

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Evaluación del efecto de la saponina extraída de la quinua (*Chenopodium quinoa*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de banano (*Musa x paradisiaca*)

Trabajo de Investigación

Ricardo Andrés Coello Izurieta

Ingeniería en Agroempresas

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de
Ingeniero en Agroempresas

Quito, 3 de diciembre de 2015

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Evaluación del efecto de la saponina extraída de la quinua (*Chenopodium quinoa*) sobre el crecimiento de enfermedades en el cultivo de banano (*Musa x paradisiaca*)

Ricardo Andrés Coello Izurieta

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D.

Firma del Profesor

Quito, 3 de diciembre de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma:

Nombre: Ricardo Andrés Coello Izurieta

Código: 00104176

C. I.: 1715141766

Lugar y Fecha: Quito, 3 de diciembre de 2015

Agradecimientos

Agradezco enormemente a mis padres y familia por toda la paciencia, apoyo y cariño que han tenido hacia mí durante esta etapa de mi vida. También agradezco a Antonio León, mi director de tesis, por el conocimiento y tiempo dedicado a esta investigación además del apoyo incondicional brindado. A mis profesores Mario Caviedes, Carlos Ruales, Eduardo Uzcategui y Raúl de la Torre, les agradezco por impartir en mí sus conocimientos y brindarme constante apoyo durante la carrera universitaria. Gracias a mis compañeros por su amistad durante todo este tiempo en la universidad. Gracias Ismael Herrera por la ayuda, apoyo y amistad incondicional.

Resumen

Se presenta los resultados obtenidos en la investigación sobre el efecto *in vitro* que causa la saponina proveniente de la quinua (*Chenopodium quinoa*) en el crecimiento de enfermedades que afectan al cultivo del banano (*Musa x paradisiaca*) en el Ecuador. Se seleccionó para este estudio dos enfermedades fúngicas: *Fusarium oxysporum* y *Cercospora fijiensis* (sigatoka negra) siendo esta última de mucha importancia y con un alto grado de incidencia en este cultivo específicamente. Ambos hongos patógenos fueron aislados en un medio de cultivo PDA a partir de explantes de hojas de banano con lesiones fúngicas provenientes de la hacienda La Libertad ubicada en el cantón Valencia de la provincia de Los Ríos, Ecuador. Para obtener la saponina del grano de quinua se utilizó una metodología de extracción por microondas, utilizando como solvente isopropanol al 20%. Con el fin de obtener una solución con mayor cantidad de saponinas se realizaron dos tipos de metodologías de concentración de ingrediente activo: evaporación y liofilización. La cuantificación de cada uno de los extractos concentrados se hizo por medio de la metodología Liebermann-Burchard. Los extractos concentrados de saponina fueron colocados en medios de cultivo para observar cuál de ellos presenta algún efecto en el crecimiento de los hongos en estudio. Los resultados obtenidos de la cuantificación muestran que el extracto liofilizado y evaporado presenta la mayor cantidad de saponina frente al control no concentrado. Las cantidades de saponinas en cada uno de los extractos fueron de 0.49 mg/ml en el liofilizado, 0.47 mg/ml en el evaporado y 0.07 mg/ml en el control. La evaluación del efecto de la saponina sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos fitopatógenos se realizó en tres ensayos diferentes, utilizando un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA). En cuanto a los resultados de crecimiento fúngico *in vitro* se encontró que la saponina proveniente de la quinua causó un efecto dependiente de la concentración en el crecimiento de los hongos bajo estudio. Es decir, en el caso de *Cercospora fijiensis*, la saponina a concentración de 100 ppm a 500000 ppm causa un menor crecimiento del hongo; mientras que a concentración de 1000000 ppm causa un aumento en el crecimiento. Con respecto a *Fusarium oxysporum*, la saponina a concentraciones de 100 ppm a 500 ppm reduce el crecimiento fúngico; en cambio, a concentraciones sobre los 1000 ppm lo aumenta.

Abstract

The goal of this research was evaluate the *in vitro* effect of saponin from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds on the growth of banana (*Musa x paradisiaca*) diseases in Ecuador. In this study are selected two fungal diseases: *Fusarium oxysporum* and *Cercospora fijiensis* (black Sigatoka). Both fungi were isolated on PDA medium from banana leaf explant with fungal lesions. Banana leaves were collected at the farm La Libertad located in Los Ríos, Ecuador. The saponin extraction from quinoa seeds was made by a microwave methodology using isopropanol (concentration of 20%) as solvent. Two methodologies were implemented to concentrate the saponin: evaporation and freeze-drying. The quantification of saponin extracts was spectrophotometrically, using Liebermann-Burchard methodology. Saponin concentrated extracts were placed in culture media to see which of them has some effect on fungal growth. The results of the saponin quantification shown that the freeze-dried and evaporation extract present the highest saponin content versus the non-concentrated control. The amount of saponin in the freeze-dried extract was 0.49 mg/ml, in the evaporation extract was 0.47 mg/ml and in the non-concentrated extract was 0.07 mg/ml. The results show that the effect of saponin on *in vitro* fungal growth depends of the concentration in the extracts applied in culture media. In the case of *Cercospora fijiensis* saponin concentration of 100 ppm to 50000 ppm causes less fungal growth; while in concentration of 1000000 ppm causes an increase in fungal growth. In case of *Fusarium oxysporum* saponin at concentrations of 100 ppm to 500 ppm reduced fungal growth; however, at concentrations above 1000 ppm increases the fungal growth.

Índice de Contenido

Agradecimientos	4
Resumen.....	5
Abstract	6
Índice de Contenido.....	7
Índice de Tablas	9
Índice de Figuras.....	10
Índice de Anexos.....	11
1 Introducción.....	12
1.1 Antecedentes	12
1.2 Justificación.....	15
2 Objetivos	19
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 Hipótesis.....	19
4 Marco teórico.....	20
4.1 Cultivo de quinua	20
4.2 Cultivo de banano.....	20
4.3 Enfermedades en el banano.....	24
4.3.1 Sigatoka negra.....	24
4.3.2 Mal de Panamá.....	28
4.4 Biopesticidas	31
4.5 Saponinas	33
4.5.1 Estructura de las saponinas	34
4.5.2 Agliconas esteroideas	35
4.5.3 Agliconas triterpénicas.....	35
4.5.4 Glicósidos	36
4.5.5 Usos de la saponina.....	36

5	Materiales y metodología	36
5.1	Obtención del material vegetal.....	36
5.2	Extracción de saponina por el método de microondas.....	37
5.3	Métodos de concentración de saponinas	38
5.4	Cuantificación de saponinas por espectrofotometría utilizando el reactivo Liebermann-Burchard	39
5.5	Cuantificación de proteína total de la muestra extraída	40
5.6	Aislamiento e identificación de hongos	41
5.7	Bioensayos con extractos de saponina	42
5.8	Diseño experimental.....	44
6	Resultados	45
6.1	Extracción y concentración de saponina	45
6.2	Cuantificación de saponinas.....	46
6.3	Cuantificación de la proteína total de la muestra	49
6.4	Aislamiento e identificación de hongos	49
6.5	Evaluación del efecto de la saponina en <i>Cercospora fijiensis</i>	51
6.6	Evaluación del efecto de la saponina en <i>Fusarium oxysporum</i>	57
7	Discusión.....	64
7.1	Análisis del contenido de saponinas del material vegetal de quinua utilizado en este estudio	64
7.2	Evaluación de la metodología de extracción de saponinas de la quinua.....	65
7.3	Evaluación del contenido de proteína en los extractos de saponina	66
7.4	Evaluación del efecto <i>in vitro</i> en el crecimiento de los fitopatógenos de banano	67
8	Conclusiones.....	71
9	Recomendaciones.....	72
10	Bibliografía	74
11	Anexos.....	79

Índice de Tablas

Tabla 1. Tratamientos utilizados en base de los extractos de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) para observar su efecto con <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Cercospora fijiensis</i>	43
Tabla 2. Tratamientos utilizados en base al extracto evaporado para observar su efecto en <i>Cercospora fijiensis</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	44
Tabla 3. Identificación mediante microscopía de hongos aislados de hojas de banano	50
Tabla 4. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #1 con <i>Cercospora fijiensis</i> : (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey	52
Tabla 5. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #2 con <i>Cercospora fijiensis</i> : (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey	54
Tabla 6. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #3 con <i>Cercospora fijiensis</i> : (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey	56
Tabla 7. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #1 con <i>Fusarium oxysporum</i> : (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey	59
Tabla 8. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #2 con <i>Fusarium oxysporum</i> : (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey	60
Tabla 9. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #3 con <i>Fusarium oxysporum</i> : (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey	62

