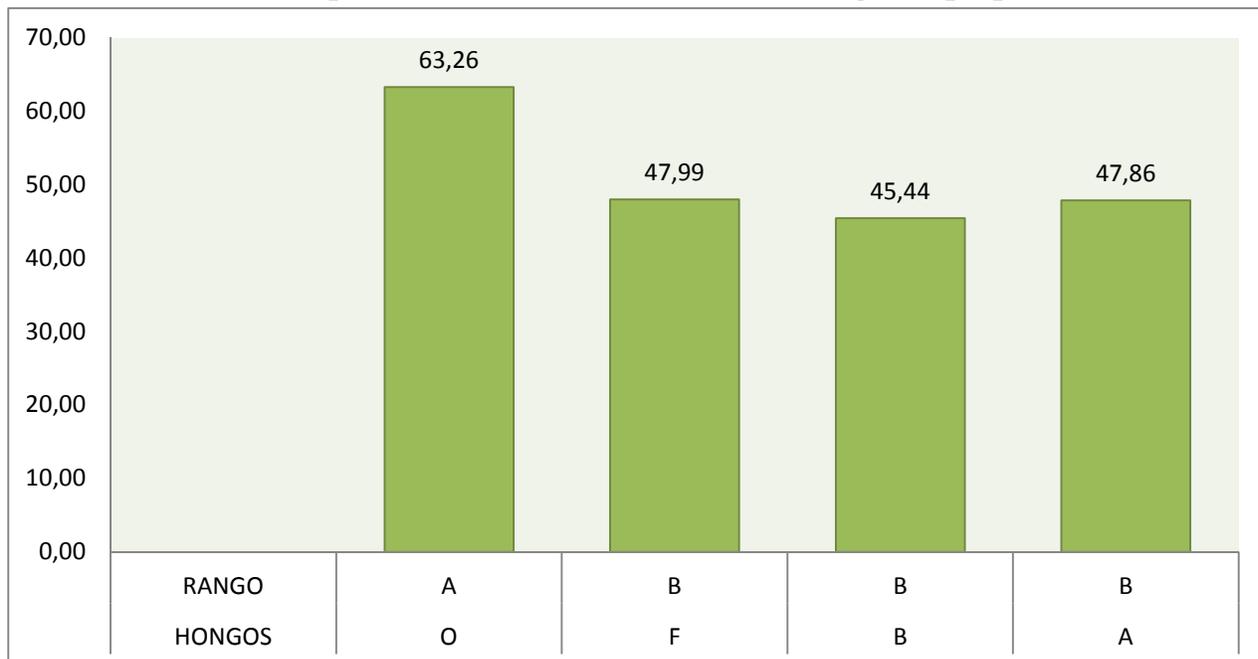


Fuente propia

En el cuadro se puede interpretar que la mejor dosis es la D3 que contiene 5ml de propóleo en la dosis siendo la mejor inhibidora de crecimiento en porcentaje con un dato de 86.04% de inhibición, teniendo un porcentaje similar en la dosis D2 con un contenido de 2,5ml de propóleo teniendo un porcentaje de inhibición de 55.46% y la dosis mínima que es la D1 con un contenido de 1,25ml de propóleo con un porcentaje de inhibición de 40.24%.

Siendo la mejor dosis la D3 y D2 manifestando su acción sobre los hongos estudiados en la investigación.

Cuadro 64
Prueba DMS al 5% para el diámetro del micelio de los hongos de propóleo a los 21 días

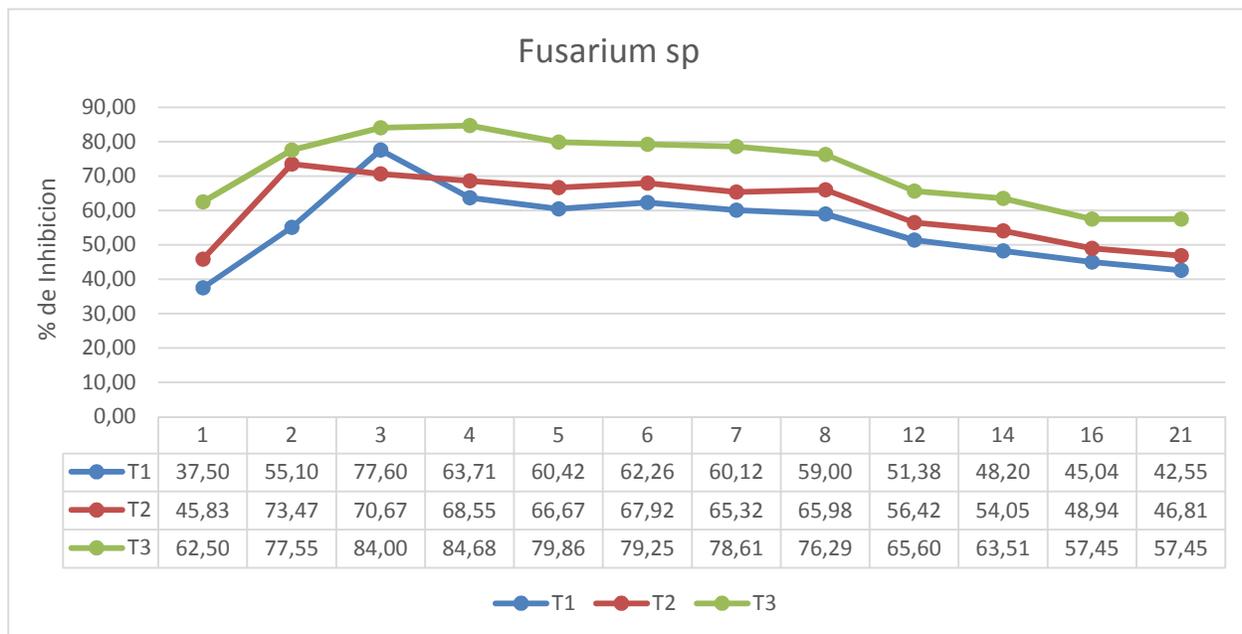


Elaboración propia

En el hongo oídium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 63.26% de media, seguido del hongo fusarium siendo el mayor porcentaje de 47.99% de media del porcentaje de inhibición de micelio, en el caso de la alternaría obtuvo un mayor porcentaje de inhibición del 47.86% de media.

