

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Efecto de tres extractos vegetales (cola de caballo, diente de león y ruda) para la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum*

Nathaly Monserrate Tenorio Ordoñez

Ingeniería en Agroempresas

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

Quito, 18 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Efecto de tres extractos vegetales (cola de caballo, diente de león y ruda)
para la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum***

Nathaly Monserrate Tenorio Ordoñez

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: Nathaly Monserrate Tenorio Ordoñez

Código: 00133629

Cédula de identidad: 0803606409

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

Uno de los principales problemas en la producción de las hortalizas es el hongo *Fusarium oxysporum*, el cual se caracteriza principalmente por afectar el crecimiento de la planta en general. En la actualidad, se utilizan fungicidas químicos para controlar la proliferación de este hongo. Sin embargo, muchas especies botánicas tienen compuestos metabólicos que tienen actividad anti fúngica, por esta razón, se estudia la posibilidad de utilizar diferentes tipos de extractos provenientes de diferentes especies de plantas. En esta investigación, se evaluó el efecto de tres extractos etanólicos de las especies vegetales: ruda (*Ruta graveolens*), cola de caballo (*Equisetum bogotense*) y diente de león (*Taraxacum officinale*) para la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, los cuales fueron extraídos mediante el método de ultrasonido. Por otra parte, la actividad del extracto depende del tipo de planta a utilizar y de su tiempo de evaluación; se determinó que los tres extractos utilizados tienen una alta actividad anti fúngica sobre el hongo, especialmente cola de caballo, que al medir su crecimiento micelial, fue el extracto con mayor inhibición del hongo a 5% de concentración y esto, gracias a la presencia de metabolitos secundarios. Mientras que en la variable de UFC/ml se determinó que el mejor extracto fue hojas de ruda al 5%, mientras que al 10%, raíz de diente de león. Asimismo, se considera que los resultados de este trabajo abren la posibilidad de desarrollar biofungicidas para el control de enfermedades, y minimizar la utilización de fungicidas químicos.

Palabras clave: anti fúngico, extracto, cola de caballo, *Fusarium oxysporum*, ultrasonido.

ABSTRACT

One of the main problems in the production of vegetables is the *Fusarium oxysporum* fungus, which is mainly characterized by affecting the growth of the plant in general. Currently, chemical fungicides are used to control the proliferation of this fungus. However, many botanical species have metabolic compounds that have antifungal activity, for this reason, the possibility of using different types of extracts from different plant species is being studied. In this research, the effect of three ethanolic extracts of the plant species was evaluated: rue plant (*Ruta graveolens*), horsetail plant (*Equisetum bogotense*) and dandelion plant (*Taraxacum officinale*) for the inhibition of the growth of *Fusarium oxysporum*, which were extracted using the ultrasound method. On the other hand, the activity of the extract depends on the type of plant to be used and its evaluation time; it was determined that the three extracts used have a high antifungal activity on the fungus, especially horsetail, which, when measuring its mycelial growth, was the extract with the greatest inhibition of the fungus at 5% concentration and this, thanks to the presence of secondary metabolites. While in the CFU/ml variable it was determined that the best extract was rue leaves at 5%, while dandelion root at 10%. Likewise, it is considered that the results of this work open the possibility of developing biofungicides for the control of diseases, and minimize the use of chemical fungicides.

Key words: antifungal, extract, horsetail plant, *Fusarium oxysporum*, ultrasound.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I: Introducción	10
Capítulo II: Marco teórico	14
Ruda (<i>Ruta graveolens</i>).....	14
Cola de caballo (<i>Equisetum bogotense</i>)	15
Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>).....	15
Capítulo III: Objetivos e hipótesis	20
Capítulo IV: Materiales y Métodos.....	21
4.1.1 Extractos vegetales.	21
4.1.2 Preparación de muestras.	21
4.2.1 Cámara de flujo laminar.	22
4.2.2 Cámara de Neubauer.....	22
4.3.1 Método de extracción por ultrasonido.....	22
4.3.2 Esterilización de extractos.	23
4.3.3 Cultivo de <i>Fusarium</i> in vitro.	23
4.3.4 Preparación de medios de cultivo y unidades experimentales	23
4.3.5 Siembra de <i>Fusarium oxysporum</i>	24
4.3.6 Crecimiento micelial y UFC/ml.....	24
4.4.1 Diseño experimental.	25
4.4.2 Prueba de significación estadística.....	25
4.4.3. Variables de respuesta.	26
Capítulo V: Resultados.....	27
Capítulo VI: Discusión.....	30
Capítulo VII: Conclusiones y recomendaciones.....	34
Capítulo VIII: Referencias bibliográficas.....	36
Capítulo IX: Anexos.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla #1 ANOVA para el crecimiento micelial del hongo medido en cm, con 5 % de concentración.....	27
Tabla #2 Prueba de rango múltiple de Duncan de crecimiento micelial (cm) con 5 % de concentración.....	27
Tabla #3 ANOVA para variable: UFC/ml con 5% de concentración.....	28
Tabla #4 Prueba de rango múltiple de Duncan de UFC/ml 5% de concentración	28
Tabla #5 ANOVA de variable UFC/ml con 10% de concentración	29
Tabla #6 Prueba de rango múltiple de Duncan de variable UFC/ml con 10% de concentración	29

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A Forma de medición de crecimiento de hongo en cm. Ejemplo de extracto de hojas de ruda al 5% y al 10%	38
ANEXO B Resultado de conteo de crecimiento de hongo medido en cm, en cada tratamiento, por repeticiones	38
ANEXO C Resultados de ufc/ml de cada tratamiento con sus 3 repeticiones con extracto al 5%	39
ANEXO D Resultados de ufc/ml de cada tratamiento con sus 3 repeticiones, con extracto al 10%	39
ANEXO E Crecimiento micelial en el tratamiento de cola de caballo (planta entera) durante 8 días.....	39

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Los hongos fitopatógenos son aquellos que causan pérdidas que a menudo son severas en los cultivos, y a pesar de que existe un sin número de productos químicos-sintéticos para su control, esto no ha sido suficiente para eliminarlos en su totalidad. Si bien es cierto, estos hongos poseen mecanismos muy complejos por lo que son capaces de producir daños en los cultivos. Es por esta razón, que los agricultores han decidido utilizar productos agroquímicos como fungicidas e insecticidas para controlar los hongos, pero produce no solo un impacto ambiental, sino también que las poblaciones de organismos benéficos también disminuyen, además, las fuentes de agua se contaminan y pensando en el consumidor final, al usar agroquímicos tendrían un efecto sobre la salud de los seres humanos (Martínez, 2009).

Si bien es cierto, el uso de productos agroquímicos no solo tiene un uso intensivo para la producción de los cultivos, sino también su uso inadecuado puede traer varias consecuencias como: altos costos de producción, disminución de la rentabilidad del cultivo; búsqueda de resistencia del patógeno para defenderse. Asimismo, existe un efecto residual muy alto de fungicidas en el cultivo lo que produce efectos en la salud humana y en el medio ambiente.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2007), 3 millones de personas, la mayoría pertenecientes a países en desarrollo, terminan intoxicadas por agroquímicos. Por otro lado, la Organización Panamericana de la Salud (2007), reseña que, en 1978, la tasa de intoxicación aguda por el uso de agroquímicos fue de 0,8 por cada 100.000 habitantes; en el año 2004, aumentó a 15,2. El Ministerio de Salud Pública (2011) indica que uno de los principales agentes causantes de intoxicaciones es el uso de agroquímicos, el 49,2% de 2.527 casos que fueron registrados, correspondió a intoxicaciones por agroquímicos debido a un

almacenamiento o aplicación inadecuada. El Ministerio de Ambiente (2003), estima que el uso de estos productos fue de 3,31 toneladas por cada mil hectáreas y en el año 2012, existió un incremento que llegó a 4,82 toneladas.