Índice de Figuras

Figura 1. Proceso de molienda del grano de quinua en un molino eléctrico	38
Figura 2. Envase con la mezcla de quinua y solvente dentro del microondas	38
Figura 3. Curva de calibración para saponinas extraídas de la quinua	40
Figura 4. Crecimiento fúngico a partir de explantes de hoja de banano en medio PDA	42
Figura 5. Solución de saponina antes (A) y después del filtrado (B)	45
Figura 6. Solución de saponina no concentrada (A), concentrada por evaporación (B) y por liofilización (C).....	46
Figura 7. Comparación de la concentración de saponina en mg/ml presente en los extractos no concentrados de quinua amarga y dulce	47
Figura 8. Comparación de la concentración de saponina en mg/ml presente en los extractos de quinua amarga.....	48
Figura 9. Extractos de quinua amarga no concentrado (A), evaporado (B) y liofilizado (C).....	48
Figura 10. Efecto de los extractos puros de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Cercospora fijiensis</i>	52
Figura 11. Evaluación del efecto de los extractos puros de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) sobre el crecimiento de <i>Cercospora fijiensis</i>	52
Figura 12. Evaluación del efecto de soluciones en base al extracto de saponina evaporado (CE) sobre el crecimiento de <i>Cercospora fijiensis</i> (T1=0 ppm, T2=100 ppm, T3=500 ppm, T4=1000 ppm, T5=5000 ppm, T6=10000 ppm, T7=50000 ppm, T8=100000 ppm, T9=500000 ppm, T10=1000000 ppm)	54
Figura 13. Evaluación del efecto de soluciones en base al extracto de saponina evaporado (CE) sobre el crecimiento de <i>Cercospora fijiensis</i> (A=0 ppm, B siganex=33000 ppm, C=7500 ppm, D=10000 ppm, E=15000 ppm, F=20000 ppm, G=300000 ppm, H=40000 ppm, I=1000000 ppm)	56
Figura 14. Efecto de los extractos puros de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium oxysporum</i>	58
Figura 15. Evaluación del efecto de los extractos puros de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	58
Figura 16. Evaluación del efecto de soluciones en base al extracto de saponina evaporado (CE) sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> (T1=0 ppm, T2=100 ppm, T3=500 ppm, T4=1000 ppm, T5=5000 ppm, T6=10000 ppm, T7=50000 ppm, T8=100000 ppm, T9=500000 ppm, T10=1000000 ppm)	60
Figura 17. Evaluación del efecto de soluciones en base al extracto de saponina evaporado (CE) sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> (A=0 ppm, B sportak=3000 ppm, C=3000 ppm, D=5000 ppm, E=10000 ppm, F=15000 ppm, G=20000 ppm, H=300000 ppm, I=40000 ppm, J=1000000 ppm)	62

Índice de Anexos

Anexo 1. Requerimientos agroecológicos de la planta de banano.....	79
Anexo 2. Diferentes variedades de banano, características y genotipo	79
Anexo 3. Espermogonio (izq.) y pseudotecio (der.) de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	80
Anexo 4. Conidias de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	81
Anexo 5. Ciclo de vida de la sigatoka negra.....	81
Anexo 6. Diferentes tipos de esporas en <i>Fusarium oxysporum</i>	82
Anexo 7. Ciclo biológico de <i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>cubense</i>	82
Anexo 8. Estructura molecular del esqueleto base de las saponinas	83
Anexo 9. Mediciones de la absorbancia y concentración de saponina en cada extracto de quinua amarga: no concentrado (A), evaporado (B), liofilizado (C) y en extracto de quinua dulce: no concentrado (D)	83
Anexo 10. Hongos aislados a partir de hojas de banano.....	85
Anexo 11. Datos obtenidos del diámetro (cm) del hongo <i>Cercospora fijiensis</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> en los diferentes ensayos	86
Anexo 12. Cálculo de los componente del ANOVA y prueba de Tukey con los datos obtenidos del diámetro en los ensayos con <i>Cercospora fijiensis</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	89
Anexo 13. Gráficos de la cinética de crecimiento en <i>Cercospora fijiensis</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	93
Anexo 14. Efecto de las diferentes soluciones de saponina en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Cercospora fijiensis</i> (A) y <i>Fusarium oxysporum</i> (B) en los diferentes ensayos	95

1 Introducción

1.1 Antecedentes

La producción de alimentos es una actividad realizada por el ser humano, ya que desde la época primitiva ha sabido aprovecharse de la naturaleza para su sustento, seleccionando los productos de acuerdo con sus gustos y necesidades. Estas han ido perfeccionándose al reconocer la existencia de una dependencia entre los alimentos y el hombre, lo cual significó el inicio de la agricultura. Conforme la población mundial aumenta, las prácticas de manejo de los diferentes cultivos cambian y se hace muy necesario el uso de compuestos químicos para controlar los agentes patógenos que afectan básicamente la producción de cualquier tipo de cultivo y de esa manera poder asegurar en lo posible la mejor calidad de producto. Los compuestos químicos comúnmente son llamados agroquímicos y su uso se ha incrementado desde los comienzos de la revolución verde donde se volvieron muy populares gracias a las ventajas que estos brindan al agricultor. Entre las ventajas, la de mayor importancia es que la utilización de agroquímicos permite disminuir las pérdidas causadas por plagas y enfermedades, lo que se traduce en una mayor cantidad de alimento disponible para satisfacer la demanda de la creciente población mundial (Farrera, 2004). La otra cara de la moneda es el uso indiscriminado de agroquímicos en la agricultura, lo que ha provocado la disminución de la biodiversidad, además del grave impacto negativo en la salud humana, así como también la contaminación del agua, suelo y aire. Desde su invención se ha utilizado una cantidad enorme de agroquímicos a nivel mundial, muchas veces haciéndolo de manera indiscriminada debido al desconocimiento o simplemente a la despreocupación por los efectos negativos que estos producen. La contaminación producida por la acumulación de agroquímicos causa una preocupación de la población de tal manera que lo que actualmente se busca es redirigir el manejo clásico de los cultivos y alimentos hacia un

manejo más limpio y amigable con el ambiente, así como también con la salud de las personas (Avalos, 2009).

La preocupación existente por los perjuicios causados debido a la aplicación inadecuada de agroquímicos lleva al surgimiento de una corriente que propone la disminución del uso de los mismos, así como también la búsqueda de ciertas alternativas cuya aplicación tenga un efecto parecido sobre los patógenos, pero que su toxicidad sea bastante baja. A raíz de esta corriente que cada vez toma mayor fuerza se ha investigado y fabricado los así llamados pesticidas o fungicidas biológicos. Estos nuevos productos son definidos como cualquier entidad biológica, viva o de origen natural, que controle o regule todo aquello considerado como agente patógeno. Entendiéndose como patógeno: plagas (insectos), enfermedades (fúngicas o bacterianas) y virus (Rivera, 2011). Dentro de los principales fungicidas biológicos o naturales, se encuentra el aceite de neem. Este producto es elaborado a partir de la extracción de aceite procedente de la planta de neem (*Azadirachta indica*). La principal propiedad que posee el producto es su capacidad para controlar eficientemente, tanto hongos patógenos como plagas de insectos. Este producto ha adquirido mucha aceptación y popularidad entre los agricultores a nivel mundial, por la capacidad de control que posee. La importancia que ha cobrado este tipo de pesticidas y fungicidas, además de su capacidad de controlar patógenos, también se encuentra relacionada con su muy baja toxicidad tanto hacia el ambiente como hacia la salud del ser humano. Esta alternativa de cambio conduce hacia un futuro mucho menos contaminado y peligroso para la salud de las personas, ya que conforme pasa el tiempo los bio-pesticidas serán más eficientes y sustituirán a los agroquímicos (Fernández G. , 2002).