4.1.4. GRAFICAS DE INHIBICIÓN DEL PROPÓLEO ANTE LOS HONGOS ESTUDIADO.-

Gráfica 1
Porcentaje De Inhibición del Fusarium



Se evidencio el efecto inhibitor del propóleo sobre la velocidad del crecimiento en los cuatro hongos.

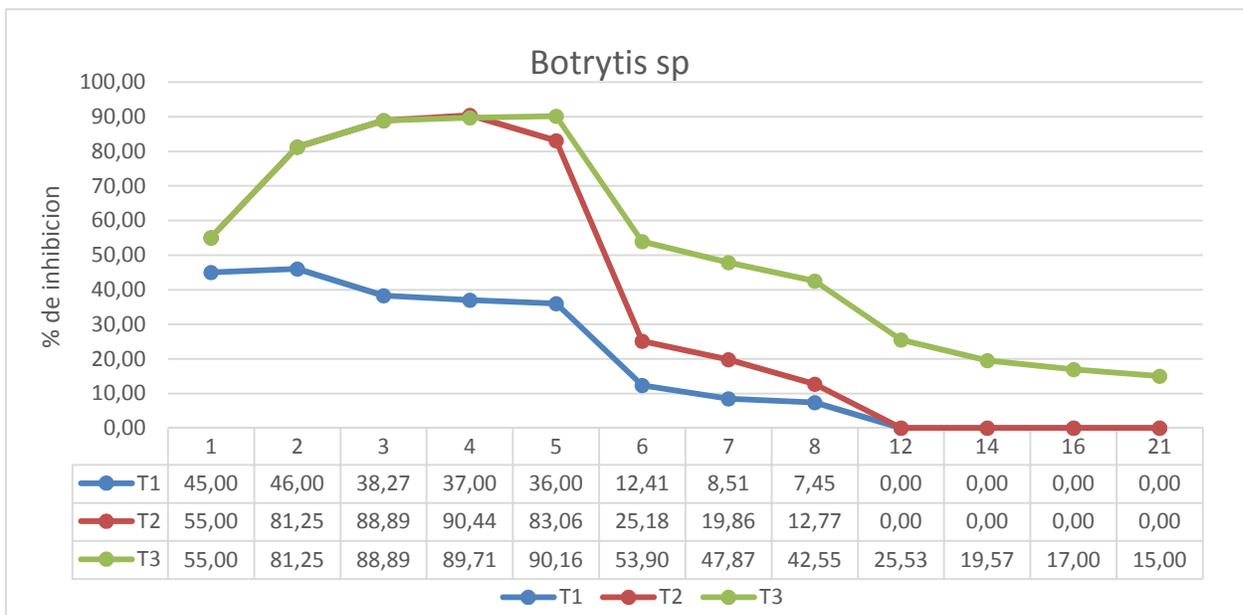
El efecto máximo del T1 se pudo observar en el tercer día con un efecto inhibitor del 77,60% siendo el pico máximo del efecto, también se puede apreciar que cuando pierde el efecto inhibitor con un 42,55% teniendo en cuenta su periodo de residualidad del propóleo.

En el efecto máximo de la dosis T3 alcanzo un pico en el día 3 y 4 con un porcentaje de inhiacion del 84 y 84,68% y un declive máximo desde el día octavo del 76,29%, también se puede apreciar cuando este pierde el efecto inhibitor el día 21 con un 57,45%, siendo el mejor tratamiento para el fusarium la dosis T3.

En el T2 se pudo apreciar una cúspide de control fúngico en el día 2 con un 73,47% siendo igual un tratamiento aceptable teniendo menos acción anti fúngica y reduciendo la misma en el octavo día y terminando el día 21 con un 46,81% observando una diferencia .

Se puede apreciar que todas las dosis acaban con su periodo de actuar uno más precoz que otros.

Gráfica2
Porcentaje de inhibicion del botrytis



El mejor tratamiento para el hongo botrytis es el T3 al 2% ya que al vigésimo primer día continua con el efecto inhibidor

El efecto máximo del T3 se pudo observar en el quinto día de la inoculación con un porcentaje de inhibición del 90,16%

El efecto máximo del T1 y T2 se pudo observar en el quinto día con 36,00% y 53,00%.

El mejor tratamiento para el hongo *botrytis* es el T3 al 2% ya que al quinto día se observó un porcentaje de inhibición del 90,16%

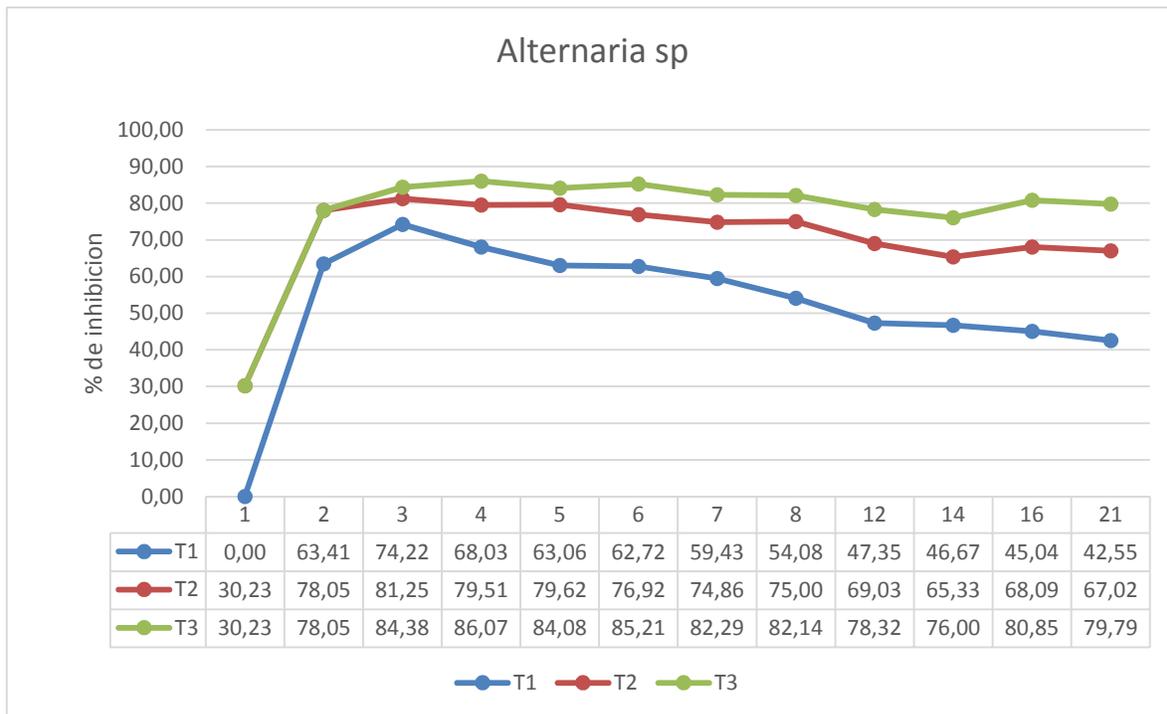
Al vigésimo primer día se observó que continúa el efecto inhibidor con un porcentaje de: T3 con 29,08%, T2 con 0,0%, T1 con 0,0%.