Por esta razón, desde las últimas décadas del siglo XX, existe un mayor interés en buscar alternativas que eliminen el impacto negativo que tienen los productos agroquímicos. Sin duda algunas de estas alternativas, son el uso de extractos naturales, que han tenido un efecto significativo, no solo para las plantas sino también para el medio ambiente y el consumidor; puesto que se reduce la utilización de estos agroquímicos que tienen un costo elevado y, además, su uso no provoca contaminación ni afectación a la salud del consumidor (Tripathi y Dubey, 2004). Además, tienen características antivirales, antimicrobianas o repelentes lo que permite proteger los cultivos y aumentar la calidad del mismo, además a diferencia de los agroquímicos, son menos tóxicos y son más fácilmente degradables (Corpoica, 2002).

Justificación

Es importante mencionar que, en nuestro país, controlar hongos fitopatógenos con extractos vegetales ha sido poco estudiado; si bien es cierto, hace muchos años se conocían las propiedades de diferentes especies de plantas y sus múltiples usos, es decir que al momento de usar ingredientes activos provenientes de plantas han sido de una forma más manual (Tecnoagro, 2016).

Considerando la problemática que existe en cuanto a los hongos fitopatógenos más prevalentes en los cultivos; uno de los principales problemas de la producción en cultivos es el ataque de *Fusarium oxysporum*. Lo que obliga a usar productos agroquímicos que tienen efecto en la salud de los productores (Rodríguez y otros, 2000).

Por otro lado, existe una tendencia a la producción limpia y esto no solo es a nivel nacional, sino también mundial; es por eso, que es necesario que se asegure el manejo adecuado de los insumos utilizados para la producción, donde al tener un mejor manejo integrado tanto de plagas como de enfermedades, reduciría el impacto ambiental que tienen los productos agroquímicos, además de garantizar la calidad del producto que se adquirirá por el consumidor final (Velázquez del Valle y otros, 2007).

Por este motivo, es necesario buscar una alternativa que sea más viable para los productores y esto nos permite conocer el efecto anti fúngico que tienen los extractos vegetales en este caso, la ruda, el diente de león y la cola de caballo, como biocontroladores y así poder combatir enfermedades causadas por el hongo.

Es importante mencionar algunas características que justifiquen el uso de extractos de las plantas anteriormente mencionadas. Por una parte, la ruda utilizada en huertas o en jardines orgánicos, es capaz de imitar los mecanismos tanto de equilibrio como de estabilidad que necesita la naturaleza; es decir, sus principios ecológicos. Además, con los extractos de la ruda, ya sea, de tallo y hojas, estos contienen más de cien sustancias como: Rutin, rutarin, undecanona, limoneno, etc., permite que tenga una acción nematicida y desinfectante de suelos y posee algunas propiedades fungicidas e insecticidas. Este mecanismo de acción empieza desde la repelencia hasta la disuasión de su alimentación, oviposición y toxicidad tanto de nemátodos como insectos, además de inhibir el crecimiento de hongos (Bayona, 2012).

Por otra parte, el diente de león tiene principios activos que hace posible tener un efecto estimulante sobre el suelo y el compost. Además, la presencia de potasio hace que las plantas tengan una buena reacción frente a la sequía lo que evita que exista un marchitamiento lento (Yourzed, 2020).

Finalmente, está la cola de caballo que, gracias a su alto contenido de sílice y saponina tóxica para hongos llamada Equisetonina, es utilizado como fungicida debido a que controla diferentes tipos de hongos como Roya, Oidiosis, Mildiu, entre otras. Debido a su mecanismo de acción donde se engrosan las paredes celulares, y esto hace que los hongos no puedan penetrar en los tejidos del cultivo (Andrade, 2011).

Es por esta razón, que el estudio de los extractos vegetales tiene una gran importancia ya que se busca que los productores agrícolas hagan uso de productos biológicos que sean generados a un menor costo, y lo más importante que tengan un efecto menos contaminante para el medio ambiente en relación con los productos agroquímicos (Fonegra y Jiménez, 2006)

Asimismo, esta investigación, se encamina en conocer el efecto de tres extractos vegetales (cola de caballo, ruda, diente de león) como biofungicidas para el hongo presente en diferentes cultivos, como es el caso de *Fusarium oxysporum*, hongo que causa la marchitez de algunas plantas debido al bloqueo físico de los vasos del xilema y además por producción de toxinas, hongo que puede ocasionar hasta un 100% de pérdidas la producción del cultivo debido a su agresividad al momento de ataque (Velázquez del Valle y otros, 2007).

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Descripción botánica y propiedades fungicidas de plantas utilizadas como extracto

Ruda (*Ruta graveolens*)

La ruda, *R. graveolens*, se conoce como una planta procedente del Mediterráneo Oriental. En la actualidad es cultivada en diversas partes del mundo como Canadá, Estados Unidos, México, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Chile (Botanical Online, 2009). Esta planta perteneciente a la familia de las Rutáceas, se reconocen por ser arbustos de hasta 1 m de altura con una raíz leñosa y fasciculada. Su tallo, de estructura leñosa en la base y con ramas superiores herbáceas, es cilíndrico y erguido (Endara y otros, 2008); (IICA, 2005).

Posee hojas alternas, profundamente divididas, azuladas y muy aromáticas, desprendiendo un aroma muy fuerte y característico. Florecen formando en el extremo de los tallos, abundantes flores amarillas que miden de 8 a 10 mm de diámetro, generalmente con cinco pétalos, dispuestas en inflorescencias cimosas y polinizadas por insectos (Álvarez, R., 2008); (James, S., 2006). El fruto es una cápsula que se abre por valvas para liberar un gran número de pequeñas semillas (IICA, 2005).

La especie *R. graveolens* contiene sustancias como la rutina y la inulina, las cuales en estudios han demostrado su efecto nematocida, además, se ha reportado que las hojas y las flores contienen alcaloides y flavonoides con propiedades insecticidas y fungicidas.

En la actualidad, los metabolitos son quienes cumplen un rol importante que funcionan como un mecanismo de defensa en las plantas ; es por esa razón, que en los últimos años se está volviendo al uso de plantas como fuentes de pesticidas ya que son más seguros tanto para el medio ambiente, como para la salud de los seres humanos (Guiracocha, 2014).

Cola de caballo (*Equisetum bogotense*)

Esta hierba es erecta que puede llegar a medir 50 cm de alto con rizomas muy ramificados y oscuros. Sus tallos eréctiles, gráciles y macizos tienen de entre 1 a 2 mm de diámetro, además de ser surcados por costillas muy marcadas (Ferreyra y Lorraine, 2012). Las hojas son muy pequeñas, reducidas a escamas de color café que se encuentran dispuestas en anillos espaciados a lo largo del tallo. Los esporangios conocidos como su estructura reproductiva, se encuentran en las puntas de las ramas en forma de un tipo de espigas pequeñas, conocidos como estróbilos, pueden llegar a medir hasta 1,2 cm de largo, son de color café oscuro, y sus esporas, verdes (Garden, 2020). Se encuentra principalmente en la región Insular, costera y andina, pero principalmente en Bolívar, Carchi y Chimborazo (Tropicos.org, 2020).

