

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Evaluación de tres extractos vegetales elaborados en base a
(Manzanilla, Ajo y Romero) para la inhibición del crecimiento de
*Fusarium oxysporum***

Fausto Daniel Salinas Tamayo

Ingeniería en Agroempresas

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniería en Agroempresas

Quito, 18 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Evaluación de tres extractos vegetales elaborados en base a (Manzanilla, Ajo y Romero) para la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum*

Fausto Daniel Salinas Tamayo

Nombre del profesor, Título académico

Mario Caviedes, Ph D

Quito, 18 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Fausto Daniel Salinas Tamayo

Código: 00132513

Cédula de identidad: 1721299608

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El trabajo de titulación realizado en el Laboratorio Experimental de Agronomía en las instalaciones de la Universidad San Francisco de Quito, fue llevado a cabo con el objetivo de evaluar la capacidad antifúngica de tres extractos vegetales a base de Manzanilla (*Chamaemelum nobile*), Ajo (*Allium sativum*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), para el control de *Fusarium oxysporum*; a través de un diseño experimental completamente al azar utilizando seis tratamientos y once repeticiones para la variable relacionada con el crecimiento micelial en (cm) y seis tratamientos con tres repeticiones para la variable unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Por otro lado, para la obtención de los extractos vegetales se realizó un ultrasonido; seguido de una esterilización e incorporación del 5% y 10 % del extracto vegetal al medio de cultivo con PDA, para su distribución en cajas Petri. Se colocó en el centro de las cajas un disco de 0.9 cm² con el hongo estudiado para su incubación a 25 °C. Los resultados obtenidos demostraron los extractos evaluados de ajo, manzanilla planta entera y manzanilla flor; poseen un efecto inhibitorio en relación con el crecimiento micelial y la esporulación de *Fusarium oxysporum*, al usarse concentraciones de 5 y 10 %. Adicionalmente, romero hojas y romero tallo tuvieron un efecto inhibitorio mediano en comparación con los tres extractos mencionados anteriormente.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, extractos vegetales, control alternativo, esporas, micelial, antifúngico, hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

The degree work carried out in the Experimental Laboratory of Agronomy at the facilities of the San Francisco University of Quito, was carried out with the aim of evaluating the antifungal capacity of three vegetable extracts based on Chamomile (*Chamaemelum nobile*), Garlic (*Allium sativum*), Rosemary (*Rosmarius officinalis*), for the control of *Fusarium oxysporum*; through a completely randomized experimental design using six treatments and eleven repetitions for the variable related to mycelial growth in (cm) and six treatments with three repetitions for the variable colony forming units (CFU / ml). On the other hand, an ultrasound was performed to obtain the plant extracts; followed by sterilization and incorporation of 5% and 10% of the plant extract into the culture medium with PDA, for distribution in Petri dishes. A 0.9 cm² disk with the studied fungus was placed in the center of the boxes for incubation at 25 ° C. The results obtained demonstrated the evaluated extracts of garlic, whole plant chamomile and flower chamomile; they have an inhibitory effect in relation to mycelial growth and sporulation of *Fusarium oxysporum*, when using concentrations of 5 and 10%. Additionally, rosemary leaves and stem rosemary had a medium inhibitory effect compared to the three extracts mentioned above.

Key words: *Fusarium oxysporum*, plant extracts, alternative control, spores, mycelia, antifungals, phytopathogenic fungi.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I: Introducción.....	11
1.1 Antecedentes.....	11
1.2 Justificación.....	12
Capítulo II: Marco teórico	14
2.1 Extractos vegetales en el mundo.....	14
2.2 Descripción extractos vegetales	14
2.2.1 Manzanilla (<i>Chamaemelum nobile</i>).....	14
2.2.2 Ajo (<i>Allium sativum</i>)	15
2.2.3 Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	16
2.3 Importancia <i>Fusarium</i> spp.....	17
2.4 Importancia de usar biofungicidas, en relacion con fungicida químicos.....	18
2.5 Extractos vegetales como alternativa economica	18
Capítulo III: Objetivos e hipótesis.....	20
3.1 Objetivo general.....	20
3.2 Objetivos específicos	20
3.3 Hipótesis.....	20
Capítulo IV: Materiales y métodos	21
4.1 Material biológico	21
4.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	21
4.1.2 Extractos vegetales.....	21
4.2 Fase de campo	21
4.2.1 Preparación de los extractos vegetales.....	21
4.2.2 Ultrasonido	22
4.2.3 Esterilización de los extractos vegetales.....	22
4.3 Equipos.....	22
4.3.1 Autoclave	22
4.3.2 Cámara de flujo laminar	23
4.3.3 Cámara de bioseguridad	23
4.4 Métodos de laboratorio.....	24
4.4.1 Multiplicación de <i>Fusarium oxysporum</i>	24
4.4.2 Siembra de <i>Fusarium oxysporum</i>	24
4.4.3 Medio de cultivo más extracto	24
4.4.4 Bioensayo	25
4.5 Método estadístico.....	26
4.5.1 Diseño experimental.....	26
4.5.2 Prueba de rango múltiple de Duncan.....	27
4.6 Variables de respuestas	27
4.6.1 Crecimiento micelial	27
4.6.2 Unidades formadoras de colonias.....	27
Capítulo V: Resultados.....	29
5.1 Crecimiento micelial en (cm) con 5% de extracto vegetal.	29
5.2 Unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 5% de extracto vegetal.	30
5.3 Unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 10% de extracto vegetal.	32
Capítulo VI: Discusión	34
6.1 Variable: Crecimiento micelial del hongo estudiado, medido en (cm).	34

6.2 Variable: Unidades formadores de colonias (UFC/ml)	36
Capítulo VII: Conclusiones y recomendaciones.....	38
7.1 Conclusiones	38
7.2 Recomendaciones	39
Capítulo VIII: Referencias bibliográficas	40
Capítulo IX: Anexos	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. ANOVA del crecimiento micelial en (cm) con 5% de extracto vegetal.....	29
Tabla 2. Prueba de rango múltiple de Duncan del crecimiento micelial en (cm) con 5% de extracto vegetal más control.	29
Tabla 3. Prueba de rango múltiple de Duncan del crecimiento micelial en (cm) con 5% de extracto vegetal sin control.	30
Tabla 4. ANOVA de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 5% de extracto vegetal.....	31
Tabla 5. Prueba de rango múltiple de Duncan de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 5% de extracto vegetal más control.	31
Tabla 6. Prueba de rango múltiple de Duncan de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 5% de extracto vegetal sin control.	32
Tabla 7. ANOVA de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 10% de extracto vegetal.....	32
Tabla 8. Prueba de rango múltiple de Duncan de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 10% de extracto vegetal más control.	33
Tabla 9. Prueba de rango múltiple de Duncan de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 10% de extracto vegetal sin control.	33
Anexo 1A. Crecimiento micelial de los extractos vegetales evaluados al 5%.....	44
Anexo 1B. Unidades formadoras de colonias de los extractos vegetales evaluados al 5%	44
Anexo 2B. Unidades formadoras de colonias de los extractos vegetales evaluados al 10%	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Crecimiento micelial en (cm)	44
Anexo 1A. Crecimiento micelial de los extractos vegetales evaluados al 5%	44
Anexo B: Unidades formadoras de colonias (UFC/ml)	44
Anexo 1B. Unidades formadoras de colonias de los extractos vegetales evaluados al 5%	44
Anexo 2B. Unidades formadoras de colonias de los extractos vegetales evaluados al 10%	45
Anexo C: Comparación extracto vegetal versus testigo	45
Ajo planta entera vs testigo	45
Manzanilla flor vs testigo	46
Manzanilla planta entera vs testigo	46
Romero tallo vs testigo	47
Romero hojas vs testigo	47

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La agricultura por siglos ha mantenido una lucha constante contra los hongos fitopatógenos; causantes de epidemias que afectan varios cultivos en campo (desde su siembra hasta la cosecha) y en post cosecha con mayor intensidad generando grandes pérdidas económicas alrededor del mundo. Siendo los fenómenos naturales tales como: ventiscas, heladas, temperaturas elevadas, entre otros promotores de problemas agrícolas. Los cuales impactan de manera directa en los cultivos al existir un cambio climático repentino, en donde se forma un microclima el cual es adecuado para el incremento de enfermedades por existir una mayor humedad relativa o una temperatura óptima incentivando el desarrollo de hongos (García, 2004).

Los hongos fitopatogénicos generalmente son agresivos cuando atacan al cultivo afectándolo y dificultando su control inmediato. Existen varias alternativas para el manejo de estas enfermedades como hongos benéficos, como, por ejemplo: *Trichoderma* spp. La cual es capaz competir contra hongos patogénicos por parasitismo a largo plazo. Los agrónomos generalmente buscan soluciones inmediatas en los cultivos por lo que este tipo de soluciones biológicas no son prioritariamente consideradas. Generalmente tienden a realizar varias aplicaciones de fungicidas, pesticidas en busca de resultados inmediatos, provocando contaminación a largo plazo en el cultivo; perdiendo efectividad por resistencias adquiridas o simplemente en áreas aledañas como hogares, comunidades hasta llegar al consumidor (Cavallini, 1998).

En el mundo en el año 2017 se han utilizado cerca de 4113591.25 toneladas (t) de plaguicidas. De los cuales en Asia se utilizaron cerca de 215999.01 t representado el 52.5 % del uso global de plaguicidas, seguido del continente americano donde se utilizaron 1328003.4 t representando el 32.3 % del total. Europa utilizó alrededor de 476138.2 t es decir el 11.6%, finalmente África y Oceanía representan el 3.6 % con 79787.2 y 69669.4 t utilizadas respectivamente (FAOSTAT, 2019).