El T1 obtuvo un máximo efecto al segundo día con un porcentaje de inhibición del 46,00%, teniendo un control máximo el segundo día.

El T2 presento un efecto máximo al cuarto día con un porcentaje de inhibición de 89,71%, presentando un declive máximo el sexto día 25,18% y el décimo primer día termino su efecto al 0% resumiendo que a los seis días su periodo de acción inhibidora termina.

El quinto día se presenció un declive con el 36% de su porcentaje de inhibición de ahí bajo totalmente hasta el vigésimo primer día con un 29,08%.

Gráfica3
Porcentaje de inhibición del alternaria



El T1 obtuvo un efecto inhibitor del 63,41 % y una cúspide de efecto inhibitor del 74,22% y un efecto mínimo del 42,55% el día vigésimo primer.

Se evidencio el efecto inhibitor del propóleos sobre la velocidad del crecimiento en los cuatro hongos.

El efecto máximo del T2se pudo observar en el tercer día con un efecto inhibitor del 81,25% siendo el pico máximo del efecto, también se puede apreciar que cuando pierde el efecto inhibitor con un 67,02%%.

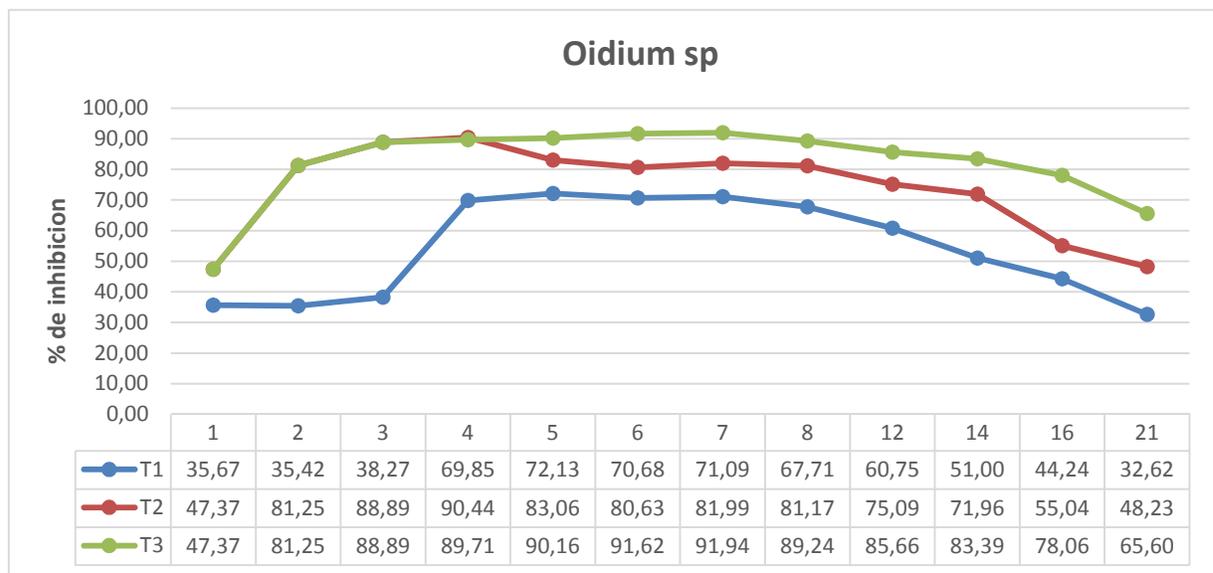
En el efecto máximo de la dosis T3 hubo un pico en el día 3 y 4 con un porcentaje de inhicion del 84,38 y 86,07% y un declive máximo desde el día octavo del 76,00%, también se puede apreciar cuando este pierde el efecto inhibitor el día 21 con un 79,79%, siendo el mejor tratamiento para el alternaria la dosis T3.

En el T2 se apreció una cúspide de control fúngico en el día 3 con un 81,25% siendo igual un tratamiento aceptable teniendo menos acción anti fúngica y reduciendo la misma en el octavo día y terminando el día 21 con un 67,02% representativamente la diferencia.

Se puede apreciar que todas las dosis acaban con su periodo de actuar uno más que otros.

El T3 mantenía su efecto inhibitor hasta el día 14 teniendo un periodo mucho más largo de persistencia.

Gráfica 4
Porcentaje de inhibición del oidium



El T1 tuvo un efecto inhibitor cúspide del 72,13% y un efecto mínimo del 32,62 % el día vigésimo primer.

Se evidencio el efecto inhibitor del propóleos sobre la velocidad del crecimiento en los hongos estudiados.

El efecto máximo del T2 se observar en el cuarto día con un efecto inhibitor del 90,44% siendo el pico máximo del efecto, también se puede apreciar que cuando pierde el efecto inhibitor con un 55,04%.

En el T2 se observó apreciar una cúspide de control fúngico en el día 3 con un 90,44% siendo igual un tratamiento aceptable teniendo menos acción anti fúngica y reduciendo la misma en el décimo cuarto día y terminando el día 21 con un 48,23% representativamente la diferencia.