La especie (*Equisetum arvense*) se utiliza para el control de hongos por contener sílice y Equisetonia, saponina tóxica para hongos como la Roya (heridas en las hojas), Oidiosis (polvo blanco sobre las hojas), Mildiu (manchas blanquecinas debajo de las hojas), *Phytophthora sp* (pudrición y marchitez de plantas), *Septoria* (manchas oscuras en hojas), *Botrytis sp.* (pudrición de brotes, flores y frutos), *Alternaria* (manchas oscuras en hojas), etc. El engrosamiento de paredes celulares, es el principal mecanismo de acción y esto hace que la penetración del hongo sea impedida. La cola de caballo es utilizada de manera preventiva y curativa (agroalimentando, 2015).

Diente de león (*Taraxacum officinale*)

Es una planta perenne que alcanza una altura de hasta 40 cm. Sus hojas están en forma de roseta basal, que varían bastante, desde enteras hasta divididas en lóbulos triangulares y sin peciolo, presentan un borde dentado y pueden medir hasta 25 cm de longitud. Las raíces son gruesas y profundas de hasta 30 cm de longitud. Los tallos florales son cilíndricos y no tienen hojas, presentan una cabezuela floral en el extremo. Las flores se disponen en capítulos

solitarios en el extremo de un pedúnculo largo, cilíndrico y hueco. El receptáculo donde se sitúan las flores es un poco aplanado sin escamas. Las flores son muy características, ya que están formadas por diminutas y numerosas flores liguladas de color amarillo. Los frutos son aquenios dotados de penacho, que forman un característico vilano plumoso, el mismo que presenta una forma esférica.

Las semillas del diente de león tienen la capacidad de extenderse gracias a su sistema de diseminación que las ayudan a volar lejos de la planta madre, alcanzando hasta 7 kilómetros de distancia, es por esta razón que la polinización es más por el viento que por los insectos. Es importante señalar que las rosetas de variedades cultivadas son mucho más grandes, ya que pueden alcanzar hasta 50 cm de diámetro (Guiracocha, 2014).

Es altamente alcalino en la naturaleza y tiene fungicida natural que evita la proliferación de hongos y mohos. Para aprovechar bien los principios amargos del Diente de León, responsables del efecto estimulante que tienen sobre el suelo y el compost, y el potasio, importantísimo en las reacciones de la planta frente a la sequía, para evitar un marchitamiento prematuro, es muy importante recoger ésta planta entera y en flor. Muy útil en praderas y céspedes (Yourzed, 2014).

Utilización de extractos vegetales

El uso de los extractos vegetales para controlar los hongos patógenos en una agricultura ecológica trae consigo una alternativa importante por su efectividad, además de que su costo es bajo y no contaminan al ambiente. Además, tienen características antivirales, antimicrobianas o repelentes lo que permite proteger los cultivos y aumentar la calidad del mismo, además a diferencia de los agroquímicos, son menos tóxicos y son más fácilmente degradables (Corpoica, 2002).

Inhibición de fitopatógenos a nivel in vitro

La evaluación de extractos vegetales sobre la inhibición de patógenos a nivel in vitro es la primera fase que indica el potencial prometedor de una planta para ser usada en tratamientos pre y poscosecha. La mayor parte de los estudios son básicos y solo se reporta la concentración en la cual se presenta un efecto inhibitorio, sin embargo, es necesario investigar sobre el efecto de los extractos vegetales en aspectos moleculares, bioquímicos, morfológicos del hospedero y del patógeno para conocer el modo y mecanismo de acción, el efecto toxicológico y así determinar cuáles son los compuestos responsables de la actividad anti fúngica y de esta manera aislar e identificar los compuestos activos y los cambios moleculares, morfológicos y bioquímicos que estos compuestos causan sobre el patógeno. A pesar de los múltiples reportes, aún no existe un consenso en las concentraciones del extracto para su evaluación, que permitan clasificar la respuesta biológica en compuestos activos e inactivos, lo que conlleva a que no haya un rango de concentraciones definido entre autores para clasificar un extracto vegetal como anti fúngico promisorio (Cowan, M.M, 1999).

Extractos vegetales y metabolitos bioactivos de las plantas

Existe una tendencia mundial en donde se resume que el uso de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades, ha ido aumentando de manera considerable en los últimos años. El conocimiento tradicional permite que se busquen alternativas terapéuticas con el uso de plantas reconocidas (Cordell,G, 2000). Los metabolitos secundarios que presentan las plantas como compuestos nitrogenados, fenoles, terpenos, entre otros., hacen que sirvan como mecanismo de defensa debido a que mucho de éstos tienen propiedades antimicrobianas. Estos metabolitos no solo presentan estas propiedades sino que también, cumplen la función de protección contra los depredadores, microorganismos fitopatógenos, así como también algunos tipos de estrés abióticos como la exposición a los rayos UV (Ávalos García, A., 2000); (Cowan,

M.M, 1999). Gracias a que en los últimos años se han hecho investigaciones en plantas, se ha evidenciado que estas tienen funciones biológicas y químicas de defensa gracias a la cantidad de compuestos que tienen que hacen posible que funcionen biológicamente en contra de hongos (Ávalos García, A., 2000).

Existen compuestos como los terpenos que actúan como defensa de plantas como toxinas y elementos que disuaden en la alimentación tanto de mamíferos como de insectos y estos disminuyen la permeabilidad de la membrana celular lo que hace posible que las mitocondrias se reduzcan de manera drástica y esto hace que se perjudique la respiración de los insectos. Existen otros compuestos fenólicos como las cumarinas, flavonoides, ligninas y taninos que brindan rigidez a la pared celular o tejidos, lo que hace que actúen como repelentes, generando así una muerte celular (Gersehenson, J y Croteau, R., 1992); (Dixon, R.A , 2001); (Dixon, R.A. y Paiva, N.L., 1995); (Wuyts, N, y otros., 2006) (Ávalos García, A., 2000).

Métodos de extracción y caracterización de extractos vegetales

Existen diferentes maneras de obtener los extractos, los diferentes compuestos obtenidos se extraen de diferentes partes vegetativas de la planta como raíces, hojas, tallos, flores y frutos, que previamente son trituradas ya sea por peso o por un tamaño de partícula determinado, siempre en contacto con un solvente. Existen muchas técnicas de extracción como la percolación, el arrastre con vapor, ultrasonido, entre otras. En la extracción Soxhlet se pueden obtener extractos acuosos, etanólicos, aceites esenciales o a su vez, se puede utilizar diversos compuestos dependiendo la polaridad. Después de la extracción, la mezcla es filtrada y el material insoluble se lava con el solvente para que así se tenga un extracto concentrado. Existen diferentes métodos que se emplean para realizar una extracción y dependiendo del que se utilice, se presentarán altos rendimientos de extracción, además de una variedad de componentes debido a las características polares. Gracias a técnicas como la espectrofotometría

de masas (HPLD-DAD-MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) se permite aislar componentes principales de las plantas (Maldoni, B., 1991)

Extracción por ultrasonido

El ultrasonido se propaga a través de ondas mecánicas que conforman un conjunto de ciclos. Estos ciclos son definidos por altas denominadas compresiones y bajas presiones, rarefacciones, todas estas combinadas (Awad, T.S. y otros., 2012); (Musielak, G., y otros., 2016). Existen características en las ondas de ultrasonido como:

- Longitud (m): distancia entre dos puntos de compresión o rarefacción.
- Amplitud (m): altura máxima de una onda.
- Frecuencia (Hz): número de ciclos por unidad de tiempo.
- Velocidad (m/s): producto de la frecuencia por la longitud de onda.
- Potencia (W): cociente entre la energía transportada y el tiempo considerado.
- Intensidad (W/cm^2): cociente de una unidad de potencia a través de una unidad de área.