Un factor que actualmente el agrónomo ve como problema principal en sus planes maestros de manejo son las regulaciones impuestas por los países limitando o restringiendo el uso de agroquímicos, por las alta contaminación y los residuos que estos causan al medio ambientalmente. Por lo que, los biofungicidas aportan para disminuir la carga contaminante en los ecosistemas, evitando que la contaminación llegue a mantenerse hasta el producto final y pueda ofertar un producto sano; en este grupo de biofungicidas podemos encontrar los extractos vegetales (Rojas, 2016).

Fusarium sp. es un patógeno transmitido por el suelo a través de micelio o esporas siendo el principal causante de una gran cantidad de enfermedades de importancia económica alrededor del mundo, a través de la producción de sustancias tóxicas promotoras de su virulencia. Por ejemplo: *Fusarium oxysporum* es causante de marchitez en cultivos, *Fusarium solani* ligado a la podredumbre del tallo, raíz y producción de micotoxinas en la semilla (Agrios, 2005). Además, este hongo es encontrado de forma saprofita en varios cultivos como solanáceas, hortalizas, cucurbitáceas entre otros. En su sintomatología también puede existir un marchitamiento, ligado al amarillamiento ligero de las hojas (partes cloróticas), disminución del tamaño de las plantas y crecimiento, hasta llegar a la muerte de la planta (Garcés, 2001).

1.2 Justificación

En el Ecuador el uso de extractos vegetales no es utilizado en sistemas agrícolas, siendo de importancia nula o mínima en planes maestros relacionados con el manejo y control de patógenos, enfermedades, insectos. Antiguamente este tipo de herramientas eran implementados un manejo diario de cultivos tradicionales obteniendo resultados eficientes. Lo cual ha perdido fuerza por la introducción de agroquímicos a través de los años y el paso de un manejo tradicional a uno convencional por parte de los agricultores (Porcuna, 2007).

Las plantas siendo organismos vivos se encuentran asociados a plagas y enfermedades durante toda su etapa fenológica llegando hasta su senescencia. Los hongos patógenos

de plantas generan pudriciones, manchas, pérdida de vigor, tanto en tallos y frutos; afectan el desarrollo y la calidad de las cosechas, ocasionando grandes pérdidas económicas al productor; es por eso por lo que se realizan aplicaciones de fungicidas buscando un control inmediato de enfermedades y lograr disminuir su incidencia, bajando así el riesgo relacionado con las pérdidas en los distintos cultivos (Becerra, 2010).

Una alternativa amigable para el ambiente utilizada en el manejo y control de la enfermedad mencionada consiste en el uso de extractos vegetales, éstos promueven la producción limpia, ofreciendo resultados de efectivos. Igualmente, el uso de extractos vegetales reduce de forma progresiva la dependencia a los productos químicos lo cual ayuda directamente a los costos de producción del agricultor, aportando una alternativa sana, segura y efectiva (Celis y otros, 2008).

Además, es importante recalcar que, para un manejo óptimo de plagas y enfermedades en cualquier cultivo, siempre es necesario realizar un monitoreo preventivo diario o semanal analizando la incidencia de plagas y enfermedades; para realizar aplicaciones de productos químicos o biológicos, ya que no existe un control cien por ciento eficiente. La opción de usar productos biológicos con acción fungicidas en donde la materia activa generalmente es un microorganismo es otra solución amigable al ambiente (Miret, 2005).

Los extractos vegetales estudiados en esta investigación fueron manzanilla (*Chamaemelum nobile*), ajo (*Allium sativum*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) son productos fáciles de obtener en el mercado, a precios accesibles; ya que son de uso cotidiano tanto como plantas alimenticias o como fuente para la elaboración de productos farmacéuticos. Además, en relación con el modo de obtención de los extractos vegetales de las distintas especies mencionadas anteriormente estos pueden ser realizados en forma casera a través de infusiones o maceración. También se puede realizar el proceso de extracción en laboratorio aplicando etanol a distintos porcentajes con ruptura celulares, por medido del sistema Soxhlet, destilación de solventes, entre otros (Carrión, 2010).

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Extractos vegetales en el mundo

Históricamente el uso de extractos vegetales ha pasado de una generación a otra a través del tiempo, estos eran usados principalmente para el control de roedores, en tratamientos medicinales, para controlar insectos - plagas y la conservación de víveres almacenados. Las principales civilizaciones que implementó el uso de extractos vegetales como una estrategia de control fueron los griegos, hindúes, romanos y chinos (Kagale, 2004).

Siendo, los insecticidas naturales una alternativa a los plaguicidas, ya que provienen directamente de los derivados o de compuestos que algunas plantas han desarrollado de forma natural como mecanismos de defensas en contra de agentes externos que las atacan como bacterias, hongos, insectos, etc. Estos son compuestos que ayudan al control de agentes fitopatógenos a través de ingredientes activos naturales de las plantas entre los cuales podemos encontrar: la saponina, taninos, alcaloides, triterpenoides, entre otros (Delgado, 2016).

2.2 Descripción extractos vegetales

2.2.1 Manzanilla (*Chamaemelum nobile*)

La manzanilla perteneciente a la familia Astereaceae, es una planta nativa de la Península Ibérica y del sur de Francia, fue utilizada principalmente por su valor medicinal y comestible. En la actualidad, esta planta se encuentra distribuida en Europa, Sur oeste de Asia, Norte América, algunos países de Sur América como Ecuador, Colombia, Chile, entre otros. *Chamaemelum nobile* comúnmente conocida como manzanilla fina, manzanilla romana, camomila de jardín, es una hierba perene con

propiedades antifúngicas, insecticidas, antibacteriano, antiinflamatorio, antioxidante y muchos efectos más (Ríos, 2008).

Esta planta también es usada en la fabricación de cervezas, aceites, aromatizantes, decoración, fármacos siendo una parte importante de la agroindustria (Esmail, 2016). Además, presenta efectos citotóxicos los cuales actúan sobre el ciclo celular, funciones metabólicas y crecimiento de hongos (Parra, 2000). Existen reportes de especies de manzanillas implementadas para el control in vitro de *Fusarium sp.* con porcentajes inhibición micelial del 73.4% respectivamente (Carranza, 2017).

La manzanilla es una hierba pubescente con una altura de 10 a 30 cm, posee un aroma agradable, sus brotes se presentan de forma descendente o ascendente salientes desde la base. También, posee hojas sésiles, oblongas de 1.5 a 5 cm de largo. Además, tiene de 2 a 3 pinnatisectos de forma lineal, pedúnculos de 2 a 4 cm de largo. Tiene un capítulo con un ancho de 1.8 a 2.5 cm, filarias oblongas con un largo de 3 a 5 mm y ancho de 1.5 a 2 mm; con márgenes escariosos y presencia de vellosas en el nervio central. Receptáculo cónico de color pálido, con una pálea oblonga y con quillas. Lígulas blancas de 7 a 10 mm de largo, flósculos de disco amarillos, tubo de la corola basal e hinchado de forma pilosa. Finalmente posee cipselas ovoides, lisas de 1 a 1.5 mm de largo (Qaiser, 2002).

2.2.2 Ajo (*Allium sativum*)

El ajo (*Allium sativum*) conocido como: ajo de huerta, garlic, alho, ail, entre otros. Es de origen asiático, propia del antiguo Turkestán (actualmente conocido como Afganistán e Irán); limitando con China. Este cultivo se expandió por toda la zona de China e India avanzando al este y norte de Europa; y por el mediterráneo hacia el oeste (Sinavimo, 2020). Además, fue introducida a América por la conquista española. Históricamente, el ajo fue parte de la dieta alimenticia en Grecia como fuente energética, en Roma como parte del arte culinario. En Edad la Edad Media se utilizó exitosamente en contra de grandes plagas y en el siglo XX fue un antiséptico vital para

las infecciones causadas por heridas de combate en la Primera Guerra Mundial (Moreno, 2012).

Con respecto al ajo se ha estudiado los compuestos acuosos del ajo (ajoene) como propiedades antifúngicas al prevenir desarrollo de hongos en muestras de suelos afectando el crecimiento micelial. Presentando un efecto asociado a la inhibición de la biosíntesis de los lípidos polares o fosfolípidos (Ledezma, 2006). Por otro lado, los extractos etanólicos de ajo presentan un alto valor antifúngico del 95% en relación con la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Villa, 2014).

El ajo perteneciente a la familia de las liliáceas es una planta bianual con una altura que llega hasta los 40 a 60 cm. En la cabeza del ajo (bulbo) se encuentran de 5 a 15 hojas membranosas estériles que no forman bulbos en sus axilas y de 1 a 8 hojas fértiles donde se forman entre 7 a 30 bulbos o dientes. Cada bulbo presenta una hoja coriácea (blanquecina) como protección, además presentan diversos tamaños y colores (rosado, púrpura o blanco), los cuales varían acuerdo al bulbo principal. Las hojas son largas, alternas comprimidas sin presencia de nervios aparentes. El tallo es subsónico y hueco alcanzando un desarrollo de 40 a 50 cm; del cual se origina un tallo floral terminando en una inflorescencia en forma de umbela de color rosado el cual fructifica para la producción de semilla. La raíz es fasciculada, blanca y tierna la cual llega hasta una profundidad de 50 cm (Quiroga, 1990).