En el efecto máximo de la dosis T3 obtuvo un pico en el día 6 y 7 con un porcentaje de inhibición del 91,62 y 91,94 % y un declive máximo desde el día vigésimo primer día del 65,60%, siendo el mejor tratamiento para el oídium la dosis T3.

Se puede apreciar que todas las dosis acaban con su periodo de actuar uno más que otros.

El T3 mantenía su efecto inhibitor hasta el vigésimo sexto día teniendo un periodo mucho más largo de persistencia.

Discusión

El los porcentajes de inhibición de crecimiento los datos obtenidos fueron muy favorables al estudio siendo en todos más de un 50% de inhibición en todos los hongos excepto en el día 21 para el hongo botrytis se perdió el efecto inhibitor no teniendo un trabajo igual para hacer la respectiva discusión se puede decir el rápido desarrollo del hongo lo caracteriza como antagonista ante otros.

4.2. CONTEO DE ESPORAS.-

Se contó esporas en una cámara de neubauer en el microscopio con un aumento de 10x

Cuadro 65
Conteo de esporas de la 1 repetición

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
fusarium	FD0	342000,00	340000,00	348000,00	1030000,00	343333,33
	FD1	306000,00	312000,00	308000,00	926000,00	308666,67
	FD2	246000,00	240000,00	242000,00	728000,00	242666,67
botrytis	FD3	150000,00	154000,00	152000,00	456000,00	152000,00
	BD0	102000,00	106000,00	108000,00	316000,00	105333,33
	BD1	86000,00	84000,00	84000,00	254000,00	84666,67
	BD2	72000,00	64000,00	72000,00	208000,00	69333,33
	BD3	72000,00	76000,00	72000,00	220000,00	73333,33
	AD0	34000,00	32000,00	38000,00	104000,00	34666,67
	AD1	28000,00	26000,00	30000,00	84000,00	28000,00
alternaría	AD2	24000,00	20000,00	22000,00	66000,00	22000,00
	AD3	8000,00	8000,00	4000,00	20000,00	6666,67
	ΣBlog.	1470000,00	1462000,00	1480000,00	4412000,00	122555,56
	CV					2,03

Elaboración propia

En el cuadro nos muestra los resultados conteo de esporas a los 21 días de la siembra en los medios de cultivos, obteniendo el conteo de esporas mediante el conteo en la cámara de neubauer.

En los tratamientos BD3 con una media de 73333,33u de esporas del hongo botrytis siendo el mínimo de contenido de esporas para este tratamiento contando solo las que se encontraban en el cuadrante segmentado que tiene la cámara de neubauer.

En el hongo fusarium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 152000,00u de media esporas siendo la mejor inhibición en el tratamiento D3, seguido del hongo alternaría siendo el mejor tratamiento de 6666,67u de media de esporas siendo el mejor en inhibición de esporas en 20 ml de solución preparada.

Cuadro 66
Tabla de anova del conteo de esporas a los 21 días

Fv	gl	SC	CM	Fc	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	47,00	437804888888,89			1,80	2,33	
BLOQUES	2,00	13555555,56	6777777,78	1,09	3,35	5,49	NS
TRATA	15,00	437604888888,89	29173659259,26	4694,21	2,08	2,83	**
ERROR	30,00	186444444,44	6214814,81		1,88	2,33	
Fact.hongos	4,00	411335555555,56	102833888888,89	16546,57	4,21	7,68	**
Fact.dosis	3,00	192268888888,89	6408962962,96	1031,24	2,96	4,69	**
hongos/dosis	12,00	7042444444,44	586870370,37	94,43	2,96	4,60	**

Elaboración propia

Al establecer el análisis de variancia para el porcentaje de regeneración, (Cuadro N° 66). En el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $1031,24F_c > 2,9F_t$ existe diferencia significativa, al 1% donde existe diferencia significativa de $1031,24F_c > 4,60F_t$.

En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $16546,57F_c > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $16546,57F_c > 7,68F_t$ existiendo significativamente diferencia.

En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $3,35F_t < 4694,21F_c$ y al $2,83F_t < 4694,21F_c$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $1,09F_c < 3,35F_t$ como en el 1% que expreso $1,09F_c < 5,49F_t$ existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis existió una diferencia significativa de $94,43F_c > 2,13F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo diferencia significativa de $94,43F_c > 2,93F_t$.

Siendo necesario hacer la prueba de MDS para determinar cuál será el mejor tratamiento y dosis.

Cuadro 67
Prueba de MDS del conteo a los 21 días



Elaboración propia

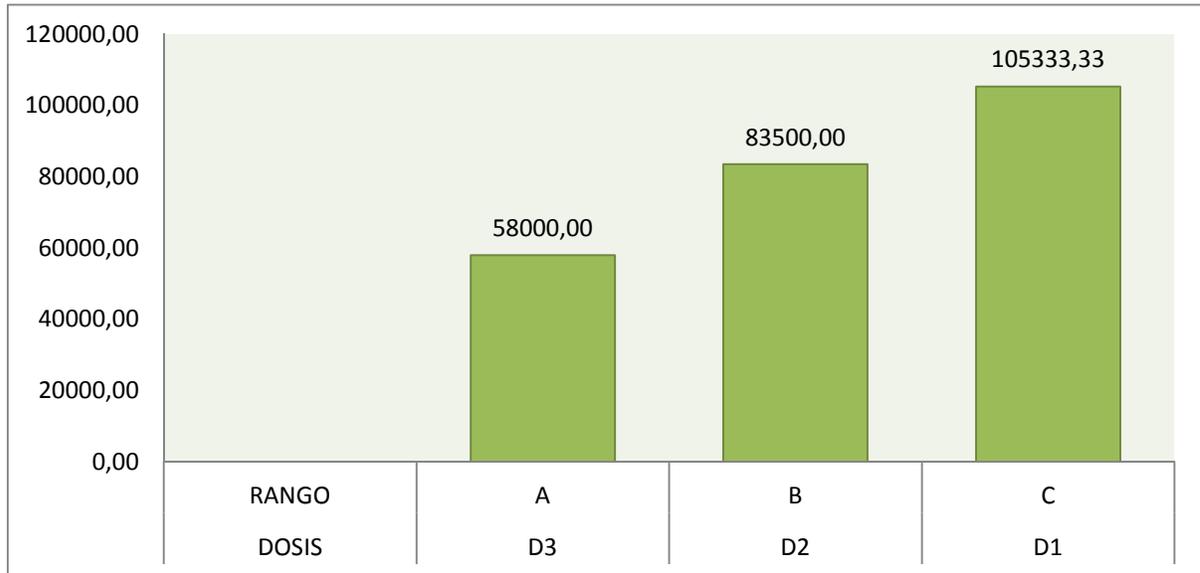
En la tabla se puede apreciar que los tratamientos con las dosis D3 fueron los que expresaron menor cantidad de esporas como el FD3 con un contenido de 152000u esporas a diferencia del testigo que presento 343333,33u de esporas presentando solo la diferencia significativa solo en la dosis D3.