El sector bananero es muy importante a nivel mundial al igual que en el Ecuador. El banano es la fruta más cultivada a nivel mundial y el cuarto cultivo más grande luego del trigo, arroz y el

maíz. Además es parte fundamental de la economía de pequeños países cuyos ingresos están basados en la agricultura y explotación de recursos naturales. Entre estos países se encuentra: Costa Rica, Ecuador, Filipinas, Colombia, Guatemala, Honduras y Panamá. Anualmente, en el mundo se produce un promedio de 78,8 millones de toneladas de banano de las cuales 16,3 millones de toneladas se exportan y el restante se dedica al autoconsumo. Los principales países vendedores de la fruta a nivel mundial son: Ecuador, Filipinas, Costa Rica, Colombia y Guatemala. Por otra parte se conoce que los principales importadores son: Estados Unidos, Alemania, Bélgica y Japón. Adicionalmente, a nivel mundial se consume un promedio de 9,51 kg/persona/año (INEC, 2009).

Actualmente los agroquímicos si bien han perdido terreno, todavía son muy utilizados regularmente por los agricultores especialmente en el Ecuador. En el caso específico del cultivo de banano los agroquímicos son muy importantes debido a que el control que estos brindan supera por mucho al que se obtiene con productos de origen natural. Esto es consecuencia de que en este cultivo las enfermedades que afectan tanto al cultivo en campo como a la postcosecha son muy agresivas y su daño se traduce inmediatamente en un perjuicio económico para el agricultor. En primer lugar, la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) es la principal enfermedad que afecta al cultivo de banano, causando un grave daño al tejido foliar. El hongo destruye totalmente las hojas de la planta lo cual afecta la fotosíntesis y por consecuencia la producción del cultivo disminuye. En ausencia de medidas de combate la enfermedad puede reducir hasta en un 50 % el peso del racimo y causar pérdidas del 100 % de la producción debido al deterioro en la calidad, longitud y grosor del fruto. Entre otros perjuicios está el retraso de la floración y cosecha así como también puede afectar al llenado del racimo (Hidalgo, 2006). Por otra parte, las enfermedades que afectan principalmente al fruto del banano en los procesos postcosecha

también poseen mucha importancia desde el punto de vista económico. Esto se debe a que principalmente estos patógenos que atacan en esta etapa específica, tienen como objetivo dañar la calidad del fruto y por consiguiente la producción se ve afectada, al igual que el precio al cual se puede vender un producto afectado. Esta enfermedad, es considerada compleja, debido a que son varios los patógenos que la causan. Entre estos se encuentran: *Fusarium oxysporum* var. *cubense*, *Verticillium theobromae* y *Colletotrichum musae*. Los daños causados básicamente son pudriciones en la parte de la corona del fruto lo cual resta calidad en especial para la fruta de exportación (Aguilar, 2013).

1.2 Justificación

El Ecuador es el primer exportador y el segundo productor de banano a nivel mundial. Desde la década de los cincuenta, la actividad bananera se ha convertido en una importante fuente generadora de divisas. Dicha actividad tiene un peso muy importante para la economía ecuatoriana; la tasa de participación dentro del PIB agrícola es de 26%. Dentro del PIB total, las exportaciones de banano representaron aproximadamente el 4%, alcanzando \$1017 millones. Además, el sector bananero genera relaciones con otras ramas de la industria. Así, un conjunto de actividades como el transporte naviero y terrestre, las industrias de papel, cartón, plásticos, agroquímicos y otras; se benefician de las exportaciones de banano. En términos de empleo, todo el proceso de producción, comercialización y exportación, constituye una importante fuente de puestos de trabajo: se estima que, en forma directa e indirecta, cerca del 12% de la población del país se beneficia de la actividad bananera (INEC, 2009).

Tomando en cuenta la importancia del cultivo en el Ecuador, es necesario encontrar alternativas biológicas para controlar enfermedades en el cultivo, como la sigatoka y el mal de Panamá. Al desarrollar y aplicar nuevos productos se puede conseguir que los costos de producción

relacionados con el componente de agroquímicos disminuyan, y de esa manera, lograr un mayor ingreso al productor lo cual aumenta la rentabilidad del cultivo. Dada la situación actual del Ecuador, es importante brindar productos que sustituyan y logren una reducción en la compra de agroquímicos, porque cada vez se están incrementando las importaciones. En el año 2012 las importaciones crecieron un 6% en comparación con el 2011, lo cual representa \$ 70 millones. El beneficio de esta reducción se verá demostrado en el ahorro que el Estado puede tener y hacer uso de este dinero en proyectos de apoyo a sectores necesitados dentro del sector agrícola. Aparte del beneficio mencionado, también la disminución en la importación y uso de agroquímicos brinda la posibilidad de reducir el impacto ambiental que estos producen y, guiar la producción de alimentos de manera tradicional hacia una enfocada en la salud del consumidor y cuidado del ambiente (FAO, 2012).

Para brindar una alternativa biológica que controle las enfermedades mencionadas en el cultivo de banano se propone utilizar un extracto rico en saponinas proveniente del grano de quinua (*Chenopodium quinoa*). Las saponinas son glucósidos triterpénicos capaces de una acción anti fúngica. Esta propiedad ha permitido estudiarlas de manera intensa, con el fin de encontrar nuevas alternativas en el control de diferentes enfermedades en diversos cultivos. En los estudios realizados, se ha encontrado que estos compuestos pueden presentar una capacidad de controlar y disminuir el crecimiento de hongos patógenos. Un ejemplo es un estudio realizado con el fin de determinar la capacidad de controlar al hongo *Erysiphe cichoracearum* causante del oídio en las cucurbitáceas. Los resultados de este estudio, son favorables, debido a que se determinó que estos compuestos naturales pueden detener el desarrollo de la enfermedad tratada (Apablaza, 2002). Otros estudios también brindan motivos para tener en cuenta a este compuesto como una alternativa para el control de enfermedades, debido a que se han utilizado moléculas muy

parecidas a esta en banano y fresa para tratar la antracnosis (*Collectotrichum musea*) y cenicilla (*Botrytis cinérea*) respectivamente. Los resultados obtenidos permiten ser optimistas con la capacidad de control de las enfermedades porque los extractos etanólicos utilizados detuvieron el crecimiento y desarrollo de los microorganismos en un porcentaje mayor al 50%. Observando estos ejemplos, se explica la importancia de realizar el estudio con un compuesto como la saponina para desarrollar un sustituto de los agroquímicos utilizados actualmente (López, 2006).

El uso actual de agroquímicos tiene un efecto muy perjudicial sobre el medio ambiente. Dentro de los problemas, se encuentra la contaminación de suelos y fuentes de agua, lo cual perjudica directamente a la fauna que depende de estos recursos. El envenenamiento de sistemas hídricos es un problema que no afecta solamente a la vida acuática sino también a personas que dependen de ellos; puesto que actividades como la pesca comercial se ve afectada, además de que dichas aguas son peligrosas para el consumo humano. Otros aspectos a considerar acerca de los agroquímicos utilizados son las consecuencias que tienen sobre la salud de las personas. Estos productos no solo contaminan el ambiente sino que también causan problemas, en especial a los trabajadores y poblaciones cercanas a una plantación. Muchas veces estos problemas no afectan de inmediato a las personas, sino que su efecto, es a largo plazo debido a la acumulación de químicos en el organismo durante un periodo prolongado de tiempo, lo cual puede causar otras enfermedades como el cáncer o incluso la muerte de la persona. Además, existe la posibilidad de que ciertos químicos acumulados en el organismo causen problemas genéticos o mutaciones en la descendencia de las personas que se encuentran en contacto continuo con los agroquímicos (Rossi, 2013).

Los beneficios de la utilización de los desechos del lavado de quinua pueden ser analizados desde un punto de vista económico para la industria procesadora de quinua. Durante el proceso de lavado de la quinua, el agua residual es desechada y no se obtiene ningún provecho de este recurso. Al generar la posibilidad para la utilización de este recurso, las procesadoras de quinua podrán contar con un ingreso adicional, ya que esta agua residual podrá ser comercializada para su transformación en biofungicidas. Normalmente, en nuestro país la industria de procesamiento de quinua está conformada por asociaciones de agricultores, por lo tanto, tendría un significativo aumento en sus ingresos al reutilizar el residuo del procesamiento que actualmente es desechado. Así, la agroindustria tendría recursos para su crecimiento y tecnificación. Al no desechar estos residuos también se estaría previniendo la contaminación del medio ambiente, ya que en la actualidad estos productos son arrojados directamente a los ríos o fuentes de agua. Además de lo económico, existe un impacto social que es necesario mencionar. Todo esto conlleva a que se necesite más fuerza laboral y de ese modo se generarán plazas de trabajo. Finalmente, todo conduce hacia un crecimiento económico y social de las comunidades y cooperativas que se encuentran dentro de la agroindustria procesadora de quinua (Meyhuay, 2010).