2.2.3 Romero (*Rosmarius officinalis*)

El romero es una planta originaria de la cuenca del mediterráneo, nativa de Irán y cultivada por su propiedades medicinales y ornamentales. *Rosmarius officinalis* también conocida como romero, romaní, rosmarín, hombre viejo, planta polar y rosa marina. Además, históricamente en el año 1300 se destiló romero obteniendo aceite esencial. En el siglo XVI se implementó para el desarrollo de cosméticos a atribuyó propiedades de eterna juventud. En Europa se adoptó al romero como planta medicinal para tratamientos como la gota, crecimiento de cabello, quitaba mareos, controlaban la parálisis y era colocada en ataúdes como simbolismo de recuerdo y fidelidad (Mejía, 2006).

Además, el romero es una planta perene con propiedades antimicrobianas, fúngicas, aromática y medicinal originario del Mediterráneo. El romero es utilizado como aceite esencial en procesos agrícolas, ya que tiene altos contenidos de α -pinene, camphor, 1,8-cineole, camphene, monoterpenes. Los cuales poseen efectos de inhibición micelial en *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* var. *coeruleum*, *Fusarium sulphureum* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Pitarokili, 2008).

El romero es un arbusto perennifolio que va desde los 0.60 hasta 1.60 metros; es monoico con una corteza de color pardo. Posee unas hojas simples opuestas de 15 por 3 mm, coriáceas, lineares; de color verde oscuro en el haz y plateado en el envés. Su inflorescencia es verticilastros laxos ubicados en la axila de las hojas, las cuales se encuentran en los extremos de las ramas. Las flores son hermafroditas de 5 mm; cáliz verde con una corola bilabiada de color azul violáceo pálido; con 5 lóbulos 3 inferiores de los cuales el central es el más grande y 2 lóbulos superiores. También posee 2 estambres con filamentos largos y un ovario súpero (Martínez, 2007).

2.3 Importancia *Fusarium* spp.

Los hongos pertenecientes al genero *Furarium* spp. son un grupo de ascomicetos filamentosos encontrados alrededor del mundo. Generalmente a este hongo oportunista se lo puede encontrar en el suelo y plantas. Este tipo de hongos son de gran importancia economica en varios sectores como en farmaceutico, quimico, entre otros. Destacando en el sector agricola, debido a su fitopatogenicidad en varias especies causantes de grandes perdida economica en cultivos. Existen más de cien especies descritas de *Fusarium* spp. de las cuales 12 especies son toxicas para el ser humano en especial en pacientes inmunodeprimidos con altos indices de mortalidad; de los cuales podemos encontrar: *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticilloides* (Tapia y Amaro, 2014).

La amplia distribución del *Fusarium* spp. en el mundo se debe por su capacidad de desarrollo en varios sustratos y su facil diseminación por factores como el agua a través de lluvias y el viento capaz de llevar esporas a unos 400 kilomentros de distancia

(Monzón y Rodríguez, 2018). Por otro lado, este tipo de hongo causan varias enfermedades en un amplio espectro de cultivos, ya que producen metabolitos tóxicos dejando daños irreversibles en el hospedante como por ejemplo: marchitez, tizones, pudriciones desencadenando grandes pérdidas económicas (Villa, 2014).

2.4 Importancia de usar biofungicidas, en relación con fungicidas químicos

A partir de la segunda guerra mundial los insecticidas naturales fueron quedando obsoletos luego del surgimiento de compuestos químicos que han ido reemplazando en su totalidad a los extractos vegetales, algunos compuestos químicos que podemos encontrar son: DDT, organoclorados, carbamatos y organofosforados (Celis y otros, 2008).

Según la Organización mundial de salud, existe alrededor de 500.000 y 1.000.000 de personas expuestas a plaguicidas (es decir sufren alguna intoxicación) de los cuales entre 5000 a 20000 personas llegan a perder la vida. De los cuales el 50% son parte del sector agrícola y el otro 50 % son personas envenenadas por el consumo de alimentos expuestos a productos químicos (Pérez y otros, 2012).

Por otra parte, la agricultura del siglo XXI busca alternativas ecológicas y amigables al ambiente con la finalidad de disminuir el riesgo e impacto ambiental. Utilizando estrategias de manejo integrado en conjunto con los extractos vegetales quienes no presentan residualidad en el ambiente, ya que se degradan fácilmente. Para un efectivo control de plagas y enfermedades que atacan a los cultivos (Rojas, 2018)

2.5 Extractos vegetales como alternativa económica

El uso de plaguicidas en la agricultura fue un boom desde su llegada trayendo grandes beneficios en los cultivos mejorando el control de plagas y enfermedades. A su vez desencadenó varios problemas relacionados a la salud. En el mundo las ventas de plaguicidas pasan de los tres millones de toneladas con una facturación de \$ 21000 millones de dólares (García, 1988). Por otro lado, según FAO se utilizan cerca de 57200

toneladas para cultivos de exportación como el banano, café, algodón, etc. En donde se gastan cerca de \$5700 millones de dólares (Pedrick, 1994).

Convirtiéndose así los extractos vegetales, en la mejor alternativa que pueda reemplazar de forma efectiva a los plaguicidas y así generar una disminución en el costo que representa el uso de pesticidas para el control de fitopatógenos en las distintas explotaciones agrícolas alrededor del mundo. Generalmente, luego de cada ciclo de un cultivo, existe un residuo de malas hierbas, residuos de cosecha, plantas ornamentales en las periferias las cuales son usadas nuevamente en algunos casos o desechadas en su totalidad. El uso de este tipo de residuos optimizaría al máximo toda la materia prima sin generar ningún desperdicio o contaminación (Chang y otros, 2009).

Algunos de estos residuos o material disponible sin uso alguno, poseen ingredientes activos que funcionan tanto como insecticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas que han demostrado su efectividad para el control biológico de fitopatógenos. Tal es el caso de *Lilium*, los bulbos desechados luego de finalizar su ciclo productivo, al extraer sus compuestos activos es un excelente fungicida en especial para el control de *Fusarium oxysporum* (Iturbide y otros, 2017).

CAPÍTULO III: OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo general

Identificar la capacidad antifúngica de tres extractos vegetales sobre el hongo fitopatógeno (*Fusarium oxysporum*), causante de enfermedades de importancia agrícola.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto antifúngico de Manzanilla, Ajo y Romero; a través un conteo de esporas y crecimiento micelial.
- Comparar el crecimiento y desarrollo de *Fusarium oxysporum* en el medio inoculado con Manzanilla, Romero y Ajo.
- Establecer que extracto vegetal tiene mayor efectividad para controlar *Fusarium oxysporum*

3.3 Hipótesis

Los extractos vegetales permiten un control efectivo de *Fusarium oxysporum*

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 *Fusarium oxysporum*

El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, posee una capacidad de supervivencia alta gracias a estructuras de resistencias conocidas como clamidosporas que protegen, almacenan permitiendo su supervivencia en materia orgánica y en el suelo (Retana, 2017). Generalmente, este hongo produce una pigmentación de coloración violeta pálida a oscura, magenta oscura, amarillenta y en algunos casos no presenta pigmentación alguna en el agar. Estructuralmente presenta macronidios cortos a medianos con tres septos, luego tenemos los micronidios sin septos en forma oval similares a un riñón y clamidosporas las cuales poseen abundantes hifas (Roman, 2013).

4.1.2 Extractos vegetales

La colecta del material biológico para la realización de los distintos extractos vegetales fue realizada en la Granja Experimental de Agroempresas, en donde tomaron muestras de flores y plantas enteras de manzanilla (*Chamaemelum nobile*), para el ajo (*Allium sativum*) se utilizó la planta entera y se usaron los tallos y hojas para el romero (*Rosmarinus officinalis*). Las muestras obtenidas de cada planta fueron pesada, etiquetadas y empaquetadas en fundas ziploc.

4.2 Fase de campo

4.2.1 Preparación de los extractos vegetales

En relación con la preparación de los extractos vegetales, luego de la colecta en campo se llevó las muestras de manzanilla, ajo y romero al Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la USFQ; en donde, se lavó cuidadosamente cada muestra

con abundante agua eliminando residuos de tierra, insectos, partes secas. Después se colocaron en papel toalla, dejando secar el material vegetal por 20 a 30 minutos.

4.2.2 Ultrasonido

Una vez seco el material vegetal de la colecta de campo, este fue nuevamente pesado y etiquetado acorde cada parte de la planta clasificada anteriormente. Luego, este material se cortó cuidadosamente con la finalidad de que ingrese en un frasco vacío de mermelada donde se añadió 100 ml de alcohol etílico al 99%. Finalmente, se introdujo en el ultrasonido por una hora a dos aproximadamente; el cual realiza una pulverización molecular del material vegetal dejando solo el extracto vegetal más alcohol absoluto en forma líquida.

4.2.3 Esterilización de los extractos vegetales

El extracto vegetal obtenido de forma líquida en el proceso anterior, en primer lugar, pasó por un filtrado a través de papel filtro, con la finalidad de eliminar cualquier residuo sobrante luego del ultrasonido, una vez finalizado el filtrado se cerró y llevó a la cámara de flujo laminar en donde se realizó un segundo filtrado usando micro filtradores (milipore) para su respectiva almacenamiento en tubos de plástico estériles de 50 ml.

4.3 Equipos

4.3.1 Autoclave

El autoclave de vapor, también conocido como autoclave Charles Chamberland es implementado para la esterilización de material (vidrio, medios, metal, entre otros), eliminando cualquier tipo de contaminación existente a través del uso de vapor (calor húmedo) la temperatura utilizada es de 121° C por 20 minutos. Internamente se logra

alcanzar esta presión por el calentamiento de agua destilada que posee el sistema saturando la cámara con vapor (Pan American Health Org, 1988).