Las ondas que se encuentran implicadas en el ultrasonido se les conoce como ondas ultrasónicas, sus frecuencias están por encima del intervalo (>20 kHz) y por debajo de frecuencias de microondas (hasta 10 MHz) (Kadam, S.U. y otros , 2015)

La extracción por ultrasonido tiene una fuerza impulsadora acústica, que es capaz de realizar una serie de compresiones y rarefacciones en el solvente que se utiliza en el extracto y esto hace posible que se formen burbujas ya que existen cambios de temperatura y presión (Shirsath, S.R. y otros, 2012).

Evaluación de actividad biológica de extractos vegetales en hongos fitopatógenos

Cuando se obtienen tanto los extractos vegetales como los compuestos, para poder evaluar su potencial biológico se los hace a través de pruebas a nivel *in vitro* e *in vivo*. La mayoría de

sus evaluaciones consisten en exponer al hongo a diferentes concentraciones de extracto en un medio PDA (agar-papa-dextrosa) (Nene, Y.L. y Thapilyal, P.N., 2000). Por otro lado, existen los macrométodos que son aquellos que se basan principalmente en analizar una difusión en disco de agar, el cual determina la inhibición en una concentración de extracto determinada empleando así un fungicida sistémico como control positivo. Otros de los métodos que se emplean es “envenenar” el medio de cultivo, en el que se adiciona una concentración conocida de extracto y esta se disuelve en el testigo absoluto, posteriormente se adiciona un inóculo del patógeno para finalmente ser evaluado. A su vez, existen también los micro métodos que se diferencian principalmente de los macro métodos porque se realizan mediante micro platos estériles para determinar una concentración mínima inhibitoria (MIC), para seguir la variación que tiene el crecimiento del patógeno se realizan una densidad óptica, la cual consiste en la suspensión de las esporas de cada uno de los hongos evaluados, en una concentración aproximada de $2,5 \times 10^4$ esporas/ml donde la primera evaluación se la realiza durante los primeros 30 minutos y pasadas las 48 horas, a una temperatura de 25°C (Ávalos García, A., 2000)

CAPÍTULO III: OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo General

Identificar la actividad anti fúngica de los extractos de cola de caballo, diente de león y ruda sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, causante de varias enfermedades en cultivos de importancia económica

3.2 Objetivos específicos

Determinar el efecto anti fúngico de ruda, cola de caballo y diente de león mediante conteo de esporas y crecimiento micelial.

- 2 Comparar el crecimiento y desarrollo de *Fusarium oxysporum* en el medio inoculado con ruda, cola de caballo y diente de león.
- 3 Identificar qué extracto tiene mayor control contra *Fusarium oxysporum*

3.3 Hipótesis

Los tres extractos vegetales ruda, cola de caballo y diente de león son eficientes para el control de *Fusarium oxysporum*.

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Extractos vegetales.

El material vegetal empleado consistió en coleccionar flores y raíz de la especie diente de león (*Taraxacum officinale*), planta entera de cola de caballo (*Equisetum bogotense*); mientras que con la ruda (*Ruta graveolens*) se consideró hojas, tallo y raíz; este material fue recolectado en horas tempranas de la mañana, encontrándose las plantas en la fase fenológica vegetativa.

4.1.2 Preparación de muestras.

Las partes vegetativas (planta entera, raíz, tallo y hojas) se lavaron con agua para eliminar la tierra y se secaron durante 30 minutos. Posteriormente, se introdujo en la máquina agitadora, las partes vegetativas con diferentes pesos de acuerdo con el material vegetal utilizado para los tratamientos, cada uno mezclado con 100 ml de alcohol absoluto, es decir al 99.8%. Esta actividad se realizó durante una hora mediante ultrasonido. Finalmente, se obtuvo el extracto.

4.2 Equipos

4.2.1 Cámara de flujo laminar.

La cámara de flujo laminar proporciona aire limpio en el área de trabajo y brinda un flujo constante de aire hacia fuera de ésta para que se impida que entre aire a la habitación. El aire que sigue hacia el exterior de la cámara, elimina contaminantes que el personal pueda introducir en el área que se va a trabajar. Una de las partes más importantes de la cámara de flujo laminar es el filtro HEPA (fuente de aire) ya que tiene una alta eficiencia para poder retener bacterias. Una vez que el aire pasa a través de un filtro que retiene contaminantes con partículas mayores como pelusas y polvo, se dirige a este filtro HEPA para controlar partículas de hasta $0,3 \mu\text{m}$ o mayores lo que elimina contaminantes hasta un 99.97% (Shors, 2009)

4.2.2 Cámara de Neubauer.

También conocida como hemocitómetro, tiene un cubreobjetos de cuarzo y un portaobjetos de un grosor mayor a los comunes. En la parte superior del portaobjetos, existen cuatro canales longitudinales y otro transversal central. Tanto la parte inferior como superior del canal transversal central de la cámara, se encuentran dos rejillas de 9 mm^2 de superficie, las cuales están subdivididas en una cuadrícula más pequeña. Para el conteo de las esporas, es necesario localizar el cuadro central de la rejilla, es decir, ubicar la cuadrícula de 25 cuadros de $0,04 \text{ mm}^2$, esto enfocado con el objetivo 10x. Posteriormente, se cambió de lente al objetivo 40x y se procede al conteo de las esporas. Para que los resultados sean más precisos, se recomienda tener un conteo entre doscientas y trescientas células por muestra (Morales, 2004).

4.3 Método de laboratorio

4.3.1 Método de extracción por ultrasonido.

Todas las muestras de cola de caballo, diente de león y ruda con sus respectivas partes vegetativas, es decir, planta entera para cola de caballo; flores y raíz para diente de león; raíz

tallo y hojas para ruda, que previamente fueron pesadas y secadas, se ubicaron en la máquina de extracción por ultrasonido durante 60 minutos con 100 ml de alcohol absoluto.

4.3.2 Esterilización de extractos.

Los extractos vegetales fueron filtrados mediante papel filtro y éstos fueron colocados en la cámara de flujo laminar para su esterilización. Posteriormente, se realizó una micro-filtración con “milipores” y se puso el extracto en frascos previamente esterilizados.

4.3.3 Cultivo de *Fusarium in vitro*.

En la cámara de flujo laminar, se realizaron varias replicaciones de las cepas obtenidas en el laboratorio de Biotecnología Agrícola y Alimentos de la USFQ, donde con el uso de palillos, se extrajo el micelio de estas cepas y fueron replicadas en cajas que solo contenían PDA. Las cajas Petri fueron selladas con Parafilm para evitar su contaminación. Para el crecimiento del hongo, las cajas fueron llevadas a una incubadora con una temperatura de 25°C.

4.3.4 Preparación de medios de cultivo y unidades experimentales

Se preparó 1.5 L de medio de cultivo PDA de acuerdo a la metodología convencional, el medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos y se dejó enfriar. Para la evaluación de cada extracto se separaron por cada especie de planta en dos Erlenmeyer, 190 ml y 180 ml de PDA líquido enfriado a temperatura ambiente. Al primero se añadió 10 ml y al segundo 20 ml del extracto correspondiente, obteniendo así las dos concentraciones a evaluar al 5 y 10% respectivamente. La mezcla de cada uno de los dos Erlenmeyer conteniendo las respectivas concentraciones del extracto de cada especie se dispensó a once cajas Petri que constituyen las réplicas de cada tratamiento. Tanto la preparación de las concentraciones como el dispensado, se realizó en una cámara con ambiente estéril.

Para el control, se separó otro Erlenmeyer con 200 ml de PDA y se dispensó directamente en cajas Petri obteniendo el mismo número de réplicas. A los tratamientos de extractos al 5% con su respectivo control se los denominará Experimento 1, mientras que a los del 10% se los denominará Experimento 2.