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto *in vitro* de las diferentes dosis de saponina extraída de la quinua (*Chenopodium quinoa*) sobre el crecimiento de sigatoka negra (*Cercospora fijiensis*) y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de banano.

2.2 Objetivos específicos

- Extraer la saponina del grano molido de quinua (*Chenopodium quinoa*) por el método de microondas.
- Concentrar la saponina extraída de la quinua por evaporación y liofilización.
- Cuantificar la cantidad de saponina extraída de la quinua mediante espectrofotometría, utilizando el reactivo Liebermann-Burchard.
- Cuantificar la cantidad de proteína total presente en el extracto de saponina por espectrofotometría.
- Aislar e identificar el hongo *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* por microscopía.
- Evaluar el efecto *in vitro* del extracto de saponina sobre el crecimiento de sigatoka negra (*Cercospora fijiensis*) y *Fusarium oxysporum*

3 Hipótesis

El extracto de saponina producirá un efecto en el crecimiento *in vitro* (positivo o negativo) en los hongos fitopatógenos del banano, Sigatoka Negra (*Cercospora fijiensis*) y *Fusarium oxysporum*.

4 Marco teórico

4.1 Cultivo de quinua

La quinua es una planta herbácea anual de hábito erguido, cuya parte aérea puede crecer de 20 cm a 3 metros de altura. La raíz es pivotante y ramificada, con una profusión de raíces secundarias y terciarias que le permiten explorar el terreno por nutrientes y agua hasta una profundidad de 180 cm. El tallo de la quinua es cilíndrico (1 a 8 cm de diámetro) en la base de la planta y se torna anguloso a partir de las ramificaciones. La inflorescencia de la quinua está constituida por una panoja típica de 30 a 80 cm de longitud y 5 a 30 cm de diámetro, con un eje central, ejes secundarios y terciarios. El fruto, que es donde se encuentra acumulada la saponina, es un aquenio seco e indehiscente con una forma cilíndrica o lenticular de 1.5 a 4 mm de diámetro (Monteros, 2005).

4.2 Cultivo de banano

El banano pertenece a la familia musaceae, dentro de la que existen dos subtipos: acuminata y balbisiana. De ahí surgen diploides, triploides y tetraploides: AA, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB; los cuales conforman diferentes variedades dentro de esta familia. Las variedades más importantes desde el punto de vista económico tienen una naturaleza híbrida (musa x paradisiaca) para todas las variedades de banano (Augstburger, 2001). Aunque la planta de banano tiene el aspecto de árbol por su tamaño y apariencia, es en realidad una planta herbácea perenne gigante, que alcanza de 3.5 a 7.5 metros de altura y cuyo pseudo-tallo consiste en un cilindro formado por los pecíolos de las hojas, las cuales están dispuestas en forma de espiral, de diverso tamaño, de base obtusa, redondeada; su ápice es agudo, truncado o con muescas y márgenes enteros, pero fácilmente rasgables, su color es verde, de 1.5 a 3.0 m de largo, más largas que anchas; los pecíolos de las bases envainantes son semi-cilíndricos. El tallo

verdadero es un rizoma grande, almidonoso y subterráneo, que está coronado con yemas, casi todas las cuales se desarrollan hasta que todo el rizoma haya florecido y fructificado. La inflorescencia que tiene forma de racimo, es larga y pedunculada; al principio se sostiene erecta u oblicuamente, pero se dobla hacia abajo a medida que crece. Está cubierta con brácteas grandes de color rojo oscuro, las cuales se encuentran dispuestas en forma de espiral, la yema forma una terminal cónica grande en el tallo de la flor. Las primeras manos de la inflorescencia que florecen, constan enteramente de flores femeninas, seguidas por racimos de flores perfectas, y finalmente racimos de flores masculinas, el número relativo de cada tipo dependen de la variedad. Durante el curso de su desarrollo los frutos se doblan hacia atrás geotrópicamente. A su madurez un racimo puede contener de 5 a 10 manos, cada una con 2 a 20 frutos color amarillo verdoso, amarillo, amarillo-rojizo o rojo, según la variedad. Los frutos de la planta de banano no tienen semillas; sin embargo, los gérmenes de las semillas se ven todavía como hilos negros dentro de la fruta. Por regla general la inflorescencia aparece a los 7 - 9 meses después de la plantación, según las condiciones climáticas y de los suelos. Dependiendo de las circunstancias climáticas, el período de desarrollo de la fruta es de 3 a 4 meses (en promedio 12 semanas). Una vez que las frutas alcanzan su madurez, muere la planta madre (Fagiani, 2012).

Como cultivo de trópico húmedo, el banano tiene altas exigencias en cuanto a temperaturas, composición de suelo y precipitaciones. Es necesario tomar en cuenta los requerimientos agroclimáticos para un buen establecimiento y producción de las plantas de banano. En el Anexo 1 se encuentran las condiciones óptimas para esta planta. Además de estos factores mencionados, la variedad utilizada es un factor muy importante, ya que de esta depende el manejo que se le da a la plantación. Cada una de las variedades tiene cualidades y características específicas. Entre ellas está la tolerancia o susceptibilidad a enfermedades y morfología de la planta. Hoy en día en

el cultivo comercial tienen mayor importancia las variedades del grupo Cavendish, por el hecho de que los plátanos Gros Michel, fueron fuertemente reducidos por el mal de Panamá, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* (Gonzabay, 2013). Además de las variedades comerciales muy divulgadas, en las regiones tropicales existe un gran número de variedades locales muy diferentes, que se emplean en diversas formas que se pueden combinar entre ellas. Las diferentes variedades se muestran en el Anexo 2, donde también se observa las características más relevantes de cada una de ellas y el genotipo que poseen.

La reproducción de todas las variedades antes mencionadas de banano se efectúa por vía vegetativa. Esto quiere decir que esta especie de planta produce frutos que no tienen semilla viable para su reproducción. El material vegetal para el establecimiento del cultivo puede clasificarse en tres tipos: material de plantas maduras, inmaduras y aquel de hijos de espada. El banano puede ser multiplicado partiendo de diferentes partes de la planta. Entre ellas se encuentran las que utilizan el rizoma entero o parte de él, también se extrae los hijuelos de la planta madre, los cuales son trasplantados al sitio de establecimiento del cultivo. Sin embargo, entre estas dos formas hay que mencionar que la utilización de rizomas enteros es muy laboriosa, además este método requiere mucho material de arranque y causa fuertes gastos de transporte (Guerrero, 2010). Por lo que es más adecuado realizar la multiplicación a partir de hijuelos tomados de la planta madre. Es muy importante que los brotes que serán utilizados provengan de plantaciones libres de nemátodos, virus y patógenos en general. Finalmente, existe la propagación de banano por cultivo de meristemas, el cual constituye el método más seguro para producir plantas de alta calidad y libres de enfermedades. Esto se da debido a que esta técnica está basada en los protocolos de cultivo in-vitro, lo cual se refiere a una propagación de manera

aséptica, rápida y con tasas de propagación muy superiores a las otras dos formas (Gonzabay, 2013).

Con respecto a la siembra del material vegetal se debe tener en cuenta que la densidad de plantas depende del sistema de cultivo, variedad que se utilice y de las características del suelo. Una variedad de lento crecimiento permite tener mayor densidad de plantas que una con un crecimiento rápido. En cuanto a tamaño y profundidad del hoyo para la planta, se recomienda siempre cubrir el rizoma plantado con una capa de materia orgánica. Una vez establecido el cultivo de banano, se requiere realizar varias labores para mantenerlo y de ese modo asegurar una buena producción. Entre las prácticas más importantes e indispensables se encuentran: la fertilización, deshoje, enfundado del racimo, deschive o desmane y el deshijado. Existen otras actividades como: eliminación de malezas, colocación de daipas (protectores dentro del racimo) y apuntalado que se deben realizar en este cultivo, pero su realización no es indispensable, lo que significa que en ausencia de estas labores no existe un perjuicio considerable o importante a la producción del banano (Augstburger, 2001).