Por otro lado, es importante considerar que existen compuestos termolábiles, es decir, aquellos compuestos como hormonas, vitaminas, antibióticos, extractos vegetales, etc. Los cuales pierden sus estructura y propiedades al ser sometidos a temperaturas altas. Por lo que es necesario realizar otro tipo de esterilizaciones en estos compuestos como por ejemplo realizar filtraciones, uso de alcohol, aplicación de luz UV (Pinchinat, 1985).

4.3.2 Cámara de flujo laminar

Existen tres tipos de cámaras de flujo laminar, la implementada en la experimentación es la cámara de flujo laminar tipo dos o cámara de flujo vertical. La cual posee una protección de vidrio en la parte frontal. En esta existe una recirculación de aire que pasa a través de filtros HEPA, creando una barrera interna constante evitando el ingreso de agentes externos; brindando una mayor seguridad biológica y evitar agentes infecciosos, cultivos celulares, ambiente, bacterias, etc (Herrero y otros, 2004).

4.3.3 Cámara de bioseguridad

Existen tres tipos de cámaras de flujo laminar, la implementada en la experimentación es la cámara de flujo laminar tipo dos o cámara de flujo vertical. La cual posee una protección de vidrio en la parte frontal. Además, internamente se da una recirculación de aire que pasa a través de filtros HEPA (purificando el aire), creando una barrera interna constante evitando el ingreso de agentes externos; brindando una mayor seguridad biológica y evitar agentes infecciosos, cultivos celulares, ambiente, bacterias, etc (Herrero y otros, 2004).

4.4 Métodos de laboratorio

4.4.1 Multiplicación de *Fusarium oxysporum*

Se realizó el medio con 39 gramos de papa-dextrosa-agar (PDA) en 1000 ml de agua destilada. Luego se y agitó calentó en una hornilla hasta que el medio alcance su punto de ebullición. La mezcla obtenida fue autoclavada a 121°C por 20 minutos, una vez que sale del autoclave se dejó enfriar en agua. Adicionalmente, se llevó a la cámara de flujo laminar donde se añadió gentamicina, para su respectiva siembra en cajas Petri, esperando su solidificación. Finalmente, se realizó su conservación en refrigeración para procesos posteriores.

4.4.2 Siembra de *Fusarium oxysporum*

Las cajas Petri con medio (PDA) obtenidas del proceso anterior se llevaron a una cámara de bioseguridad en donde se realizó la siembra con palillos de dientes del micelio de *Fusarium oxysporum* previamente obtenido de la colección del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la USFQ. Luego se selló cada caja con parafilm, se etiquetó y guardó en fundas rotuladas. Finalmente se llevaron las cajas a una incubadora la cual mantenía una temperatura de 25°C hasta que el hongo complete su desarrollo total (8 días).

4.4.3 Medio de cultivo más extracto

Durante esta etapa, se realizó dos procedimientos para las distintas concentraciones al 5 y 10% de extractos vegetales.

Se utilizó 240 ml de agua destilada con 7.8 gramos de PDA para cada tratamiento. Esta mezcla se calentó en una hornilla hasta que el medio alcance su punto de ebullición y se autoclavó cada frasco a 121°C por 20 minutos y se dejó enfriar. Los distintos frascos se llevaron a la cámara de flujo laminar, en cada frasco con una jeringuilla estéril se

añadió 10 ml de extracto para la concentración al 5%. Finalmente, se sembró en cajas dejando solidificar el medio de cultivo para su posterior refrigeración.

Se utilizó 230 ml de agua destilada con 7.8 gramos de PDA para cada tratamiento. Esta mezcla se calentó en una hornilla hasta que el medio alcance su punto de ebullición y se autoclavó cada frasco a 121°C por 20 minutos y se dejó enfriar. Los distintos frascos se llevaron a la cámara de flujo laminar, en cada frasco con una jeringuilla estéril se añadió 20 ml de extracto para la concentración al 10%. Finalmente, se sembró en cajas dejando solidificar el medio de cultivo para su posterior refrigeración.

4.4.4 Bioensayo

Se realizó una desinfección de la cámara de bioseguridad con luz ultravioleta por 30 minutos. Luego, se colocaron los distintos medios de cultivos más extractos a distintas concentraciones 5 y 10%; más los hongos replicados de *Fusarium oxysporum* en una siembra previa. Con un sacabocados se extrajo un disco de 0.9 cm de *F. oxysporum* e inmediatamente se sembró en la mitad de la caja. Esto se realizó repetitivamente para cada concentración y medios con extracto vegetal más PDA (un disco por caja por medio). Adicionalmente, se colocó un disco en los testigos (medio PDA). Se selló con parafilm cada caja, se etiquetó y fue llevado a una incubadora a 25°C.

Después de la evaluación del crecimiento micelial, por cada tratamiento se seleccionaron tres cajas las cuales fueron llevadas nuevamente a la cámara de bioseguridad. En cada una de las cajas se añadió un ml de agua destilada estéril y con un triángulo se movió cuidadosamente el micelio del hongo sin romper el medio. Posteriormente, la solución se filtró en algodón y con una pipeta se extrajo 1 μ l se colocó la solución filtrada en la cámara Neubauer para el conteo de esporas. Finalmente, para la concentración al 5% se evaluó tanto el crecimiento micelial como las UFC/ml, mientras que para la concentración al 10% solo se evaluó las UFC/ml.

4.5 Método estadístico

4.5.1 Diseño experimental

A través de un diseño completamente aleatorizado, se obtienen seis tratamientos y once repeticiones por cada tratamientos en relación con la variable del crecimiento micelial. Obteniendo un total de 132 observaciones de las cuales 66 observaciones son parte del ensayo al 5 % y las otras 66 del ensayo al 10% de extracto vegetal en el medio. Por otro lado, con respecto a la variable de las unidades formadoras de colonias UFC/ml, se seleccionaron 3 repeticiones de esta variable por tratamiento; es decir, 36 observaciones de las cuales 18 observaciones corresponden al ensayo al 5 % y las otras 18 del ensayo al 10% de extracto vegetal en el medio.

También se realizó otro análisis de la variancia eliminando el control para ambas variables. En relación con el crecimiento micelial en cm se obtuvieron 110 observaciones de las cuales 55 son del ensayo al 5 % de extracto vegetal en el medio y las otras 55 del ensayo al 10% de extracto vegetal en el medio. Por otro lado, para la variable UFC/ml se consideraron 30 observaciones de las cuales 15 son del ensayo al 5 % y las otras 15 del ensayo al 10% de extracto vegetal en el medio.

Adicionalmente, se realizó una transformación de datos al trabajarse con valores sumamente pequeños, permitiendo una mejor estimación de los resultados. Los distintos tratamientos evaluados al 5%, y para la concentración al 10 % de extracto vegetal más medio se enlistan a continuación:

1. Tratamiento 1: PDA - Testigo
2. Tratamiento 2: Extracto de Ajo – Planta entera
3. Tratamiento 3: Extracto de Romero – Tallo
4. Tratamiento 4: Extracto de Romero – Hojas
5. Tratamiento 5: Extracto de Manzanilla – Planta entera
6. Tratamiento 6: Extracto de Manzanilla – Flores

4.5.2 Prueba de rango múltiple de Duncan

La prueba de rango múltiple de Duncan utiliza la diferencia crítica comparando dos promedios adyacentes o en el caso de que existan una o más medias comparadas (Fallas, 2012). Por otro lado, a través de un DCA se aplicó la prueba de significación estadística de Duncan con un nivel de significancia del 0.05. Siendo una prueba que permite disminuir el error experimental, al relacionarlo con los resultados obtenidos en relación con el desarrollo desigual del micelio y las unidades formadoras de colonias del hongo estudiado.

4.6 Variables de respuestas

4.6.1 Crecimiento micelial

En relación con la toma de datos del crecimiento micelial, se midió en cm cada 2, 4, 6 y 8 días; siendo el octavo día donde el hongo alcanzó su desarrollo completo del micelio en la caja Petri de los testigos. Para esta medición se utilizó una regla milimétrica, en donde se tomó dos valores por cada caja por día haciendo un promedio en los valores al presentar un crecimiento irregular. Estos datos fueron medidos desde el disco ubicado en el centro hacia la parte superior de la caja y hacia la parte lateral derecha (en donde se marcó un eje en el día 0 para evitar variaciones con la medida)

4.6.2 Unidades formadoras de colonias

Una vez que el testigo alcanzó el desarrollo micelial completo en la caja Petri, se trasladaron las todas las cajas a la cámara de bioseguridad. En cada caja se añadió 1 ml de agua destilada y con la ayuda de un triángulo de vidrio se mezcló cuidadosamente sin romper el PDA el micelio de hongo en el agua destilada. La mezcla resultante, fue llevado cuidadosamente a un frasco estéril que tenía en la parte superior papel filtro.

Luego con una pipeta se extrajo 1 μl de la solución e inmediatamente se colocó en la cámara Neubauer.