En el hongo botrytis se no se expresó mucha diferencia siendo BD3 con un contenido de 69333,33u de esporas, el BD2 con un 73333,33u de esporas en el BD1 obtuvo también un dato de 69333,33u de esporas siendo los3 tratamientos recomendables.

En el hongo alternaría presencio una diferencia significativa en AD3 con 6666,67u de esporas, AD1 con 28000,00u esporas teniendo un rango de J, AD2 con contenidos de esporas 22000,00u teniendo mucha diferencia con el testigo con 34666,67u de esporas.

Siendo los mejores inhibidores como muestra el análisis los tratamientos D3 con 5ml de propóleo.

Cuadro 68
Prueba DMS al 5% para el conteo de esporas de las dosis de propóleo a los 21 días



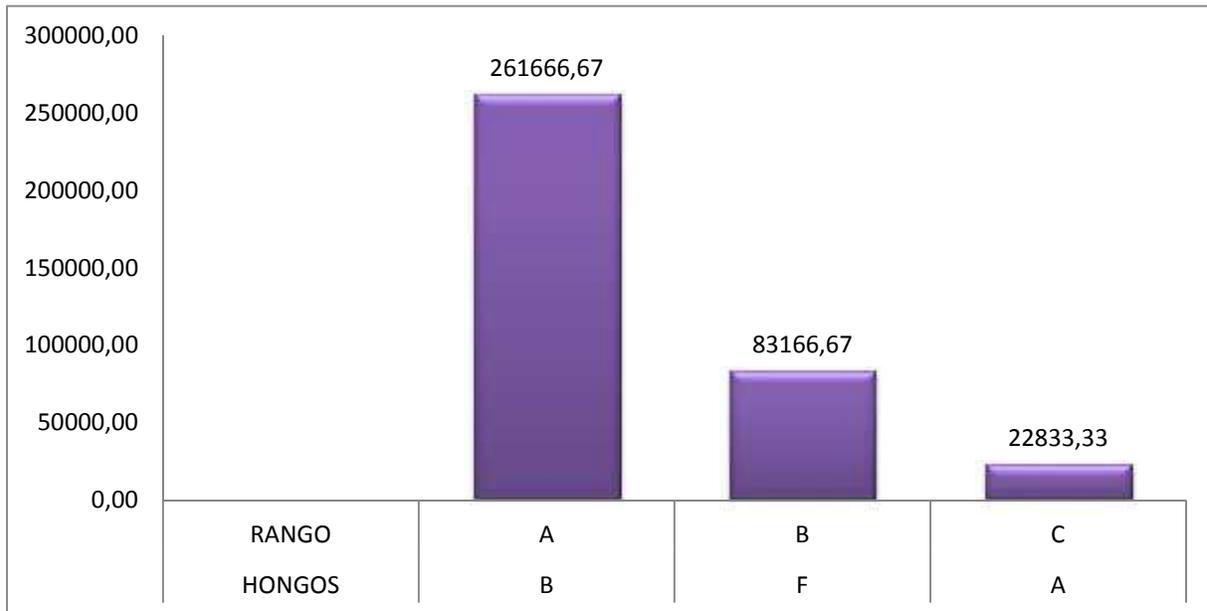
Fuente propia

En el conteo de esporas para observar cual es la mejor dosis se aprecia que el tratamiento D3 es el mejor con una inhibición mucho mayor de 58000,00 esporas sumadas todas las esporas de los tratamientos expresando que es una de las mejores dosis.

En la dosis D2 que tiene un contenido de 2,5ml de propóleo teniendo una sumatoria de esporas de todas las dosis D2 de 83500,00u esporas inhibiendo con mucha diferencia ante el tratamiento D3

En el tratamiento D1 obtuvo un contenido de esporas de la sumatoria es de 105333,33esporas siendo el mínimo de los datos obtenidos.

Cuadro 69
Prueba DMS al 5% para el conteo de esporas de los hongos a los 21 días



Legenda B= botrytis F=fusarium A=alternaria fuente propia

El que tuvo una mejor aceptación a las dosis del propóleo fue el hongo de la alternaria con una reducción de esporas del 22833,33u siendo diferente del hongo fusarium con un contenido de esporas del 83166,67u en 20ml de volumen disueltos, en el hongo botrytis se observó un mayor contenido de esporas 261666,67u.

Cuadro 70
Conteo de las esporas a los 21 días repeticion 2

	TRAT.	REPLICAS			Σ	X
		I	II	III		
fusarium	FD0	336000,00	338000,00	340000,00	1014000,00	338000,00
	FD1	308000,00	310000,00	308000,00	926000,00	308666,67
	FD2	246000,00	244000,00	242000,00	732000,00	244000,00
	FD3	150000,00	156000,00	154000,00	460000,00	153333,33
botrytis	BD0	98000,00	100000,00	96000,00	294000,00	98000,00
	BD1	88000,00	90000,00	86000,00	264000,00	88000,00
	BD2	64000,00	60000,00	62000,00	186000,00	62000,00
	BD3	72000,00	76000,00	72000,00	220000,00	73333,33
Alternaría	AD0	32000,00	30000,00	30000,00	92000,00	30666,67
	AD1	26000,00	24000,00	26000,00	76000,00	25333,33
	AD2	20000,00	20000,00	22000,00	62000,00	20666,67
	AD3	6000,00	10000,00	6000,00	22000,00	7333,33
	ΣBlog.	1446000,00	1458000,00	1444000,00	4348000,00	120777,78
	CV					1,36

Elaboración propia

En el cuadro nos muestra los resultados conteo de esporas de la repetición 2 a los 21 días de la siembra en los medios de cultivos, obteniendo el conteo de esporas mediante el conteo en la cámara de Neubauer.