Es importante considerar los problemas fitosanitarios más importantes por su efecto perjudicial en la producción del cultivo de banano. Dentro de las plagas más importantes se presentan: nemátodos de raíz (*Radopholus similis*), picudo negro (*Cosmopolites sordidus*), larvas defoliadoras como la vaquita (*Caligo teucer*) y trips (*Palleucothrips musae*) (Gonzabay, 2013). De estas plagas, tanto los nemátodos como el picudo negro son los problemas más serios. Para su control se hace uso de productos químicos fumigantes que poseen un doble propósito. Esto quiere decir que un mismo producto aplicado tiene efecto nematicida e insecticida. De esta manera las aplicaciones de productos químicos son más eficientes y generan un menor costo al agricultor. Por otra parte, existen ciertas enfermedades que atacan este cultivo. Entre las más

importantes y que deben destacarse están: el mal de Panamá (*Fusarium oxisporium* var. *cubense*), sigatoka amarilla y negra (*Mycosphaerella musicola*, *Mycosphaerella fijiensis*) enfermedades bacterianas (*Pytium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Erwinia carotovora*) y enfermedades virales (enfermedad del mosaico). El problema más severo en este cultivo es causado por la sigatoka negra, esta causa mucho daño a las plantaciones debido a su agresividad. Su control únicamente puede lograrse por medio de fumigaciones utilizando productos químicos bastante tóxicos. Dentro de los costos de mantenimiento de la plantación, el control de sigatoka representa el mayor porcentaje debido al costo elevado de los productos y su aplicación aérea. Esta enfermedad en especial tiene incidencia directa a la producción del banano, ya que una planta infectada no puede producir un racimo adecuado (Guerrero, 2010). Las otras enfermedades son importantes pero pueden ser controladas con mayor facilidad. Tanto el mal de Panamá como las enfermedades bacterianas pueden evitarse con la utilización de variedades resistentes, logrando así una reducción de los costos y menor daño ambiental por el uso de productos químicos. Finalmente, la virosis, como en cualquier otro cultivo no puede ser controlada. Para evitar el daño por virus se debe contar con material vegetal inicial limpio, así como también mantener un buen control de los vectores que pueden contagiar el cultivo (Fagiani, 2012).

4.3 Enfermedades en el banano

4.3.1 Sigatoka negra

La sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* o *Cercospora fijiensis*) es la enfermedad más importante que afecta la producción comercial de bananos (*Musa spp.*) en la mayoría de las regiones productoras del mundo. La enfermedad es originaria del sudeste asiático y en el continente americano se identificó por primera vez en Honduras en el año de 1972, de donde se diseminó a todos los países bananeros de América Central, América del Sur, América del Norte

y algunas islas del Caribe (Vicente, 2009). La sigatoka negra ha ocasionado graves pérdidas en la producción comercial de bananos, esta afecta el área foliar fotosintética de la planta y, en consecuencia, los racimos y los frutos tienen un menor peso en comparación con plantas sanas. Adicionalmente, infecciones severas de la sigatoka negra causan la madurez prematura del fruto. La severidad de la enfermedad ha modificado el manejo de las plantaciones, principalmente los programas de control químico. Esto ha traído como consecuencia un incremento en los costos de producción del cultivo. En la actualidad, el combate de la sigatoka negra en banano depende principalmente de la aplicación continua de fungicidas con las consecuencias fuertemente indicadas, como es el caso de pérdida de sensibilidad a diversos grupos químicos por parte del cultivo, contaminación ambiental y residuos en frutos (Martínez I. , 2011).

La sintomatología de esta enfermedad es la siguiente: presenta puntos de color café rojizos de 0.25 mm de diámetro que aparecen en el envés de la hoja; posteriormente se presentan unas estrías de color café rojizo de 20 mm de largo por 2 mm de ancho paralelas a la venación lateral de la hoja y visibles todavía en el envés. Luego se tornan de café oscuro a casi negro, un poco más alargadas, visibles ya en el haz de la hoja. La mancha sigue avanzando en su desarrollo y evolución y se hace más grande y ancha de forma elíptica y se rodea de un borde café oscuro visible cuando la hoja está mojada; luego de este estado la mancha se seca en el centro, se torna gris y se deprime, la lesión se rodea de un borde angosto negro bien definido, al unirse todas las lesiones la hoja se torna negra y muere en 3 o 4 semanas después de que aparecen los primeros síntomas (Hidalgo, 2006). Los daños que producen son: el área foliar se reduce en proporción a la severidad del ataque; la “quemazón” afecta el proceso fotosintético; se altera el proceso normal de maduración de la fruta, la misma que se torna muy prematura y en casos extremos se vuelve amarilla antes de la cosecha; las plantaciones afectadas por sigatoka negra producen

racimos pequeños, dedos cortos y deformes, pulpa crema y con sabor ligeramente ácido (Álvarez, 2013).

Este hongo patógeno puede reproducirse en forma asexual y sexual. La reproducción asexual se presenta en lesiones jóvenes de la enfermedad. La fase sexual, de mayor importancia en el desarrollo de la enfermedad, se produce en las lesiones maduras, en estructuras denominadas pseudotecios, en cuyo interior se encuentran las ascosporas, que pueden ser dispersadas largas distancias por las corrientes de aire (Martínez I. , 2011).

Mycosphaerella fijiensis es el nombre que fue dado a la forma sexual del patógeno. Para producir la forma sexual el hongo inicialmente desarrolla muchos espermogonios en la superficie inferior de la hoja al colapsar las lesiones. El espermogonio es oscuro, un poco errumpente y de forma piriforme. En condiciones húmedas estas estructuras pueden producir grandes cantidades de células de reproducción masculina o espermatias. Las espermatias son diminutas y cilíndricas y van a fertilizar las hifas hembras vecinas llamadas tricóginas. Al efectuarse la fertilización, los pseudotecios se forman dentro de las lesiones maduras con los ostiolos emergiendo de los tejidos. Las estructuras descritas anteriormente se muestran gráficamente en el Anexo 3. Las ascas, estructuras oblongas o en forma de mazo tienen dos paredes y contienen ocho esporas sexuales o ascosporas, que están alineadas de dos en dos. Las pseudoparafisas o elementos estériles están ausentes del pseudotecio. Las ascosporas son hialinas y poseen una septa. Una célula de la espora puede ser un poco más ancha que la otra célula, y la espora puede ser un poco estrecha en la septa (Orozco, 2008).

La forma asexual se llama *Pseudocercospora fijiensis*. Las conidias se originan individualmente y apicalmente en el conidióforo. Las esporas, mostradas en el Anexo 4. son de color pálido a un

ligero color olivo, estas son lisas, largas y tienen tres o más septas. Las conidias germinan durante períodos de alta humedad relativa (92 – 100% humedad relativa) e infectan a la hoja a través de los estomas, usualmente en la superficie inferior. Bajo condiciones de alta humedad, las hifas pueden emerger por los estomas y crecer a lo largo de la superficie de la hoja hasta penetrar por otros estomas, así agrandando las lesiones (Orozco, 2008).

La sigatoka negra es considerada una enfermedad policíclica por la característica que tiene el hongo de reproducirse repetitivamente durante el curso de la epidemia, es decir, por presentar una secuencia sin fin de infección, colonización, esporulación y dispersión y, además, porque en él existe una infección ramificada dado que produce dos tipos de esporas diferentes aunque ellas no ocurran, necesariamente, en forma alterna o equitativa. Como se ilustra en el Anexo 5, el ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* se inicia con la deposición de las esporas, ya sean ascosporas o conidios, sobre las hojas libres de la enfermedad o sobre las ya afectadas. Los procesos de germinación y penetración del inóculo solo ocurren cuando hay condiciones favorables con humedad relativa de 90 a 100%, temperaturas de 26 a 28°C y, sobre todo, presencia de agua libre sobre las hojas. Bajo tales condiciones, las esporas germinan en un período de 2 a 6 horas, formando tubos germinativos que se extienden y ramifican en busca de los estomas. De este modo, se inicia el proceso de penetración que tarda de 2 a 3 días si las condiciones de humedad relativa, temperatura y humedad foliar son las adecuadas (Bornacelly, 2009).

El control de esta enfermedad tan importante en este cultivo, consiste en interrumpir el ciclo descrito de la enfermedad y reducir la producción de las esporas. Dentro de las alternativas de control, el combate químico es la principal herramienta para el manejo de la sigatoka negra. Se realiza mediante la aplicación alternada de fungicidas protectores y sistémicos. Los fungicidas protectores son de acción multisitio. Los sistémicos son de acción sitio-específico. Normalmente,

los productos protectantes son aplicados en mezcla con agua con el fin de evitar que las esporas provenientes de otras plantas germinen cuando hagan contacto con una hoja sana. A diferencia de estos, los productos sistémicos son aplicados con el objetivo de curar la enfermedad en la planta. Son aplicados en mezcla con aceite, por lo que resultan en un mayor costo y también causan mayor estrés a la planta (Martínez I. , 2011).