4.3.5 Siembra de *Fusarium oxysporum*

Las cajas Petri que contenían tanto solo PDA para el control, como los tratamientos PDA + extracto, se llevaron a una cámara de bioseguridad donde se realizó la siembra de *Fusarium oxysporum*, para ello, se extrajo de cajas Petri donde se cultivó previamente el patógeno y con la ayuda de un sacabocado una muestra de 4.3 cm de diámetro la cual se ubicó en el centro de cada caja tratamiento y control y en todas las réplicas, se selló con parafilm para evitar contaminación y luego se llevaron a incubadora a 25°C donde se las mantuvo por 8 días hasta su evaluación.

4.3.6 Crecimiento micelial y UFC/ml

Se utilizó una regla milimétrica para medir el crecimiento micelial de cada tratamiento. Para las UFC/ml, una vez que el testigo alcanzó el desarrollo completo en las cajas Petri, fueron trasladados a la cámara de bioseguridad. En cada caja se añadió 1 ml de agua destilada para posteriormente mezclar cuidadosamente el micelio del hongo con ayuda de un triángulo de vidrio. Esta mezcla se llevó a un frasco estéril que tenía en la parte superior papel filtro. Después con una micropipeta, se extrajo 1 µl de la mezcla e inmediatamente se colocó en una cámara de Neubauer.

Esta cámara fue llevada al microscopio para visualizar las unidades formadoras de colonia por mililitro.

4.4 Método estadístico

4.4.1 Diseño experimental.

El diseño experimental utilizado fue DCA (diseño completamente al azar), el cual se caracteriza por presentar experimentos de una vía o un criterio de clasificación sin interacción, es decir, sus unidades experimentales no pueden reaccionar o responder a un tratamiento de la misma manera o con la misma capacidad gracias a las diferencias intrínsecas (Sánchez O., J., 2018). Se evaluaron 6 tratamientos: extracto de tallo y raíz de ruda vs. *Fusarium*, extracto de hojas de ruda vs. *Fusarium*, extracto de planta entera de cola de caballo vs. *Fusarium*, extracto de raíz de diente de león vs. *Fusarium* y extracto de flores de diente de león vs. *Fusarium*. Incluyendo un control *Fusarium* sin extracto, cada tratamiento fue replicado 11 veces para la evaluación de crecimiento micelial.

Por otra parte, para la evaluación de UFC/ml se utilizaron los mismos tratamientos, pero solo tres repeticiones.

4.4.2 Prueba de significación estadística.

Para el análisis funcional de la variancia que incluye un conjunto de técnicas que se utilizan para obtener mayor información de los factores cuando estos constituyen efectos fijos, es necesario utilizar pruebas de significación estadística ya que éstas permiten agrupar a los tratamientos en rangos para identificar los mejores y peores tratamientos en base a la magnitud de sus medias. Para conocer qué extracto tuvo una mayor inhibición de *Fusarium oxysporum*, se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan, la cual consiste realizar comparaciones mediante todas las medias de los tratamientos (Sánchez O., J., 2018).

4.4.3. Variables de respuesta.

Las variables utilizadas para determinar qué extracto tuvo mayor inhibición del hongo *Fusarium oxysporum* fueron crecimiento micelial medido en cm y unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml).

4.4.3.1 Crecimiento micelial.

Para los datos de la variable de crecimiento micelial, tomados cada dos, cuatro, seis y ocho días, se utilizó una regla milimétrica para medir dos valores por cada caja (horizontal y verticalmente) (Anexo A). Posteriormente, se sacó el promedio de estos dos valores para finalmente obtener el crecimiento del hongo por caja.

Para analizar el porcentaje de crecimiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo para los tratamientos, se utilizó la siguiente fórmula, según (Viscaíno, 2007):

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{Diámetro de crecimiento del hongo en el extracto}}{\text{Diámetro del control negativo}} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento}$$

4.4.3.2 Unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml).

Una vez que se alcanzó el desarrollo completo del control, se procedió a contar las unidades formadoras de colonia por ml de cada repetición. Cabe mencionar, que la cuantificación de las unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml) es un método sencillo que se utiliza para la enumeración de hongos y bacterias. Para determinar las UFC/ml se utilizó la siguiente fórmula (Arana, y otros, 2010):

$$\text{UFC/ml} = \frac{\Sigma \text{ de colonias por placa} * \text{factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

Adicionalmente, se utilizó la primera dilución para el conteo de las esporas.

CAPÍTULO V: RESULTADOS

A continuación, se presentan las tablas de resultados del Experimento 1: Evaluación de extractos al 5%.

Tabla # 1 ANOVA para el crecimiento micelial del hongo medido en cm, con 5 % de concentración

FV	GL	CM	Fc	Ft
Total	65	-	-	-
Tratamientos	5	5.68999	290.078*	2,37
Erro Exp.	60	0.01962		

$p \leq 0,05$ *Significativo

$$CV=26,15\% \quad Sy=0.0422 \quad Sd= 0.0597$$

En base al ANOVA realizado para el crecimiento micelial con extracto al 5%, medido en cm, se observó que existe diferencia significativa en los tratamientos. El análisis de los componentes de la variancia, demuestra que la variancia entre los tratamientos es relativamente alta debido al diferente comportamiento de los tratamientos en cuanto a la inhibición de *Fusarium*.

Tabla # 2 Prueba de rango múltiple de Duncan de crecimiento micelial (cm) con 5 % de concentración

	Cola caballo (P.E)	Ruda (tallo-raíz)	Ruda (hojas)	Diente (raíz)	Diente (flores)	Control
	5	1	2	4	3	6
\bar{y}	0.07	0.12	0.24	0.3	0.51	1.97
Rango	d	c	c	b	b	a

A partir de las medias estimadas para la variable de crecimiento micelial con extracto al 5 % de concentración, se determinó si entre los tratamientos aplicados, eran iguales o diferentes. En la tabla 1, se observa que cada tratamiento tuvo un comportamiento diferente. Al aplicar la prueba de Rango Múltiple de Duncan, donde el rango d es el de mayor inhibición del hongo, y el rango a, de menor inhibición, se obtuvo que el que mayor inhibición del hongo

al mezclar el extracto al 5% fue cola de caballo (planta entera) que al estimar el crecimiento micelial tuvo una magnitud de 0.07 cm en promedio, mientras que como se esperaba, el control fue el tratamiento que menor inhibición tuvo ya que, su resultado fue de 1,97 cm en promedio.

(Anexo B)

Tabla # 3 ANOVA para variable: UFC/ml con 5% de concentración

FV	GL	CM	Fc	Ft
Total	17	-	-	-
Tratamientos	5	6.85E+17	63.818*	3,11
Erro Exp.	12	1.07E+16		

$p \leq 0,05$ *Significativo

$$CV=40.06\% \quad Sy= 5.98E+07 \quad Sd= 8.46E+07$$

En base al ANOVA realizado para la variable UFC/ml, se observa que existe diferencia estadística en los tratamientos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, ya que no todos los tratamientos presentaron el mismo control para el hongo. El análisis de los componentes de la variancia, muestra que para los tratamientos la variancia fue alta debido al efecto de los diferentes extractos para esta variable.

Tabla #4 Prueba de rango múltiple de Duncan de UFC/ml 5% de concentración

	Ruda (hojas)	Ruda(tallo-raíz)	Cola (P.E)	Diente (raíz)	Diente (flores)	Control
	2	1	5	4	3	6
\bar{y}	4.50E+07	4.67E+07	5.83E+07	7.50E+07	9.33E+07	1.23E+09
Rango	b	b	b	b	b	a

Al comparar las medias de los tratamientos de la variable de UFC/ml, se obtuvo que el extracto que tuvo menor esporas de *Fusarium* fue de hojas de ruda con 4.50E+07 UFC/ml en promedio, mientras que como se esperaba, el control tuvo un resultado de 1.23E+09 UFC/ml en promedio. Sin embargo, es necesario mencionar que no existió diferencia entre los tratamientos con extracto al 5% pero si en relación con el control (Anexo C).