Después se trasladó al microscopio para la perspectiva visualización de las unidades formadoras de colonias; en donde se tomaron 5 valores de referencia del recuadro central se enfocan 4 esquinas y la parte central. Finalmente, los valores obtenidos se sumaron y se sacó un promedio para posteriormente aplicar la fórmula del conteo de esporas obteniendo el valor total del conteo.

$$\text{Formula cámara neubauer} = \frac{\text{Suma 5 datos camara neubauer}}{80 \times 4 \times 10^6 \times 10^{-1}}$$

CAPÍTULO V: RESULTADOS

5.1 Crecimiento micelial en (cm) con 5% de extracto vegetal.

De los resultados obtenidos para el análisis del crecimiento micelial en (cm) al 5 % de extracto vegetal, se obtuvo una media general de 0.945. Por otro lado, el coeficiente de variación (CV) fue de 7.14%, en el error estándar de las medias (Sy) de 0.0204 y finalmente para la diferencia entre medias (Sd) de 0.0288.

Tabla 1. ANOVA del crecimiento micelial en (cm) con 5% de extracto vegetal.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Total	65	8.45	-	-	-
Tratamientos	5	8.18	1.64	358.92	>* 4,07
Error Exp.	60	0.27	0.005		
significativo $\leq 0,05^*$					

Con relación al ANOVA realizado para el análisis del crecimiento micelial en (cm) del extracto vegetal al 5%, se determinó que existe diferencia significativa (*) en los tratamientos estudiados. Esto es un indicativo de que los distintos tratamientos presentando diferentes niveles de control sobre el hongo *Fusarium oxysporum*.

Tabla 2. Prueba de rango múltiple de Duncan del crecimiento micelial en (cm) con 5% de extracto vegetal más control.

	Ajo Pt E.	Mz Flor	Mz Pt E.	Romero hojas	Romero tallo	Control
\bar{y}	0.721	0.741	0.749	0.815	0.929	1.717
	c	c	c	cb	b	a
Mz= manzanilla / Pt E.=planta entera						

De acuerdo con la Tabla 2, cada extracto presenta un comportamiento diferente en relación con el porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*, estableciendo que los mejores tratamientos estadísticamente ocupan un rango (c). Estos tratamientos son: ajo

planta entera con 0.721 (**c**), seguido de manzanilla flor con 0.741 (**c**) y manzanilla flor con 0.749 (**c**); en comparación con el control con un rango de 1.717 (**a**). Por otro lado, Romero hojas con 0.815 (**cb**) y romero tallo con un rango 0.929 (**b**) tuvieron una inhibición media en comparación con el control 1.717 (**a**).

Tabla 3. Prueba de rango múltiple de Duncan del crecimiento micelial en (cm) con 5% de extracto vegetal sin control.

	Ajo Pt E.	Mz Flor	Mz Pt E.	Romero hojas	Romero tallo
\bar{y}	0.021	0.049	0.063	0.168	0.378
	b	b	b	a	a

Comparando los tratamientos al 5 % de extracto vegetal sin considerar el control, observamos que los extractos vegetales a base de ajo planta entera, manzanilla flor y planta entera no poseen diferencias significativa entre sí. Mientras que romero hojas y romero tallo tienen mayor crecimiento micelial, aunque tienen un mismo rango de significación estadística. Siendo aquellos tratamientos con rango (**b**) los que presentan un mayor porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*.

5.2 Unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 5% de extracto vegetal.

De los resultados obtenidos en el análisis de las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml al 5 % de extracto vegetal, se estimó una media general de 1.31E+04. Por otro lado, en relación con el coeficiente de variación (CV) fue de un valor de 14.70%, el error estándar de las medias (Sy) de 1.11E+03 y finalmente para la diferencia entre medias (Sd) de 1.57E+03.

Tabla 4. ANOVA de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 5% de extracto vegetal.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Total	17	1.69E+09	-	-	-
Tratamientos	5	1.65E+09	3.30E+08	84.236	>* 4,07
Error Exp.	12	4.44E+07	3.70E+06		
significativo $\leq 0,05^*$					

En relación con el ANOVA (Tabla 4), en la variable unidades formadoras de colonias (UFC/ml) del extracto vegetal al 5%, se constató que existe diferencia significativa (*) en los tratamientos estudiados. Esto quiere decir, que los distintos extractos se comportaron de forma diferente al ser expuestos a *Fusarium oxysporum*.

Tabla 5. Prueba de rango múltiple de Duncan de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 5% de extracto vegetal más control.

\bar{y}	Mz Flor	Ajo Pt E.	Mz Pt E.	Romero hojas	Romero tallo	Control
	5.91E+03	6.57E+03	7.41E+03	1.07E+04	1.44E+04	3.35E+04
	b	b	b	ba	a	a
Mz= manzanilla / Pt E.=planta entera						

De acuerdo con la Tabla 5, observamos que en relación con el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, estadísticamente los mejores tratamientos ocupan un rango (**b**) para el control de *F. oxysporum*. Estos tratamientos son: manzanilla flor 5.91E+03 con un rango (**b**), ajo planta entera 6.57E+03 (**b**) y manzanilla planta entera 7.41E+03 (**b**), poseen el mayor porcentaje de inhibición de esporas en comparación con el control con un rango 3.35E+04 (**a**). Mientras que romero hojas con 1.07E+04 (**ba**) tiene el mismo rango de significación en relación con los extractos con mayor inhibición y romero tallo con un valor de 1.44E+04 (**a**) poseen un porcentaje de inhibición medio en comparación con el control (**a**).

Tabla 6. Prueba de rango múltiple de Duncan de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 5% de extracto vegetal sin control.

\bar{y}	Mz Flor	Ajo Pt E.	Mz Pt E.	Romero hojas	Romero tallo
	3.50E+07	4.33E+07	5.50E+07	1.15E+08	2.17E+08
	b	b	b	b	a
Mz= manzanilla / Pt E.=planta entera					

Comparando los tratamientos con 5 % de extracto vegetal y sin considerar el control, observamos que los extractos vegetales a base de ajo planta entera, manzanilla flor y planta entera no poseen diferencias significativa entre sí. Mientras que romero hojas estadísticamente es similar a los tres tratamientos indicados, manteniendo un rango de **(b)** y romero tallo poseen diferencia significativa en relación con los otros cuatro extractos con un rango **(a)**. Siendo los tres primeros tratamientos con rango **(b)** los que presentan un mayor porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*.

5.3 Unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 10% de extracto vegetal.

De los resultados obtenidos para la variable unidades formadoras de colonias (UFC)/ml al 10 % de extracto vegetal, se obtuvo una media general de 1.31E+04. Por otro lado, en relación con el coeficiente de variación (CV) este fue de 13.70%, en el error estándar de las medias (Sy) de 7.41E+02 y finalmente para la diferencian entre medias (Sd) de 1.05E+03.

Tabla 7. ANOVA de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 10% de extracto vegetal.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Total	17	2.12E+09	-	-	-
Tratamientos	5	2.10E+09	4.19E+08	254.295	>* 4,07
Error Exp.	12	1.98E+07	1.65E+06		
significativo $\leq 0,05^*$					

En relación con el ANOVA (Tabla 7), en las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) del extracto vegetal al 10%, se constató que existe diferencia significativa (*) en los tratamientos estudiados. Esto quiere decir que los distintos extractos vegetales se comportaron de forma diferente al ser expuestos a *Fusarium oxysporum*.

Tabla 8. Prueba de rango múltiple de Duncan de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 10% de extracto vegetal más control.

\bar{y}	Mz Flor	Ajo Pt E.	Mz Pt E.	Romero hojas	Romero tallo	Control
	3.84E+03	4.21E+03	4.21E+03	5.14E+03	5.46E+03	3.35E+04
	b	b	b	b	b	a
Mz= manzanilla / Pt E.=planta entera						

De acuerdo con la Tabla 8, visualizamos que, en la variable, conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml todos los extractos evaluados se mantienen en un mismo rango (b) en comparación con el control (a). Es decir que los extractos vegetales al 10% posee un alto grado de inhibición en la cuantificación de UFC/ml.

Tabla 9. Prueba de rango múltiple de Duncan de las unidades formadoras de colonias (UFC) /ml con 10% de extracto vegetal sin control.

\bar{y}	Mz Flor	Ajo Pt E.	Mz Pt E.	Romero hojas	Romero tallo
	3.84E+03	4.21E+03	4.21E+03	5.14E+03	5.46E+03
	b	b	b	b	a
Mz= manzanilla / Pt E.=planta entera					

Comparando los tratamientos al 10 % de extracto vegetal y sin considerar el control, observamos que los extractos vegetales a base de ajo planta entera, manzanilla flor, manzanilla planta entera y romero hojas no poseen diferencias significativa entre sí rango (b); siendo los que poseen un mayor porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*. A diferencia de romero tallo que posee un rango (a), lo que es un indicativo de su menor efecto de inhibición.

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

6.1 Variable: Crecimiento micelial del hongo estudiado, medido en (cm).

El análisis de varianza (ANOVA) es un indicador para la determinación del comportamiento de los distintos tratamientos aplicados al hongo *Fusarium oxysporum*. A través de la toma de medidas del crecimiento micelial en centímetros (cm); estableciendo que la repuesta existente por cada tratamiento aplicado posee diferencias significativas entre sí y a su vez con el control. En donde, los tratamientos al 5 % presentan los resultados que van desde el mayor crecimiento micelial hasta el menor; en el caso del control la medida promedio fue de 1.72 cm, seguido de romero tallo con 0.93 cm, romero hojas con 0.81 cm, manzanilla planta entera con 0.75, manzanilla flor con 0.74 y ajo planta entera con 0.72 cm; siendo ajo planta entera el mejor tratamiento para contralar *Fusarium*, concordando con los datos de Chávez y Aquino (2012) quienes establecen que el ajo posee un alto efecto inhibitorio de *Fusarium sp.*

Adicionalmente, Alkahil (2005) establece que el extracto etanólicos de ajo a bajas concentraciones de (0.5% ,1%, 2%) generan un efecto inhibitorio del 20 % aproximado del hongo estudiado, relacionados estos datos con los obtenidos del 5 %, los cuales alcanzan entre el 40 al 60 % de inhibición. Por otro lado, los tratamientos al 10 % presentaron efecto inhibitorio total en relación con el crecimiento micelial; es decir no hubo crecimiento en (cm). Estos resultados obtenidos concuerdan con los datos establecidos por López-Benítez quienes mencionan que al aumentar la concentración del 5 al 10 % existirá un mejor efecto inhibitorio de *Fusarium oxysporum* (López y otros, 2005).