4.3.2 Mal de Panamá

Esta enfermedad, que se encuentra presente en la mayoría de los países productores de banano, se detectó por primera vez a finales de los años 20 en las islas Canarias, concretamente en la zona del Valle de la Orotava. Actualmente la podemos encontrar en cualquier zona productora de las islas y aunque presenta una incidencia variable, los porcentajes más frecuentes se sitúan entre un 2 y un 12 % de plantas afectadas, aunque en casos puntuales existen incidencias más altas y pérdidas de cosecha que superan ampliamente el 30% (Sotomayor, 2012).

El microorganismo responsable del desarrollo de esta enfermedad es el hongo del suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, que posee la propiedad de vivir durante largos períodos de tiempo, aún en ausencia de plantas de banano, gracias a su capacidad de subsistir sobre los restos vegetales de esta especie y producir estructuras de resistencia mediante las cuales puede permanecer en estado de latencia. Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento (Martínez L. , 2013). La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo miceliar caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias; y una de tipo micelio plano y húmedo con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias (Sotomayor, 2012). El hongo produce tres clases de esporas: microconidias, macroconidias y

clamidosporas. Las cuales pueden verse en el Anexo 6. Las microconidias presentan 1 o 2 células de forma ovalada o de riñón, mientras que las macroconidias presentan de 4 a 8 células en forma de hoz, junto con células basales en forma de pie. Las clamidosporas son de forma globosa, conformadas en forma individual o en pares, en hifas o conidias, pudiendo ser terminales o intercaladas. Este hongo patógeno se divide en cuatro razas acorde a su patogenicidad sobre los cultivares de banano. Las más importantes son la 1 y 4. La raza 1 afecta a cultivares Gros Michel. La raza 4 afecta a cultivares del grupo Cavendish, esta se encuentra dividida en tropical (RT4) y subtropical (SR4). Se subdivide a esta raza del hongo en función a la zona donde afecta, ya sea zonas tropicales o subtropicales (Garcés, 2001).

La sintomatología de esta enfermedad se debe separar en síntomas externos y síntomas internos, en función de la expresión de los mismos en la planta. Los síntomas externos son: clorosis y marchitez de las hojas, desde las más viejas hacia las más jóvenes. Decoloraciones de los pecíolos, que en estados avanzados provocan la caída de las hojas y su muerte. Entrenudos más cortos, reducción de la lámina foliar y malformaciones en hojas jóvenes. Las plantas enfermas producen racimos pequeños y frutos “habichuelados” y sin valor comercial debido a la falta de llenado de fruto al carecer de una superficie foliar adecuada y una obstrucción del sistema vascular. Los síntomas internos son: formación de manchas o rayas marrones en los haces vasculares situados en la cara interior de las láminas foliares del pseudotallo. En el rizoma, la decoloración vascular adquiere una tonalidad rojiza a marrón oscuro, que es más pronunciada en la zona de densa vascularización (Martínez L. , 2013).

La enfermedad se inicia con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidosporas en dormancia presentes en tejidos muertos del hospedante, estimulados por los exudados secretados por las raíces de las plantas aledañas (Garcés, 2001). Se puede observar el

ciclo de vida de esta enfermedad en el Anexo 7. El hongo entra en la planta solo por la raíz, de manera directa o a través de heridas y cortes. Se inicia cuando las raicillas son infectadas por el hongo que luego invade una raíz principal y asciende al pseudotallo a través del sistema vascular. Una vez establecida en el rizoma, la enfermedad se desarrolla rápidamente y se propaga a través de los haces vasculares tiñéndolos de color marrón, rojo oscuro o púrpura, además dificulta el movimiento de agua y de los nutrientes. El patógeno coloniza el resto de la planta por crecimiento del micelio o por medio de transporte pasivo de microconidias. Este último contribuye a una colonización no uniforme, lo que puede hacer que el material de propagación aparentemente sano resulte afectado. Inmediatamente después, aparecen los síntomas en las hojas, las mismas que comienzan a marchitarse desde la base de los pecíolos (Rodríguez, 2012). Todas las hojas nuevas tienen un color amarillento moteado y presentan deformaciones y arrugas en sus láminas. Luego el pseudotallo comienza a rasgarse y las vainas se separan. El tiempo que transcurre entre la infección de la raicilla y la última fase es de más o menos, dos meses. La difusión de esta enfermedad se produce de una planta a otra por medio de las maquinarias y herramientas utilizadas (Martínez L. , 2013).

El control químico directo del hongo es poco eficiente, por lo que se debe actuar realizando ciertas prácticas culturales, entre las que se puede destacar (Rodríguez, 2012):

- Uso de material de plantación libre de enfermedad (plantas de cultivo “in vitro”)
- Plantar en suelos que no alberguen la enfermedad.
- Provocar una subida brusca del pH que dificulte el desarrollo del hongo, además de neutralizar a los ácidos sobrantes.
- Desinfectar los útiles de labranza, especialmente las barretas y los cuchillos de deshijado.

4.4 Biopesticidas

En la actualidad, los productores agrícolas prefieren utilizar agroquímicos para el control de plagas y para el mejoramiento de las plantaciones, debido a que el mercado ofrece gran variedad de los mismos a todo tipo de precios, y principalmente porque el uso de estos insumos químicos aumenta la productividad y rentabilidad de los cultivos. Sin embargo, cada vez más se cuestiona el uso de pesticidas químicos para el control de plagas y enfermedades de las plantaciones debido a su efecto negativo sobre los seres humanos y el medio ambiente (Jacome, 2011). Existen diferentes alternativas a los métodos químicos, como por ejemplo el uso de biopesticidas, agricultura orgánica, plantas resistentes a determinados patógenos, plantas en simbiosis con micorrizas y rotación de cultivos. Dichas alternativas no son excluyentes, por el contrario, una combinación de ellas de manera correcta podría llevar a un control económicamente aceptable para la mayoría de los cultivos. Esta combinación es llamada “Manejo Integrado de Plagas” (Fernández C. , 2002).

El Manejo Integrado de Plagas, promueve la práctica de técnicas alternativas para el control de plagas y enfermedades, también fomenta el uso de plaguicidas de baja toxicidad cuando el uso de plaguicidas químicos es necesario. Posiblemente este método no elimine por completo el uso de plaguicidas, pero sí ayudará a reducirlo al mínimo. Por otro lado, cabe considerar a la agricultura orgánica, como una opción viable y necesaria para la protección del medio ambiente y la salud de los seres humanos. Cabe recalcar que la agricultura orgánica prioriza la producción agrícola sin la utilización de plaguicidas ni fertilizantes sintéticos. De acuerdo a la FAO, la demanda de alimentos orgánicos irá incrementándose a medida que las personas se encuentren mejor informadas acerca de las repercusiones de los plaguicidas en el medio ambiente y en la salud humana (FAO, 2013).

Los biopesticidas son productos que contienen un microorganismo como ingrediente activo o bien se extraen de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química. Pueden estar constituidos por toda o una parte de la sustancia extraída, concentrada o no, adicionada o no a sustancias coadyuvantes. Muchos han sido los organismos que de manera experimental han sido aislados y se ha probado su actividad fungicida, aunque no todos han desarrollado un producto comercial. En general son productos formulados a base de bacterias u hongos (González, 2010). Es posible encontrar en el mercado distintos productos de origen bacteriano para el control de hongos de raíz y cuello a base de diferentes aislados de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Con respecto a aquellos productos comerciales a base de hongos benéficos, existe un considerable trabajo realizado con *Trichoderma* y *Gliocladium* debido a su fácil aislamiento, cultivo y fermentación a gran escala. Otros hongos como *Ampelomyces quisqualis*, *Fusarium oxysporium*, *Phytium oligandrum*, *Coniothyrium minitans* y *Phlebiopsis gigantea* también han desarrollado distintos productos comerciales (FAO, 2013).

En el Ecuador, muchos de los pequeños agricultores utilizan como pesticidas naturales ciertos extractos de plantas y como fertilizantes orgánicos, su principal fuente es el compost que consiste en una mezcla de residuos orgánicos, humus de lombriz, estiércol y hojas. Al emplear productos de sus propias plantaciones como los residuos procedentes de la propia finca, para el manejo de organismos patógenos y para el incremento de materia orgánica, los agricultores ahorran el gasto en insumos externos, y al mismo tiempo están empleando métodos inofensivos para el medio ambiente (Jacome, 2011).