A continuación, se presentan las tablas de resultados del Experimento 2: Evaluación de extractos al 10%

Tabla #5 ANOVA de variable UFC/ml con 10% de concentración

FV	GL	CM	Fc	Ft
Total	17	-	-	-
Tratamientos	5	7.40E+17	69.975*	3,11
Erro Exp.	12	1.06E+16		

$p \leq 0,05$ *Significativo

$$CV = 46,87\% \quad Sy = 5.94E+07 \quad Sd = 8.40E+07$$

En base al ANOVA realizado para la variable UFC/ml con extracto al 10%, se observa que existe diferencia estadística en los tratamientos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, ya que todos los tratamientos presentaron diferentes niveles de control de *Fusarium*. El análisis de los componentes de la variancia, demuestra que para tratamientos la variación es alta, debido a que se obtuvieron respuestas diferenciadas para cada extracto evaluado para esta variable.

Tabla #6 Prueba de rango múltiple de Duncan de variable UFC/ml con 10% de concentración

	Diente (raíz)	Ruda (tallo-raíz)	Diente(flores)	Cola (P.E)	Ruda (hojas)	Control
Tratamientos	4	1	3	5	2	6
\bar{y}	1.00E+07	1.67E+07	1.67E+07	1.83E+07	2.17E+07	1.23E+09
Rango	b	b	b	b	b	a

Al comparar las medias de los tratamientos de la variable UFC/ml con extracto al 10%, se obtuvo que el extracto con menor número de unidades formadoras de colonia por ml, fue diente de león (raíz) con 1.00E+07 UFC/ml y como se esperaba, el control fue el de mayor UFC/ml con un resultado de 1.23E+09 UFC/ml, pero cabe mencionar, que entre extractos no existió diferencia significativa y ocuparon un mismo rango de significación, pero presentaron marcadas diferencias en relación con el control (Anexo D).

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

Variable 1: crecimiento del hongo medido en cm.

El análisis de la varianza del crecimiento del hongo indica que entre los tratamientos existen diferencias significativas, lo que es un indicativo que el comportamiento entre los extractos es diferente ya que se existieron resultados diferentes en cada uno de ellos (control con 1,97 cm; diente de león (flores) con 0.51 cm, diente de león (raíz) con 0.30 cm; ruda (hojas) con 0.24 cm, ruda (tallo-raíz) con 0,12 cm y cola de caballo (planta entera) con 0.07 cm de crecimiento del hongo), por lo que 20 ml de extracto mostraron diferentes valores de inhibición ya que mientras mayor porcentaje de alcohol tengan los extractos, mayor es su inhibición (Daferera y otros, 2003), donde a los ocho días de haberse registrado los valores de inhibición, absolutamente todos los extractos evaluados, en cuanto a medición de crecimiento micelial en cm tuvieron 0 cm de crecimiento, mientras que el testigo o control (solo PDA) alcanzó crecimiento total al octavo día; a diferencia de 10 ml de extracto (equivalente a 5%) que reaccionaron de diferente manera, tal es el caso de ruda que tuvo un crecimiento micelial de 0 cm en el primer día, mientras que en el día ocho, el crecimiento aumentó a 1.45 cm. Según Rodríguez y otros (2000) quienes utilizaron extractos hidroalcohólicos de escoba amarga, aroma amarilla y salvia cimarrona donde se mezclaron 30 g del material vegetal con 30 ml de alcohol etílico al 35% (v/v) macerados durante 4 días, se hicieron mediciones al tercer, quinto y séptimo día contra tres tipos diferentes de hongos entre los que se encontraba *Fusarium oxysporum*. Durante el quinto día después de la inoculación, la escoba amarga (*Parthenium hysterophorus*) y la aroma amarilla (*Acacia farnesiana*), fueron los mejores tratamientos pero a partir del séptimo día el extracto de escoba amarga resultó siendo el mejor tratamiento llegando a alcanzar el 63% de inhibición, corroborando con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que en el sexto día los mejores tratamientos fueron planta entera de cola de

caballo y tallo y raíz de ruda, pero finalmente la cola de caballo terminó siendo el mejor tratamiento con 0.07 cm promedio de crecimiento del hongo. Estos resultados permiten sugerir que se utilicen concentraciones mayores para prolongar el efecto que tiene el hongo (Tewari,1995). Se ha investigado que la reactividad de los grupos hidroxifenólicos, presentes en los extractos evaluados, forman enlaces de puentes de hidrógeno con sitios que tienen activos ciertas enzimas (Farag y otros., 1989). Según (Sánchez Otero, 2018), el coeficiente de variación (CV) es un parámetro que mide el porcentaje de error con respecto a la media, el cual no debería ser mayor al 20%; en esta investigación se obtuvo un 26,15% de CV lo que representa un valor superior al esperado, debido a una diferenciada respuesta de los diferentes extractos. Este parámetro depende de la magnitud de la media experimental, y de la estimación de la error estándar, cuyos resultados además dependen de varios factores bióticos como abióticos, presentes en el laboratorio (Holland y Jan, 2010).

Cabe mencionar, que no se reportan los resultados de 10 % de concentración para esta variable, debido a que todos los tratamientos, a excepción del control, tuvieron una inhibición al 100% durante ocho días, pero al analizar el extracto al 5%, el mejor tratamiento fue el de planta entera de cola de caballo, y para determinar estadísticamente el mejor tratamiento, se realizó la prueba de Duncan donde no existieron diferencias estadísticas entre los extractos y de acuerdo con la media general de los mismos, presentaron una significativa diferencia en relación al control (0.07 vs. 1.97 cm de crecimiento), lo cual es corroborado por Andrade(2011), que indica que el principal mecanismo de acción que tiene la cola de caballo, se basa principalmente en el engrosamiento de las paredes celulares, lo que hace que la penetración de los hongos sea impedida. Además, Trabe (2014) indica que el extracto de cola de caballo tiene flavonoides como isoquercitósido, galuteolina o equisetrina que hace que el extracto de esta planta sea una de las mejores opciones como biofungicida por ser más eficaz. Estos compuestos hacen que la membrana citoplasmática del hongo sea atacada ayudando al escape de

componentes intracelulares (Nychas, 1995) lo que hace que las enzimas se inactiven y por ende la también, el desarrollo fúngico.

Debido a que los tratamientos (extractos vegetales) se comportaron de diferente manera, se estima que el crecimiento del hongo inoculado en los tratamientos con 10 ml de extracto, empezó al segundo día, pero éste no tuvo un crecimiento significativo en los siguientes ocho días. (Anexo E).

Se utilizó la fórmula de (Viscaíno, 2007) para calcular el crecimiento e inhibición del hongo, el mejor tratamiento en cuanto a la variable de crecimiento micelial fue cola de caballo, el cual tuvo un 3.51% del crecimiento, por lo que su inhibición fue de 96,49% de inhibición, mientras que le segundo mejor tratamiento fue el extracto de ruda: tallo-raíz con un crecimiento del hongo de 6,18%, por ende su inhibición fue 93.82%.

Según (Sánchez Otero, 2018), el coeficiente de variación (CV) es un parámetro que mide el porcentaje de error con respecto a la media, el cual no debería ser mayor al 20%; en esta investigación se obtuvo un 26,15% de CV lo que representa un valor superior al esperado, debido a una diferenciada respuesta de los diferentes extractos. Este parámetro depende de la magnitud de la media experimental, y de la estimación de la error estándar, cuyos resultados además dependen de varios factores bióticos como abióticos, presentes en el laboratorio (Holland y Jan, 2010).