En los tratamientos BD3 con una media de 73333,33u de esporas del hongo botrytis siendo el mínimo de contenido de esporas para este tratamiento contando solo las que se encontraban en el cuadrante segmentado que tiene la cámara de Neubauer.

En el hongo fusarium el mejor porcentaje de inhibición fue con un 98000,00u de media esporas siendo la mejor inhibición en el tratamiento D3, seguido del hongo alternaría siendo el mejor tratamiento de 7333,33u de media de esporas siendo el mejor en inhibición de esporas

Cuadro 71
Prueba de MDS al 5% a los 21 días

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	47,00	438546222222,22			1,80	2,33	
BLOQUES	2,00	9555555,56	4777777,78	1,77	3,35	5,49	NS
TRATA	15,00	438455555555,56	29230370370,37	10811,23	2,08	2,83	**
ERROR	30,00	81111111,11	2703703,70		1,88	2,33	
Fact. hongos	4,00	413692888888,89	10342322222,22	38252,42	4,21	7,68	**
Fact. dosis	3,00	16674888888,89	5558296296,30	2055,81	2,96	4,69	**
hongos/dosis	12,00	808777777,78	673981481,48	249,28	2,96	4,60	**

Elaboración propia

Al establecer el análisis de variancia para el porcentaje de regeneración, (Cuadro N° 71). Podemos establecer estadísticamente que los conteos presentan diferencias significativas entre los bloques. Tomando en cuenta el valor de la F calculada, podemos observar que son valores mayores que la F tabulada, pero se presentan diferencias altamente significativas entre los factores de hongos y dosis, por lo que es necesario llevar a cabo la comparación de medias.

En el factor dosis no existe una diferencia significativa al 5% con un dato de $2055.81F_c > 2,9F_t$ existe diferencia significativa, al 1% donde existe diferencia significativa de $2055.81F_c > 4,60F_t$.

En el factor de hongos se observó una diferencia significativa en el factor hongos con un dato de $38252.42F_c > 4,21F_t$ al 5% como también en el 1% se pudo obtener un dato de $38252.42F_c > 7,68F_t$ existiendo significativamente diferencia.

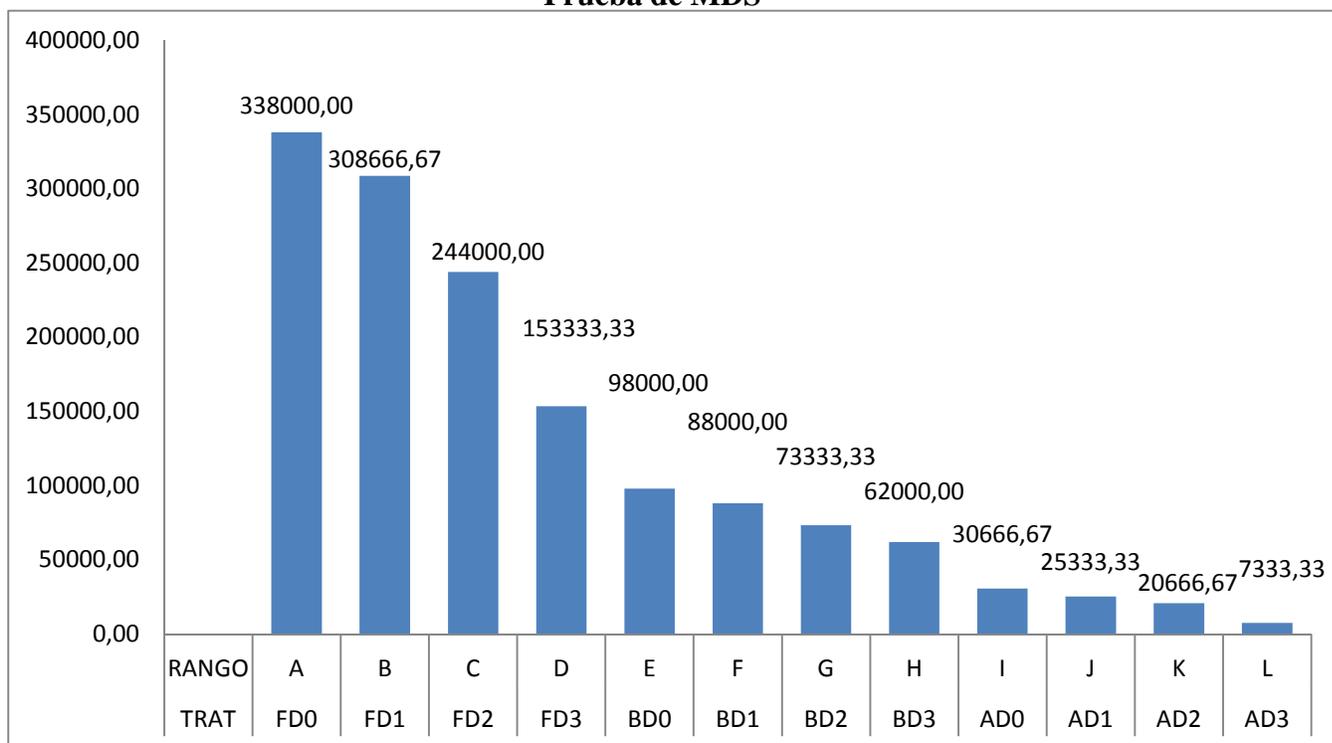
En los tratamiento se obtuvo al 5% una diferencia significativa del $3,35F_t 5\% < 10811.23F_c$ y al $2,83F_t 1\% < 10811.23$ siendo significativamente diferente en los dos porcentajes de la tabla.

En los bloques no existió una diferencia significativa en el 5% con un dato del $1.77F_c < 3.35F_t$ como en el 1% que expreso $1.77F_c < 5.49F_t$ existiendo diferencia significativa en los dos porcentajes.