En la legislación ecuatoriana se mencionan métodos alternativos al uso de agroquímicos. Se establece que la fertilidad del suelo y la nutrición de las plantas deben ser obtenidas por medio de técnicas como: cultivo de leguminosas y otras plantas fijadoras de nitrógeno, abonos verdes; la

aplicación de humus proveniente de residuos vegetales en descomposición y humus provenientes de deyecciones de lombrices o cadenas tróficas micro orgánica; rotación de cultivos; la utilización de estiércol (Jacome, 2011). Por otro lado, se dispone que el manejo de organismos patógenos debe realizarse de manera integrada, de acuerdo al sistema de ciclos orgánicos y manteniendo el equilibrio ecológico, para lo que deberá tomarse en cuenta lo siguiente: control biológico de plagas, que consiste en preparaciones a base de estiércoles, fermentos, extractos vegetales, infusiones y preparados de plantas u otros elementos biológicos; método ecológico, que consiste en el uso de trampas para el combate de insectos y siembra de cultivos repelentes e implementación de métodos mecánicos (Fernández C. , 2002).

Sin embargo, en la práctica la gran mayoría de agricultores grandes, tanto en nuestro país como en el mundo, utilizan plaguicidas y fertilizantes químicos, ya sea por desconocimiento de la existencia de productos alternativos, por ignorar los daños que producen al medio ambiente y a la salud humana, o porque son incentivados por políticas de gobierno que protegen al sector agrícola, proporcionándoles muchas facilidades de acceso a estos insumos químicos (Jacome, 2011).

4.5 Saponinas

Se da el nombre de saponinas a un grupo de glicósidos esteroidales que están ubicados en las plantas y que al disolverse en agua disminuyen la tensión superficial de esta, por lo tanto al agitar sus soluciones, se formara una espuma abundante y relativamente estable, de allí que proviene del latín “sapo” que significa jabón (Martínez A. , 2001).

Las saponinas son sustancias orgánicas que pertenecen a los saponósidos que son heterósidos ampliamente distribuidos en la naturaleza, tienen sabor amargo y color acre. Destruyen los

glóbulos rojos por hemólisis, son tóxicas para animales de sangre fría, por lo que se usa como veneno para peces. Para los animales de sangre caliente son tóxicas si se administran por vía intravenosa, pero por vía oral su toxicidad es muy baja. Son solubles en disolventes polares, pero no en los de baja polaridad, como hexano o cloroformo. Se ven afectas al pH de la solución, ya que a altos pH sufren hidrólisis, formándose saponinas de menor peso molecular (Ventura, 2010).

No tienen una fórmula química bien definida; sin embargo, de manera general, se puede sugerir el siguiente esqueleto base: $C_nH_{2n-8}O_{10}$ (con $n \geq 5$), poseen elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro ofrece ciertas dificultades. La estructura molecular de este esqueleto base se puede observar en el Anexo 8. Estas moléculas son solubles en agua, etanol y metanol; diluidos y en caliente. Las geninas son prácticamente insolubles en H_2O , solubles en solventes poco polares como éter. Se pueden localizar en cualquier órgano de la planta, raíz, hojas, semillas y corteza (Guerra, 2008).

4.5.1 Estructura de las saponinas

Dependiendo del tipo de genina presente las saponinas pueden dividirse en:

1. Saponinas esteroidales: (*Liliáceas*, *Dioscoreáceas* y *Solanáceas*), mayoritariamente se encuentran en las Monocotiledóneas, dentro de este grupo también se encuentran los alcaloides esteroidales.
2. Saponinas triterpénicas: (Umbelíferas, Leguminosas, cariofiláceas, Araliáceas, Ramnáceas, etc.) son comunes en algunos animales marinos y en las dicotiledóneas.

4.5.2 Agliconas esteroidales

Las saponinas esteroidales son compuestos que poseen una estructura compleja formada por un núcleo esteroideal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos, poseen un esqueleto con 27 átomos de carbono, formado por seis anillos: Anillo E (furano) y F (pirano). El aglicón en las saponinas esteroidales (sapogenina) presenta el esqueleto tetracíclico característico de este tipo de compuestos, denominado gonano (ciclopentanoperhidrofenantreno) en el caso de ser saturado. Son derivados del núcleo espirostano y se utilizan de preferencia para la obtención de hormonas corticoides y hormonas sexuales (Ventura, 2010).

4.5.3 Agliconas triterpénicas

En este grupo las geninas están constituidas por tres unidades de terpenos. Cada uno formado por dos unidades de isopreno, de forma que las geninas son moléculas con 30 átomos de carbono. Las geninas están constituidas por terpenos, formados por unidades de isopreno. Las saponinas triterpénicas pueden clasificarse en tres grupos: representados por alfa-amirina, β -amirina y lupeol, según la estructura de sus geninas (Alonso, 2009).

Se forman cuando un grupo carboxilo sustituye a un grupo metilo en las posiciones 4, 17 o 20. Las sapogeninas triterpénicas están ampliamente distribuidas en los reinos vegetal y animal; se presentan en 3 estructuras químicas diferentes: aciclícas como el escualeno, considerado como el precursor natural de esta familia; tetracíclicas como el panaxadiol y pentacíclicas (Guerra, 2008). Estas sustancias pueden presentarse en sus fuentes naturales en forma libre: formando ésteres, o como parte de un glicósido. Las sapogeninas pentacíclicas se subdividen a su vez en 3 grupos: tipo lupane, ursane, ambos no están presentes en los forrajes y los de tipo oleanane, derivados de la β amirina (Ventura, 2010).

4.5.4 Glicósidos

Las saponinas poseen de una a seis unidades de monosacáridos unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos. Estas unidades son comúnmente hexosas, pentosas y deoxihexosas; entre los que se encuentran principalmente glucosa, ramnosa, galactosa y xilosa. Los enlaces glicosídicos pueden tener distintas configuraciones (Martínez A. , 2001).

4.5.5 Usos de la saponina

Las saponinas son utilizadas en diversos tipos de industrias para la elaboración de: cosméticos, fármacos, suplementos para la minería y agricultura. En la industria cosmética esta sustancia se la utiliza principalmente como un componente en la elaboración de shampoo, jabones, espuma de afeitar y detergentes, gracias a su capacidad espumante (Olivera, 2013). En caso de la industria farmacéutica se utiliza esta sustancia como ingrediente activo en medicamentos para tratar afecciones renales, reumáticas y como antiinflamatorio. También se la utiliza como un coayugante natural en vacunas para humanos y animales. Actualmente, se están realizando estudios para su aplicación en afecciones cardiacas por su capacidad de emulsionar los lípidos que taponan los conductos sanguíneos (Luengo, 2001). En la minería se está utilizando la saponina en los procesos de electroobtención de cobre, extracción de litio y yodo (Baluarte, 2012). Finalmente, en la agricultura esta sustancia se la utiliza como un componente en varios insecticidas naturales (Pérez, 2002).

5 Materiales y metodología

5.1 Obtención del material vegetal

La fuente de saponina que se utilizó en este estudio fue el grano de la quinoa (*Chenopodium quinoa*). Las variedades escogidas para la obtención de saponina fueron: Pata de venado

(variedad dulce) y una quinua criolla (variedad amarga) recolectada en la comunidad de Zuleta que se encuentra ubicada en el cantón Ibarra de la provincia de Imbabura a una altitud de 3000 msnm.

5.2 Extracción de saponina por el método de microondas

Para la obtención de saponinas a partir del grano de la quinua se decidió utilizar una metodología basada en la extracción a través de microondas (Gianna, 2013). En breve, los granos no lavados de quinua se limpiaron con el fin de eliminar cualquier tipo de impurezas residuales de la cosecha como: ramas, hojas y piedras. Los granos limpios fueron secados a una temperatura de 50°C por 30 minutos en un horno. Luego, los granos de quinua fueron triturados con un molino eléctrico hasta obtener un polvo fino. Este proceso mencionado se puede observar en la Figura 1. Se pesó 4 gramos (gr) de polvo de quinua y se colocó en un frasco de vidrio con 80 mililitros (ml) de isopropanol al 20%. La mezcla se introdujo en el microondas junto con un recipiente de vidrio que contiene 400 ml de agua que sirve para mantener constante la temperatura de la mezcla durante el tiempo de extracción (Figura 2). En el microondas se programó un tiempo de 20 minutos a potencia #3, de modo que la mezcla alcanzó una temperatura de 86°C. Una vez que finalizó el tiempo de extracción se colocó el envase que contiene la mezcla en agua para enfriarlo. Finalmente, el líquido procedente de la extracción se filtró a través de cernidores para remover los sólidos y obtener una solución libre de impurezas. La solución de saponina obtenida luego del filtrado, debe seguir un proceso de concentración, el cual se lo realizó utilizando dos metodologías diferentes que van a explicarse a continuación.