Variable 2: UFC/ml

Al realizar la prueba de rango múltiple de Duncan, no existieron diferencias significativas entre los extractos, a diferencia del control, esto pudo deberse a que el hongo que se mantuvo expuesto al medio PDA con los extractos, y reaccionó a los diferentes compuestos presentes en los diferentes extractos. Asimismo, se obtuvo que el tratamiento que menor unidades formadoras de colonia por ml fue ruda (hojas). Si bien es cierto, al evaluar el

crecimiento micelial del hongo, resultó que el tratamiento que tuvo mayor inhibición del *Fusarium o.* fue cola de caballo (planta entera) sin embargo, no existe relación con los resultados obtenidos con las UFC/ml. Por otra parte, (Oliva, y otros, 2003) indican que la variabilidad de los resultados en los conteos, puede deberse a la heterogeneidad del crecimiento micelial en la caja Petri. En este mismo aspecto, (Reyes Quintana, y otros, 2014), evaluaron el efecto del extracto de ruda en el crecimiento micelial de *Trichoderma* indicando que el crecimiento desde diversos puntos de germinación no permitió el crecimiento radial de la cepa debido a la distribución de las esporas, lo que influye en la zona de muestreo de cada caja. Considerando que el extracto de ruda (hojas) con 4.50×10^7 UFC/ml fue el mejor tratamiento, seguido de ruda (tallo+raíz) con 4.67×10^7 estos dos extractos mostraron significativas diferencias con el testigo que obtuvo 1.23×10^9 UFC/ml, lo que denota la efectividad de la ruda como extracto al realizar el conteo de esporas, esto a una concentración del 5% (10 ml de extracto). Estos resultados inhibitorios pueden atribuirse a los más de 15 compuestos presentes en esta planta, en los que se encuentran los alcaloides, acridona, cumarinas, furanocumarinas, flavonoides entre otros, así como también, a los aceites esenciales los cuales ayudan a la inhibición de la germinación de los hongos fitopatógenos filamentosos (Oliva, y otros, 2003); (Hal y otros, 2004). Los resultados fueron diferentes cuando se utilizó una concentración del 10% (20 ml de extracto), ya que el mejor tratamiento fue la raíz del diente de león, ya que tuvo 1.00×10^7 UFC/ml y esto se debe, gracias a su efecto estimulante que hace que la planta tenga un crecimiento armonioso, así como la vida microbiana de la tierra y esto hace posible que también las capacidades defensivas contra patógenos se estimulen. Además, está compuesto por potasio y calcio que en su valor nutricional por cada 100 gramos, contiene 397 mg de potasio y 187 mg de calcio, haciendo que las plantas reaccionen frente a una sequía, evitando así un marchitamiento prematuro (Domínguez Gento, 2010). Mientras, que el segundo mejor tratamiento fue ruda (tallo-raíz) coincidiendo con los resultados al utilizar

10 ml de extracto (5% de concentración) gracias a sus más de 15 compuestos en los que se encuentran los alcaloides, acridona, cumarinas, furanocumarinas, flavonoides entre otros (Oliva, y otros, 2003);

Adicionalmente, tanto en los tratamientos con 10 ml de extracto, como de 20 ml, se obtuvieron coeficientes de variación entre 40-46% de variabilidad, debido a que los extractos presentaron marcadas diferencias, las cuales pudieron ser influenciados por múltiples factores tanto bióticos, como abióticos en el laboratorio (Holland y Jan, 2010).

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El método ultrasonido utilizado para la extracción de las plantas fue eficiente ya que permitió diferenciar a los extractos vegetales en su comportamiento para el control de *Fusarium o.*
- La concentración de algunos metabolitos de las plantas es importante ya que se han identificado aspectos cualitativos y cuantitativos debido a la presencia de éstos, ya que se les atribuyen propiedades anti fúngicas
- La actividad de los extractos no solo se debe a su presencia, sino también a la concentración que se utilice en cada uno de ellos, las concentraciones utilizadas fueron al 5% y 10% mostrando diferencias en cuanto a los resultados, donde en la primera concentración sí existió crecimiento micelial, mientras que, al 10%, la inhibición del hongo *Fusarium oxysporum* fue completa.
- El extracto de la planta entera de cola de caballo, con concentración de alcohol al 5%, fue el mejor tratamiento en cuanto a la variable crecimiento micelial medido en cm.

- El extracto de hojas de ruda, fue el mejor tratamiento en una concentración del 5%, mientras que la raíz de diente de león, para una concentración al 10%; estos dos extractos fueron los mejores para la variable de las UFC/ml.

Recomendaciones

- Realizar futuras investigaciones donde se continúe con la evaluación de diferentes extractos vegetales y determinar, los diferentes grupos de compuestos que hacen que estas plantas tengan propiedades anti fúngicas
- Continuar las investigaciones con una fase de evaluación en campo para verificar si los metabolitos presentes en las plantas influyen en su actividad anti fúngica, además de conocer su concentración y dosis efectiva para su aplicación.
- Modificar la escala de medición para estimar de mejor manera las respuestas de los diferentes extractos y así evitar coeficientes de variación muy altos.

CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- agroalimentando. (2015). *elhorticultor*. Obtenido de https://agroalimentando.com/nota.php?id_nota=9118
- Álvarez, R. (2008). Obtenido de https://www.canal-medicina.es/Medicina_Natural/015_ruta_graveolens_plantas_medicinales_01.html
- ambiente, M. d. (2003). *Ministerio del ambiente*. Obtenido de <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/07/CONTROL-FORESTAL.pdf>
- Andrade, J. (2011). *Alternativa ecológica*. Lima.
- Ávalos García, A. (2000). Metabolismo secundario de las plantas . *Reduca (Biología)*, 119-145.
- Awad, T.S. y otros. (2012). Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004>
- Bayona, G. (2012). *La ruda como insecticida*. Obtenido de <https://es.calameo.com/books/001676423e9e30a9dca9a>
- Botanical Online. (Junio de 2009). Obtenido de <https://www.botanical-online.com/plantas-medicinales/ruda-toxicidad>
- Cordell, G. (2000). Biodiversity and drug discovery a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, 463-480.
- Corpoica. (2002). *IV Seminario Nacional de Frutales de Clima Frio*. Medellín.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agent. *Clinical microbiology reviews*, 564-582.
- Dixon, R.A . (2001). Natural products and plant disease resistance . *Nature*, 843-847.
- Domínguez Gento, A. (2010). *Etnobotánica aplicada*. Obtenido de https://www.alcoi.org/export/sites/default/es/areas/medi_ambient/cimal/descargas/ETNOBOTANICA-APLICADA.pdf
- Endara y otros. (2008). Medicina Tradicional Andina y Plantas Curativas, Herbolario de Plantas Curativas y Medicinales. *Ministerio de Salud Pública, Programa de Aoooy al Sector Salud en el Ecuador*, 20, 362-365.
- Ferreira , M., & Lorraine, G. (2012). *Flores de la Estepa Patagónica: Guía para el reconocimiento de las principales especies de plantas vasculares de estepa*. (1° ed.). Buenos Aires: Vázquez: Mazzini Editores.
- Fonegra , R., & Jiménez, S. (2006). *Plantas medicinales arropadas en Colombia*. Antioquía: Universidad de Antioquía.
- Garden, M. B. (2020). *Mobot* . Obtenido de <http://www.mobot.org/mobot/ParamoCajas/results.aspx?taxname=Equisetum%20bogotense>
- Guiracocha, J. C. (2014). <http://dspace.ucacue.edu.ec>. Obtenido de <http://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/reducacue/6530/1/Estudio%20bibliogr%C3%A1fico%20de%20las%20propiedades%20medicinales%20y%20nutricionales%20del%20diente%20de%20le%C3%B3n.pdf>
- Holland, J. B., & Jan, W. (2010). A heritability-adjusted GGE Biplot for test environmental evaluation. *Euphytica*(171), 355-369.
- IICA. (2005). Plantas medicinales y otras especies útiles. *Diagnóstico situacional sobre la producción, industrialización y comercialización*. Managua, Nicaragua.
- James, S. (2006). Obtenido de <http://www.sobre-hierbas.com/Ruda.html>