En la relación de hongos/dosis existió una diferencia significativa de $249.28F_c > 2.13F_t$ en el 5% y en el 1% obtuvo diferencia significativa de $249.28F_c > 2.93F_t$.

Siendo necesario hacer la prueba de MDS para determinar cuál será el mejor tratamiento y dosis.

Cuadro 72
Prueba de MDS



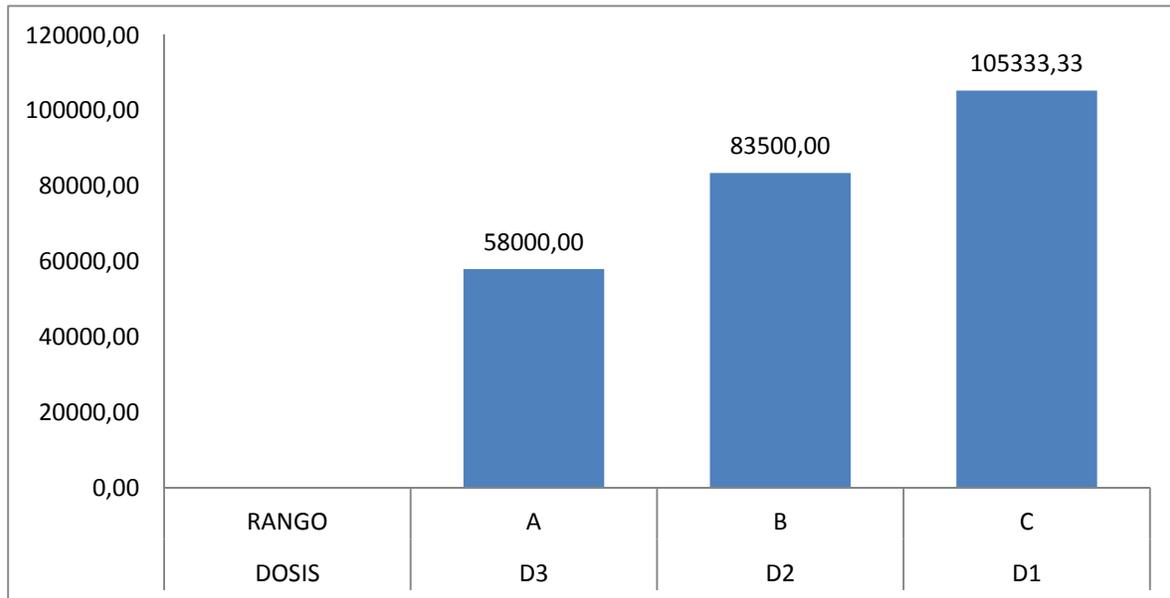
Elaboración propia

En la tabla se puede apreciar que los tratamientos con las dosis D3 fueron los que expresaron menor cantidad de esporas como el FD3 con un contenido de 153333,33u a diferencia del testigo que presento 338000,00u de esporas presentando solo la diferencia significativa solo en la dosis D3.

En el hongo botrytis se no se expresó mucha diferencia siendo BD3 con un contenido de 62000,00u de esporas, el BD2 con un 73333,33u de esporas en el BD1 obtuvo también un dato de 88000,00u de esporas.

En el hongo alternaría presencia una diferencia significativa en AD3 obtuvo 7333,33u de esporas, AD1 con 25333,33u de esporas, AD2 con 20666,67u de esporas

Cuadro 73
Prueba DMS al 5% para el conteo de esporas de las dosis de propóleo a los 21 días



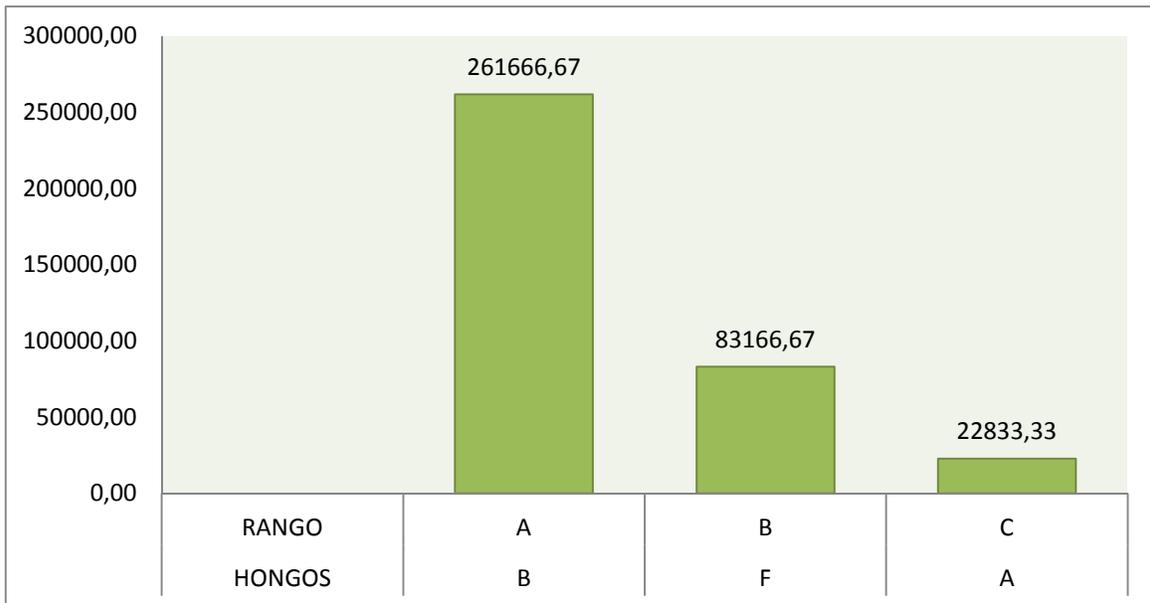
Elaboración propia

En el conteo de esporas para observar cual es la mejor dosis se aprecia que el tratamiento D3 es el mejor con una inhibición mucho mayor de 58000,00 esporas sumadas todas las esporas de los tratamientos expresando que es una de las mejores dosis.