Al aplicar la fórmula de Andrade y Mata (2018) para la obtención del porcentaje de inhibición (PI), exacto se obtiene un valor del 58.14 % de inhibición para el ajo, lo que concuerda con el rango del 40 al 60 % mencionado en el párrafo anterior. Por otro lado, el porcentaje inhibitorio de manzanilla planta entera y manzanilla flor poseen valores de 56.98 y 56.39 % respectivamente. Mientras que romero hojas posee un (PI) de

52.91%, romero tallo un (PI) de 45.93 %. Salazar, 2018 determina que con 10 ml de extracto vegetal a base de romero obtiene un porcentaje de inhibición del 44.66 %; así mismo al usar 50 ml de extracto posee un 100% de inhibición. Estableciendo que a medida que la cantidad de romero aplicada aumenta el porcentaje de inhibición también aumenta, siendo estos datos semejantes a los obtenidos con el 5 y 10 % de extracto vegetal.

De acuerdo con los resultados de la prueba de rango múltiple de Duncan al analizar el 5% de extracto vegetal, existió diferencia significativa entre los extractos utilizados y el control. En donde, se establece que ajo planta entera, manzanilla flor y planta entera no poseen diferencia significativa entre sí; manteniendo el mejor porcentaje inhibitorio en relación con el crecimiento micelial. Con un mediano porcentaje inhibitorio sin diferencia significativa tenemos a romero hojas y romero tallo. A diferencia del control quien mantuvo un rango bajo de inhibición en comparación a los extractos mencionados anteriormente. En el caso del 10 % se dio una inhibición completa del crecimiento micelial. Magro y otros, 2006 corroboran lo establecido mencionando que el ajo tiene el mayor efecto inhibitorio. También establecen que el porcentaje de inhibición se encuentra ligado al tipo de extracto aplicado y la cantidad de este; a mayor cantidad de extracto aplicado posee un mejor efecto.

Con respecto al coeficiente de variación (CV), al ser un indicador de la variabilidad que existe en un experimento, a través de la medición del porcentaje de error en relación con la media. En donde, se obtuvo un CV de 7.14 %, siendo un estimador de que la variabilidad de los valores obtenidos para esta variable, está dentro de la variación esperada para un experimento bajo condiciones de laboratorio. Este valor fue comparado con un ensayo relacionado al uso de fungicidas químicos in vitro para el control de *Fusarium oxysporum*, donde presentan CV menores al 5 % (Andrade y Mata, 2018). Estableciendo que el ensayo se encuentra dentro de los parámetros establecidos para una experimentación en laboratorio, considerando varios factores influyentes que puedan afectar los resultados como contaminaciones (hongos y bacterias), cambios de temperatura, movimiento de las cajas en estudio, entre otros.

6.2 Variable: Unidades formadores de colonias (UFC/ml)

En relación con el análisis de la varianza, (ANOVA). Las unidades formadoras de colonias (UFC/ml), la respuesta en cada tratamiento posee diferencias significativas entre sí manteniendo un patrón en relacionado con el crecimiento micelial en (cm). Presentados los tratamientos al 5% de mayor cantidad de (UFC/ml) a menor; en donde el control posee 3.35E+04 UFC/ml, seguido de romero tallo con 1.44E+04 UFC/ml, romero hojas con 1.07E+04 UFC/ml, 7.41E+03 UFC/ml manzanilla planta entera, 6.57E+03 UFC/ml ajo planta entera y 5.91E+03 UFC/ml manzanilla flor; siendo manzanilla planta entera, ajo planta entera y manzanilla flor aquellos tratamiento con un mejor efecto inhibitorio de las unidades formadoras de colonias para el control de la esporulación de *Fusarium oxysporum*.

De acuerdo con el análisis de la prueba de rango múltiple de Duncan, existió diferencia significativas entre los extractos y el control al 5 y al 10% de extracto vegetal utilizado. Para los tratamientos de UFC/ml analizados al 5 % de extracto vegetal más control, se establece que ajo planta entera, manzanilla flor y planta entera fueron los mejores tratamiento para el control de *Fusarium oxysporum*; ya que poseen una menor cantidad de esporas contadas en la cámara de Neubauer. Magro y otros, 2006; confirman lo obtenido en la experimentación, mencionando que el ajo con una dosis de 9 y 10 (g/ml), al igual que la manzanilla con una dosis de 0.92 (g/ml) posee un control inhibitorio de *Fusarium* y otros hongos estudiados durante su ensayo como: *Penicillium* sp. y *Aspergillus niger*.

Con respecto a los resultados de UFC/ml al 10% no existe diferencia significativa entre los tratamientos estudiados entre si a excepción del control, esto es corroborado por Moro y otros, 2012; quienes establecen que romero y manzanilla poseen un alto valor antifúngico. En donde, el extracto de romero posee compuestos como: 1.8 cineole, camphor y α -pinene los cuales inhiben el crecimiento de *Fusarium* (Bomfim y otros, 2014). Adicionalmente, Chávez y Aquino, 2012 al comparar extractos de ortiga (*Urtica dioica*), piri (*Cyperus* spp), caraguata (*Eryngium elegans*) y ajo (*Allium sativum*); establecen que el ajo posee un control total valor cero en comparación a los extractos ensayados quienes posee un rango que va desde los 5299 hasta 5994 esporas contadas,

considerando al ajo el mejor tratamiento para impedir un desarrollo del micelio y limitando la esporulación de *Fusarium oxysporum*.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

Tomando en cuenta los extractos vegetales al 5 % más el control, ajo planta entera es el tratamiento para el mejor control de *Fusarium oxysporum*, tanto en la variable del crecimiento micelial (cm) como las unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Asimismo, manzanilla (planta entera) y (flor) son estadísticamente similares al extracto de ajo, en las dos variables estudiadas; siendo mejores en algunos casos en la variable (UFC/ml) o presentando valores semejantes al ajo con diferencias mínimas. Por otro lado, romero hojas y romero tallo se mantuvieron una inhibición mediana de *Fusarium oxysporum* siendo diferentes estadísticamente a manzanilla (flores, planta entera) y ajo.

Con respecto al 10 % de los extractos vegetales más el control, se establece que al aumentar el porcentaje del extracto de un 5% a un 10%, hay un mayor efecto inhibitorio del hongo al enfrentarlo con los extractos ensayados. Esto se corroboró en la variable del micelio en (cm), ya que no hubo desarrollo del micelio de *Fusarium oxysporum* valor cero (cm) y a su vez en la variable unidades formadoras de colonias (UFC/ml), poseen bajas cantidades de esporas al compararlas con el control.

Siendo los resultados obtenidos dependientes del propio desarrollo del hongo, se debe tomar en cuenta factores como la frescura de la cepa, optima temperatura (25°C), y evitar contaminaciones, para la toma de la información de las dos variables evaluadas. El CV alcanzo valores aceptables de 7.14% para el crecimiento del micelio y 14.7%, 13.67% para las (UFC/ml) al 5 y 10% respectivamente.

Por último, para el control de *Fusarium oxysporum* in vitro con extractos etanolicos, se debe usar concentraciones desde el 5 al 10% a base de ajo (*Allium sativum*) y manzanilla (*Chamaemelum nobile*), por su gran capacidad inhibitoria y amplio espectro antifúngico.

7.2 Recomendaciones

Es recomendable realizar una modificación a la escala utilizada para ganar mayor precisión en la variable relacionada con el crecimiento del micelio.

También, se recomienda realizar más repeticiones de las establecidas relacionadas con la variable UFC/ml para mejorar su precisión

Por último, al ser un experimento exitoso en laboratorio se recomienda llevar el experimento a invernadero y campo; evaluando las mejores dosis con los mejores extractos ajo y manzanilla (planta entera y flor).

CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. (2005). *Fusarium. Plant Pathology* (págs. 163-165). El Sevier.
- Alkhail, A. (2005). *Antifungal Activity of some extracts against some plant pathogenic fungi* (págs. 413-417). Saudi Arabia: Pakistan Journal of Biological Sciences. Obtenido de <http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2005/413-417.pdf>
- Andrade, D., & Mata, R. (2018). *Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas* (págs. 489-495). Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Becerra, J. (2010). *Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control*. México.
- Bomfim, N. , Nakassugi, L. , Pinheiro Oliveira, J., & Kohiyama, C. (2014). *Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by Rosmarinus officinalis L. essential oil in Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg* (págs. 330-336). Brazil: State University of Maringa. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614009054?via%3Dihub>
- Carranza, G. (2017). *Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de cinco extractos vegetales (EV) contra Colletotrichum spp. aislado de tomate de árbol (Solanum betaceum)*. (pág. 46). Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
- Carrión, A. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica* (págs. 4-8). Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Castillo, M. (2018). *Efecto de la concentración del aceite esencial de Rosmarinus officinalis “romero” sobre el crecimiento de Fusarium oxysporum*” (págs. 11-25). Perú: Universidad César Vallejo. Obtenido de http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/27706/salazar_cm.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cavallini, L. (1998). *Fitopatología : Un Enfoque Agroecológico* (págs. 106-108). Universidad de Costa Rica.
- Celis, A., Mendoza, C., & Pachón, M. (2008). *Uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses* (págs. 1-3). Colombia: Universidad de Cundinamarca.
- Chang, K., Yi Wua, R., Chang Chuang, K., & Fang Hsieh, T. (2009). *Effects of chemical and organic fertilizers on the growth, flower quality and nutrient uptake of Anthurium andreanum, cultivated for cut flower production* (págs. 434-436). Taiwan: Floriculture Research Center.
- Chávez, A., & Aquino , A. (2012). *Control de los hongos del suelo Rhizoctonia sp., Fusarium sp. y Sclerotium sp. con extractos vegetales* (págs. 17-23). Paraguay: Universidad Nacional de Asunción. Obtenido de <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/242/228>

- Delgado, H. (2016). *Bioensayos para potenciar extractos vegetales y controlar insectos-plagas del tomate (Lycopersicon esculentum Mill)* (págs. 17-22). Ecuador-Manabí: Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.
- Esmail, A. (2016). *Medical importance of anthemis nobilis (Chamaemelum nobile) - a review* (págs. 89-95). Iraq: Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology. Obtenido de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/48797593/132.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DMEDICAL_IMPORTANCE_OF_ANTHEMIS_NOBILIS_C.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20200203%2Fus-east-1
- Fallas, J. (2012). *Análisis de varianza* (pág. 17). MGAP.
- FAOSTAT. (2019). *FAO*. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>
- Garcés, E. (2001). *Fusarium oxysporum el hongo que nos falta conocer*. Colombia.
- García, J. (1998). *Intoxicaciones agudas con plaguicidas: costos humanos y económicos*. Obtenido de Scielo: <https://www.scielo.org/article/rpsp/1998.v4n6/383-387/pt/#>
- García, V. (2004). *Introducción a la microbiología (2a ed.)* (págs. 103-105). euned.
- Herrero, L., Ávila, R., & Corrales, E. (2004). *Procedimientos en Virología Médica* (págs. 18-19). Editorial Universidad de Costa Rica.
- Iturbide, A. S., Beryl, M. T., Lozoya, H., & Medina, S. A. (2017). *Evaluación in vitro de extractos del genero Liliun para el control de Fusarium oxysporum* (págs. 611-614). México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Kagale, S. (2004). Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura meto* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. En *Physiological and Molecular Plant Pathology* (págs. 91-100). Department of Plant Pathology.
- Ledezma, E. (2006). *Ajoene, el principal compuesto activo derivado del Ajo (Allium sativum), un nuevo agente antifungico*. Venezuela.
- López, A., López, S. R., Vázquez, M. E., & Rodríguez, A. S. (2005). *Inhibición del Crecimiento Micelial de Fusarium oxysporum Schlechtend. f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen, Rhizoctonia solani Kühn y Verticillium dahliae Kleb. Mediante Extractos Vegetales Acuicos* (págs. 183-188). México: Revista Mexicana de Fitopatología. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/612/61223212.pdf>
- Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., & Mexia, A. (2006). *Efficacy of plant extracts against stored products fungi* (págs. 176-178). Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT).

- Martínez, M. (2007). *Flora ornamental del Campus de Reina Mercedes, Universidad de Sevilla*. Obtenido de http://asignatura.us.es/abotcam/especies/Rosmarinus_officinalis.html
- Mejía, M. (2006). *Plantas medicinales: botanica de interest medico* (págs. 283-285).
- Miret, J. (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades* (pág. 121). Publicacions de la Universitat Jaume I.
- Monzón, A., & Rodríguez, J. (2018). *Infecciones causadas por el género Fusarium* (págs. 1-6). Majadahonda: Seimc.
- Moreno, G. (2012). *Manual para el cultivo de hortalizas* (págs. 253-255). Colombia: Produmedios.
- Pan American Health Org. (1988). *Los Servicios de salud en las Américas: análisis de indicadores básicos* (págs. 81-82). Pan American Health Org.
- Parra, Á. (2000). *Evaluación del efecto genotóxico en extractos fluidos de plantago lanceolata l. (llantén menor) y matricaria ecutita l. (manzanilla)*. Cuba. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v5n2/pla07200.pdf>
- Pedrick, C. (1994). En *Controlar la plaga de plaguicidas* (págs. 5-7). Ceres (FAO).
- Pérez, E., Guetierrez, C., Báez, J., & Montoya, E. (2012). *Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas*. *Revista Ra Ximhai*, 17-29.
- Pinchinat, A. (1985). *Memoria del Curso Sobre Manejo de Recursos Geneticos en Frutales Nativos de la Selva Baja* (págs. 53-54). Perú: IICA .
- Pitarokili, D. (2008). *Composition of the Essential Oil of Spontaneous Rosmarinus officinalis from Greece and Antifungal Activity Against Phytopathogenic Fungi*. Grecia. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/233337247_Composition_of_the_Essential_Oil_of_Spontaneous_Rosmarinus_officinalis_from_Greece_and_Antifungal_Activity_Against_Phytopathogenic_Fungi
- Porcuna, J. L. (2007). *Manejo de plagas y enfermedades en producción ecológica* (págs. 5-8). Manuales Técnicos SEAE.
- Qaiser, M. (2002). *Flora of Pakistan*. vol. 5. Obtenido de http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=200023646
- Quiroga, O. (1990). *El cultivo del ajo* (págs. 15-18). La Paz: Plural editores.
- Retana, K. (2017). *Caracterización morfológica y molecular de Fusarium oxysporum f. sp. apii asociado a la marchitez del apio en costa rica* (págs. 116-125). Agronomía Costarricense.
- Ríos, Y. K. (2008). *Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla)*. Colombia. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v37n2/v37n2a08.pdf>

- Rojas, E. (2016). *Prohibición y restricción en el uso y comercialización de plaguicidas agrícolas en Costa Rica*. Costa Rica.
- Rojas, M. (2018). *Uso de extractos vegetales de plantas amazónicas para el diseño de programas de manejo integrado de plagas (MIP)* (págs. 5-6). Sevilla: Universidad de Sevilla .
- Roman, E. (2013). *Identificación morfológica y molecular de especies de fusarium en plantas de nochebuena* (págs. 19-21). Tehuacán: Secretaria de Educación Pública (SEP).
- Sinavimo. (2020). *Allium sativum*. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. Obtenido de <https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/allium-sativum>
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). *Programa de Microbiología y Micología. Género Fusarium*. (págs. 85-86). Chile: Instituto de Ciencias Biomédicas. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n1/art12.pdf>
- Villa, A. (2014). *Situación actual en el control de Fusarium spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales* (págs. 194-202). México: Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH). Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v64n2/v64n2a11.pdf>

CAPÍTULO IX: ANEXOS

ANEXO A: CRECIMIENTO MICELIAL EN (CM)

Anexo 1A. Crecimiento micelial de los extractos vegetales evaluados al 5%

Crecimiento micelial en (cm)													
Tratamientos (5%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Σ	\bar{y}
Control	1.79	1.70	1.74	1.61	1.73	1.74	1.62	1.75	1.71	1.74	1.75	18.89	1.72
Ajo PE	0.71	0.71	0.71	0.71	0.78	0.73	0.71	0.73	0.71	0.73	0.71	7.94	0.72
Romero tallo	1.01	1.11	0.81	0.83	0.87	0.87	1.00	0.86	0.88	0.77	1.19	10.21	0.93
Romero hojas	0.82	0.74	0.75	0.73	0.90	0.73	0.81	0.92	0.84	0.85	0.87	8.96	0.81
Mz PE	0.71	0.80	0.76	0.77	0.71	0.77	0.76	0.81	0.71	0.71	0.73	8.24	0.75
Mz flores	0.73	0.74	0.73	0.75	0.71	0.75	0.75	0.75	0.74	0.75	0.74	8.15	0.74
Mz= Manzanilla// PE= Planta entera												62.39	5.57

ANEXO B: UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/ML)

Anexo 1B. Unidades formadoras de colonias de los extractos vegetales evaluados al 5%

Unidades formadoras de colonias (UFC/ml)					
Tratamiento (5%)	1	2	3	Σ	\bar{y}
Control	1.34E+09	9.95E+08	1.05E+09	1.00E+05	3.35E+04
Ajo planta entera	5.00E+07	4.00E+07	4.00E+07	1.97E+04	6.57E+03
Romero Tallo	2.50E+08	1.05E+08	2.95E+08	4.32E+04	1.44E+04
Romero Hojas	1.10E+08	9.50E+07	1.40E+08	3.21E+04	1.07E+04
Mz Planta Entera	6.00E+07	5.00E+07	5.50E+07	2.22E+04	7.41E+03
Mz Flores	3.50E+07	3.00E+07	4.00E+07	1.77E+04	5.91E+03
Mz= Manzanilla				2.35E+05	7.85E+04

Anexo 2B. Unidades formadoras de colonias de los extractos vegetales evaluados al 10%

Unidades formadoras de colonias (UFC/ml)					
Tratamiento (10%)	1	2	3	Σ	\bar{y}
Control	1.34E+09	9.95E+08	1.05E+09	1.00E+05	3.35E+04
Ajo planta entera	3.00E+07	2.00E+07	3.00E+07	1.54E+04	5.14E+03
Romero Tallo	2.50E+07	2.00E+07	1.00E+07	1.26E+04	4.21E+03
Romero Hojas	3.00E+07	2.50E+07	3.50E+07	1.64E+04	5.46E+03
Mz Planta Entera	1.00E+07	2.00E+07	2.50E+07	1.26E+04	4.21E+03
Mz Flores	2.00E+07	1.50E+07	1.00E+07	1.15E+04	3.84E+03
Mz= Manzanilla				1.69E+05	5.64E+04