- Kadam, S.U. y otros . (2015). Trends in Food Science & Technology Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. 60-67.
- Maldoni, B. (1991). Alkaloids: isolation and purification. *Journa of Chemical Education*, 700-703.
- Martínez, J. (2009). Virus asociados a la enfermedad de la virosis del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en los departamentos de Nariño y Putumayo de Colombia. *XV Congreso Latinoamericano y XVIII Congreso Chileno de Fitopatología*, (pág. 226). Santiago de Chile.
- Morales, G. C. (2004). *Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. México: IMTA.
- MSP. (2011). Obtenido de <https://www.salud.gob.ec/>
- Musielak, G., y otros. (2016). *Trends In Food Science and Tecnhonolgy*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.003>.
- Oliva, A., Meepagala, K. M., Wedge , D. E., Harries, D., Hale, A. L., Aliotta, G., & Duke, S. O. (2003). Natural Fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Food Chem*, 51: 890-896.
- OMS. (2007). Obtenido de <https://www.who.int/es>
- Reyes Quintana, C. K., Martínez Carrera, D., Morales Almora, P., Sobal Cruz, M., Escudero Uribe, A. H., & Ávila Acevedo, J. G. (2014). Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(8), 1433-1446.
- Rodríguez, A., Morales, D., & Ramírez, M. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. *Cultivos tropicales*, 21(2), 79-82.
- Salud, O. P. (2007). *www.paho.org*. Obtenido de https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=vigilancia-sanitaria-y-atencion-de-las-enfermedades&alias=58-la-equidad-en-la-mira-la-salud-publica-del-ecuador-durante-las-ultimas-decadas&Itemid=599
- Sánchez O., J. (2018). *Introducción al Diseño Experimental*. Ecuador: Giro creativo.
- Sánchez Otero, J. (2018). *Introducción al diseño experimental*. Ecuador: Giro Creativo.
- Shirsath, S.R. y otros. (2012). Chemical Engineering and Processing : Process Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations. *A review of current status*, 10-23.
- Shors, T. (2009). *Virus: Estudio Molecular Con Orientacion Clinica*. Madrir: Panamericana.
- Tecnoagro. (2016). Obtenido de <http://tecnoagro.com.mx/revista/2014/no-94/lavanda-lavandula-angustifoliamill-lamiaceae/>
- Tripathi, P., & Dubey, N. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest*, 32(3), 235-245.
- Tropicos.org. (14 de Mayo de 2020). *Jardín Botánico de Missouri*. Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/26605510>
- Velázquez del Valle, M., Bautista, S., & Hernández, A. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revoista Firotecnia Mexicana*, 30, 119-123.
- Viscaíno, R. L. (2007). ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL EXTRACTO TOTAL EN ETANOL DE LA HOJAS. *Scientia et Technica* , 5.
- Yourzed. (2014). *www.cultivemacasa.com*. Obtenido de <http://www.cultivemacasa.com/info/68/extractos-vegetales>
- Yourzed. (2020). *cultivemacasa.com*. Obtenido de <http://www.cultivemacasa.com/info/68/extractos-vegetales>

CAPÍTULO IX: ANEXOS

ANEXO A FORMA DE MEDICIÓN DE CRECIMIENTO DE HONGO EN CM.

EJEMPLO DE EXTRACTO DE HOJAS DE RUDA AL 5% Y AL 10%.



ANEXO B RESULTADO DE CONTEO DE CRECIMIENTO DE HONGO MEDIDO

EN CM, EN CADA TRATAMIENTO, POR REPETICIONES

Tratamientos	Repeticiones											Promedio
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
Control	1.9	1.89	2.07	1.96	1.94	2.01	1.91	1.95	1.86	2.15	2.03	1.97
Ruda (tallo-raíz)	0	0.12	0.28	0	0.36	0	0	0.21	0	0.3	0.07	0.12
Ruda (hojas)	0.38	0.23	0.07	0.19	0.61	0.12	0.41	0.31	0.04	0.267	0.06	0.24
Diente de león (flores)	0.135	0.39	0.35	0.64	0.64	0.565	0.47	0.52	0.48	0.65	0.72	0.51
Diente de león (raíz)	0.35	0.06	0.27	0.67	0.26	0.31	0.13	0.36	0.31	0.2	0.41	0.30
Cola de caballo (planta entera)	0.11	0	0.08	0	0.02	0.03	0.19	0.04	0.22	0.03	0.04	0.07

ANEXO C RESULTADOS DE UFC/ML DE CADA TRATAMIENTO CON SUS 3

REPETICIONES CON EXTRACTO AL 5%

Tratamientos	I	II	III	Σ	\bar{y}
Control	1.00E+09	1.20E+09	1.50E+09	3.70E+09	1.23E+09
Ruda (tallo-raíz)	5.00E+07	5.50E+07	3.50E+07	1.40E+08	4.67E+07
Ruda (hojas)	4.50E+07	5.00E+07	4.00E+07	1.35E+08	4.50E+07
Diente de león (flores)	7.50E+07	9.50E+07	1.10E+08	2.80E+08	9.33E+07
Diente de león (raíz)	6.00E+07	7.00E+07	9.50E+07	2.25E+08	7.50E+07
Cola de caballo (planta entera)	4.00E+07	6.00E+07	7.50E+07	1.75E+08	5.83E+07
Σ				4.66E+09	1.55E+09

ANEXO D RESULTADOS DE UFC/ML DE CADA TRATAMIENTO CON SUS 3

REPETICIONES, CON EXTRACTO AL 10%

Tratamientos	I	II	III	Σ	\bar{y}
Control	1.00E+09	1.20E+09	1.50E+09	3.70E+09	1.23E+09
Ruda (tallo-raíz)	5.00E+07	5.50E+07	3.50E+07	1.40E+08	4.67E+07
Ruda (hojas)	4.50E+07	5.00E+07	4.00E+07	1.35E+08	4.50E+07
Diente de león (flores)	7.50E+07	9.50E+07	1.10E+08	2.80E+08	9.33E+07
Diente de león (raíz)	6.00E+07	7.00E+07	9.50E+07	2.25E+08	7.50E+07
Cola de caballo (planta entera)	4.00E+07	6.00E+07	7.50E+07	1.75E+08	5.83E+07
Σ				4.66E+09	1.55E+09

ANEXO E CRECIMIENTO MICELIAL EN EL TRATAMIENTO DE COLA DE

CABALLO (PLANTA ENTERA) DURANTE 8 DÍAS.

10 ml (5%)												
Fecha	Días	<i>Repeticiones</i>										
		1	2	3	4	5	6	7*	8	9	10	11
12/18/2019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12/20/2019	2	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0.25	0	0
12/22/2019	4	0.1	0	0	0	0	0	0.15	0	0.25	0	0
12/24/2019	6	0.2	0	0.15	0	0	0	0.3	0.05	0.3	0.05	0.05
12/26/2019	8	0.25	0	0.25	0	0.1	0.15	0.45	0.15	0.3	0.1	0.15