En la dosis D2 que tiene un contenido de 2,5ml de propóleo teniendo una sumatoria de esporas de todas las dosis D2 de 83500,00u esporas inhibiendo con mucha diferencia ante el tratamiento D3

En el tratamiento D1 obtuvo un contenido de esporas de la sumatoria es de 105333,33 esporas siendo el mínimo de los datos obtenidos.

Cuadro 74
Prueba DMS al 5% para el conteo de esporas de los hongos a los 21 días



Leyenda B= botrytis F=fusarium A=alternaria fuente propia

El que tuvo una mejor aceptación a las dosis del propóleo fue el hongo de la alternaria con una reducción de esporas del 22833,33u siendo diferente del hongo fusarium con un contenido de esporas del 83166,67u en 20ml de volumen disueltos, en el hongo botrytis se observó un mayor contenido de esporas 261666,67u.

4.2.1. BIOENSAYOS.-

4.2.1.2. Porcentaje de incidencia.-

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

Cuadro 75
Porcentaje de incidencia a los 7 días

hongos	total	incidencia%
oídium	3	100
fusarium	3	100
alternaría	3	100
botrytis	3	100

Se infectó al 100% todas las plantas a los 7 días con los hongos fusarium botrytis oídium y alternaría, para luego aplicar el propóleo para buscar el porcentaje de inhibición

4.2.1.2. Porcentaje de inhibición.-

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

Cuadro 76
Porcentaje de inhibición a los 7 días

	plantas	total	% inhibición
<i>Oidium</i>	d1	1	100
	d2	1	100
	d3	1	100
<i>Fusarium</i>	d1	0	0,00
	d2	0	0,00
	d3	0	0
<i>Botrytis</i>	d1	1	100
	d2	1	100
	d3	0	0
<i>Alternaría</i>	d1	1	100
	d2	1	100
	d3	1	100

Se tuvo 3 plantas por cada dosis siendo el total de 36 plantas, teniendo el mejor porcentaje del hongo oídium inhibiendo al 100% en todas las dosis siendo en la D1, D2, D3 siendo todas las dosis las mejores para el control del hongo oídium.

En el hongo fusarium en la dosis D1 no tuvo ninguna inhibición como en la dosis D2, D3 que no existió inhibición alguna.

Para el hongo botrytis presento una inhibición en la dosis D1 y en la D2 del 100% en la D3 no presento cambios ante la aplicación del fungicida.

En el hongo alternaría manifestó una inhibición luego de la aplicación a los 7 días del 100% en todos las dosis.

V. CONCLUSIONES.-

- Se identificó y se aisló en medio PDA las cepas de los géneros *alternaria*, *oídium*, *botrytis* y *fusarium*.
- El mejor porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio para el *oídium sp.* se obtuvo en el séptimo día con la dosis D3 (2% de propóleo) obteniéndose un 91.94%, manteniéndose hasta el décimo cuarto día y bajando a 65.60% en el vigésimo primer día.
- El mejor porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio para la *fusarium sp.* se obtuvo en el cuarto día con la dosis D3 (2% de propóleo) obteniéndose un 84.68%, manteniéndose hasta el décimo segundo día y bajando a 57.45% en el vigésimo primer día.
- El mejor porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio para la *alternaria sp.* se obtuvo en el quinto día con la dosis D3 (2% de propóleo) obteniéndose un 90.16%, manteniéndose hasta el octavo día y bajando a 15% en el vigésimo primer día.
- El mejor porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio para la *botrytis sp.* se obtuvo en el cuarto día con la dosis D3 (2% de propóleo) obteniéndose un 86.07%, manteniéndose hasta el décimo sexto día y bajando a 79,79% en el vigésimo primer día.
- El mejor control de la inhibición de la producción de esporas, se lo obtuvo con las Dosis 3 (2% de propoleo) con 58.000, en comparación con Dosis 2 (1% de propoleo) con 83.500 y la Dosis 1 (0.5% de propoleo) con la mayor cantidad de 105.333 esporas.

VI. RECOMENDACIONES.-

- Se recomienda realizar, la esterilización de los materiales de vidrio y medios de cultivos, ya que se asegura un estado de asepsia que permite trabajar sin dificultades cuando se ejecuta en forma eficiente.
- Se recomienda que en el conteo de esporas, es necesario tomar más de un dato para reducir el margen de error.
- Se encomienda elaborar un trabajo similar, pero que se incluyan otros hongos para probar su efecto fungicida en laboratorio
- Se encomienda también que se realice otro trabajo similar probando las dosis en campo, teniendo un porcentaje de incidencia en parcelas.
- Se recomienda sí se quiere inocular los hongos estudiados siempre hacer más de tres aislamientos seguidos del explanto usados
- La humedad es fundamental para el desarrollo porque cuando esta comienza a disminuir la formación del micelio también disminuye y se tiene que asegurar subsistencia del hongo formando estructuras propagativas como esporas.
- Muchas veces es posible identificar con seguridad al hongo responsable de una determinada o enfermedad por observación directa de los síntomas y/ o signos en los órganos afectados; también la especie de la planta hospedante puede ser determinante para saber.
- Además una sola especie vegetal puede ser atacada por patógenos diferentes que le inducen síntomas similares
- Se hace necesario realizar una serie de actividades que conducen a la identificación del hongo causante de la enfermedad.
- Los hongos se reproducen por esporas, formadas en estructuras conocidas como conidióforos, ascocarpos, basidios, etc. Las cuales son empleadas para la correcta identificación de estos organismos; tales estructuras pueden observarse directamente sobre la superficie del órganos vegetal afectado o dentro de los tejidos incluso intercelularmente

- El alcohol es utilizado para desinfectar la cámara de flujo laminar así como de las superficies de trabajo, se debe desinfectar todo antes de proceder, así como las manos se deben empapar en alcohol y colocarse los guantes quirúrgicos.
- La estufa no se debe abrir con mucha frecuencia y se debe controlar la temperatura ambiente siempre que esta esté menos de los 22C.
- El alcohol es utilizado para desinfectar la cámara de flujo laminar así como de las superficies de trabajo, se debe desinfectar todo antes de proceder, así como las manos se deben empapar en alcohol y colocarse los guantes quirúrgicos.
- La estufa no se debe abrir con mucha frecuencia y se debe controlar la temperatura ambiente siempre que esta esté menos de los 22C.