ANEXO C: COMPARACIÓN EXTRACTO VEGETAL VERSUS TESTIGO

Ajo planta entera vs testigo

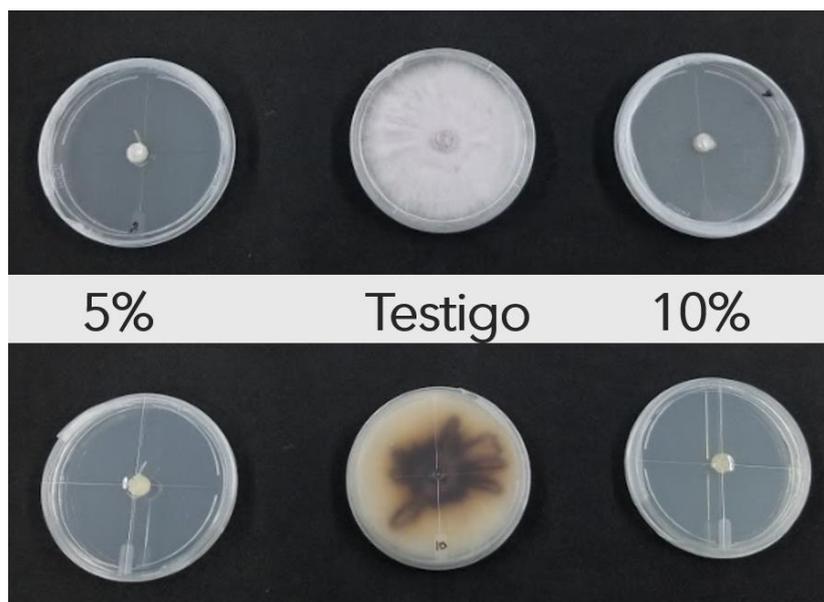


Figura 1: Ajo planta entera al 5 y 10% vs testigo

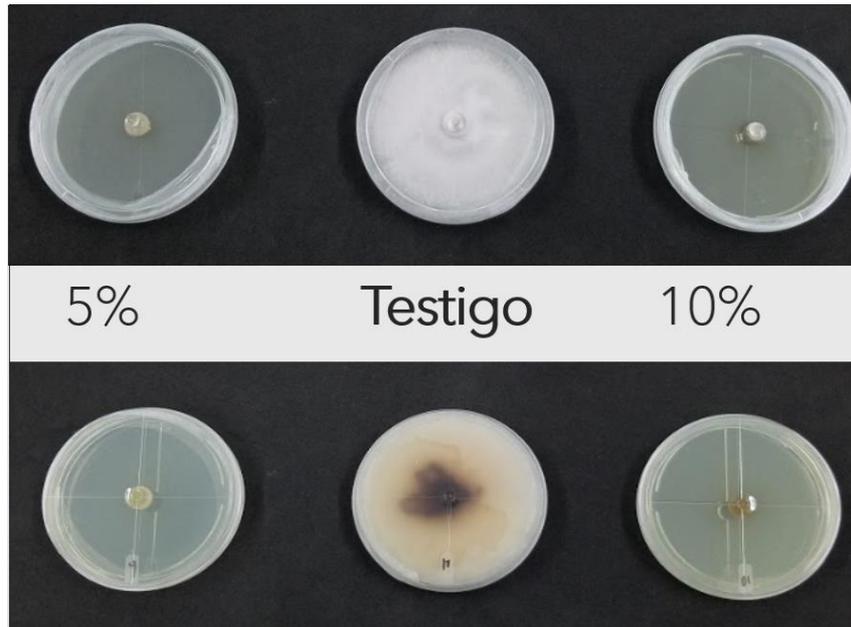
Manzanilla flor vs testigo

Figura 2: Manzanilla flor al 5 y 10% vs testigo

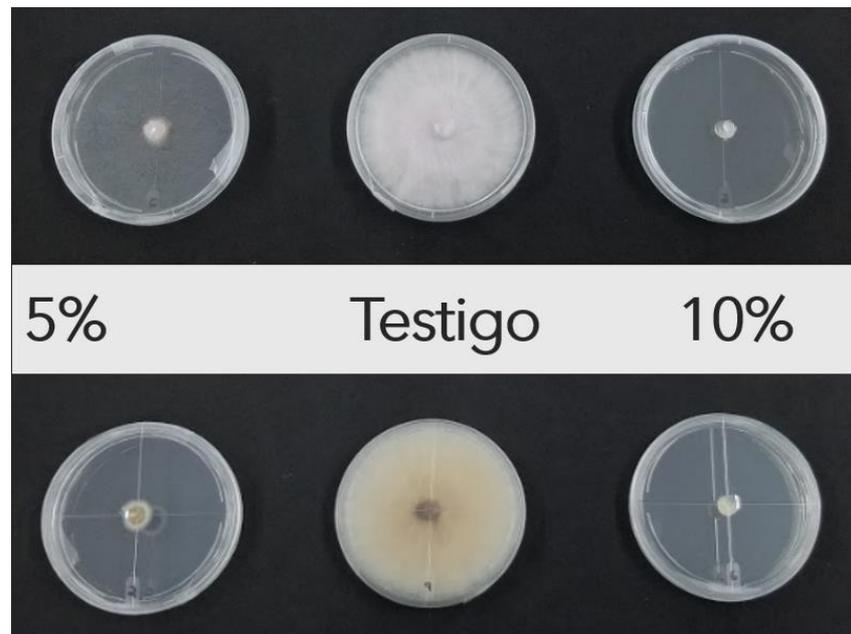
Manzanilla planta entera vs testigo

Figura 3: Manzanilla planta entera al 5 y 10% vs testigo

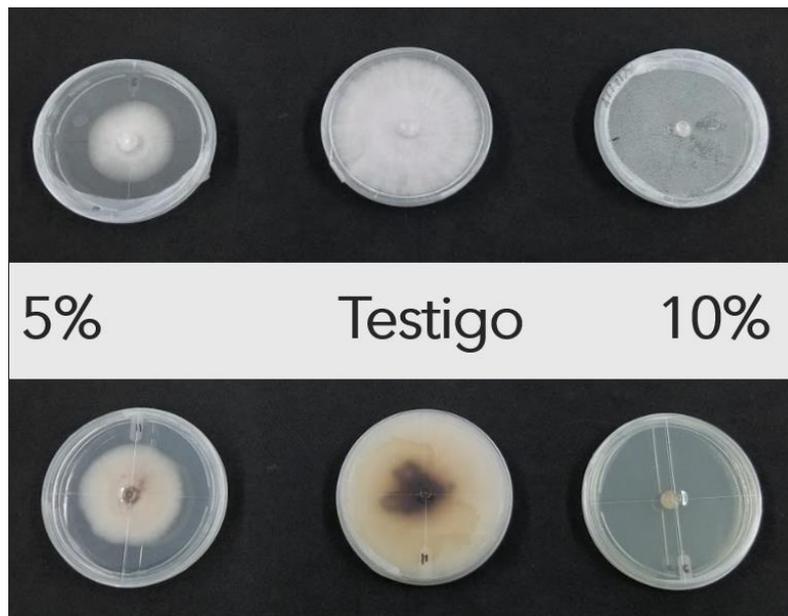
Romero tallo vs testigo

Figura 4: Romero tallo al 5 y 10% vs testigo

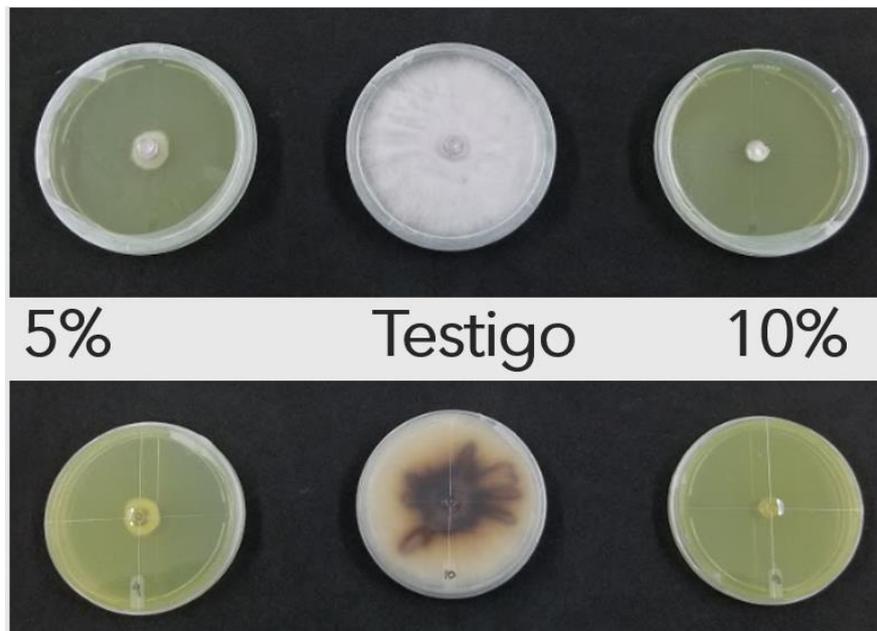
Romero hojas vs testigo

Figura 5: Romero hojas al 5 y 10% vs testigo