Figura 1. Proceso de molienda del grano de quinua en un molino eléctrico



Figura 2. Envase con la mezcla de quinua y solvente dentro del microondas

5.3 Métodos de concentración de saponinas

En este estudio se realizó la concentración de la saponina mediante dos metodologías. Una fue la concentración por evaporación, utilizando como fuente de calor una plancha de calentamiento. En un vaso de precipitación se colocó 200 ml de la solución de saponina y se puso sobre la plancha caliente. Se fijó la temperatura de la plancha a 160°C y se dejó evaporar lentamente midiendo la temperatura de la solución de manera regular para evitar que esta supere los 86°C. La evaporación tuvo una duración de 15 horas. El segundo método elegido para concentrar el extracto de saponina se basó en la liofilización. Esta técnica consiste en separar el agua de un

determinado producto por medio de congelación rápida y posterior sublimación del hielo formado a presión reducida (Cordovéz, 2014). Para iniciar el proceso de liofilización se colocó un volumen de 200 ml de la solución de saponina en un recipiente que posteriormente se conectó al liofilizador. El proceso de liofilización tuvo una duración de 24 horas a una temperatura constante de -59°C .

5.4 Cuantificación de saponinas por espectrofotometría utilizando el reactivo Liebermann-Burchard

Para cuantificar la cantidad de saponina presente en cada una de las soluciones que se obtuvieron se utilizó la metodología de tinción con el reactivo Liebermann-Burchard (LB) que se utiliza para colorear la muestra al reaccionar con la saponina presente (Gianna, 2013). Este reactivo utilizado para la cuantificación de saponinas está conformado por la mezcla de ácido acético anhidro y ácido sulfúrico concentrado en una proporción de 1:5 respectivamente. Se colocó el ácido sulfúrico en un vaso de precipitación, posteriormente se agregó el ácido acético anhidro lentamente y con agitación continua. El vaso de precipitación donde se realizó esta mezcla se encontraba sobre cubos de hielo debido a que estos reactivos al mezclarse producen una fuerte reacción exotérmica. El reactivo LB se mezcló con la solución de saponina en una proporción de 3.5:1 respectivamente y se obtuvo una solución color ámbar, coloración que está directamente relacionada con la cantidad de saponina presente. Se midió la absorbancia de la solución coloreada por el reactivo LB a una longitud de onda de 528 nm en un espectrofotómetro. También se midieron las absorbancias de la solución concentrada de saponina y del reactivo LB. Se realizaron 6 mediciones, cada una en un intervalo de 10 minutos para asegurar que la reacción de la saponina y el LB ocurra en su totalidad. Utilizando la siguiente ecuación $AS = AM - AR - AP$; en donde AS es la absorbancia de la saponina, AM la absorbancia de solución + reactivo

LB, AR la absorbancia del reactivo LB y AP, absorbancia de la solución; así se obtuvo el valor real de la absorbancia de la saponina presente en la solución. Para determinar la cantidad de este compuesto en miligramos de saponina por mililitro de solución (mg/ml) se utilizó una curva de calibración que se encuentra en la Figura 3. En base de esta curva se obtiene la ecuación $y = 4.5725x + 0.0164$, donde a partir del reemplazo de la variable dependiente (y) por el valor obtenido de la absorbancia real, se determinó la concentración (x) de la saponina. Este procedimiento se lo realizó para cuantificar varios extractos de saponina provenientes de quinua dulce y amarga. Entre los extractos cuantificados provenientes de quinua amarga se encuentran: extracto sin concentrar, concentrado por evaporación y por liofilización. El extracto cuantificado proveniente de quinua dulce fue sin proceso de concentración a manera de control.

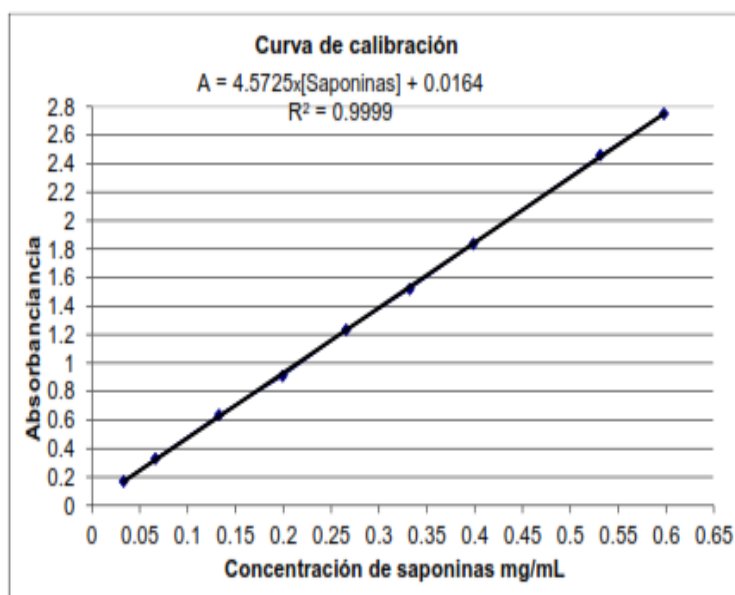


Figura 3. Curva de calibración para saponinas extraídas de la quinua (Gianna, 2013)

5.5 Cuantificación de proteína total de la muestra extraída

La cuantificación de proteína presente en el extracto de quinua amarga se lo realizó con un método espectroscópico donde se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda en

el rango UV dentro del espectro de la luz (Fernández E. , 2013). Para este procedimiento se colocó la muestra de solución extraída dentro del espectrofotómetro y se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 205 nm. Con la ayuda de la ecuación de Beer-Lambert (West, 2005), que explica una relación empírica la cual compara la absorción de la luz con las propiedades de material atravesado, se pudo obtener la concentración de proteína en la solución de quinua extraída en miligramos de proteína /mililitro de solución. Para esto se utilizó la siguiente ecuación $CP = \frac{A_{205}}{\epsilon_{205} \times b}$ donde la absorbancia medida a 205 nm es dividida entre la multiplicación del coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{205} = 31 \text{ ml/mg*cm}$) y la distancia de la muestra que la luz atraviesa ($b=1 \text{ cm}$). Como control en este caso, se utilizó un extracto proteico a partir del grano de quinua amarga. Se pesó 2 g de quinua molida y se colocó en un vaso de precipitación junto con 20 ml del buffer fosfato sódico 0.2 M. Se ajustó el pH de la solución hasta un valor de 7.5. Luego, la solución se filtró por un papel filtro y se centrifugó por 20 minutos a 18000 rpm. El sobrenadante constituye el extracto proteico (González, 2013).

5.6 Aislamiento e identificación de hongos

Los fitopatógenos que se utilizaron en este estudio fueron aislados a partir de hojas de banano que presentaron síntomas de estas enfermedades. Las hojas de banano fueron recolectadas en la Hacienda La Libertad ubicada en el cantón Valencia de la provincia de Los Ríos. En primer lugar, se obtuvo explantes pequeños de 3x3 cm de las hojas infectadas de banano. Cada explante contenía tanto tejido sano (verde) como tejido afectado (amarillo-café). Los explantes fueron sometidos a un proceso de desinfección superficial que consistió en tres lavados con soluciones de cloro (2.5%), alcohol (70%) y agua destilada. Los explantes permanecieron por 1 minuto en cada una de las soluciones y una vez finalizado este proceso cada explante fue colocado en una caja petri que contenía medio de cultivo PDA como lo muestra la Figura 4. Las cajas petri fueron

(isopropanol 20%). A continuación, en la Tabla 1 se observan los tratamientos utilizados en este primer ensayo.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en base de los extractos de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) para observar su efecto con *Fusarium oxysporum* y *Cercospora fijiensis*

Ensayo# 1	
Tratamiento	
C1	Control H ₂ O
C2	Control Isopropanol (20%)
SC	No Concentrado
CE	Concentrado Evaporado
CL	Concentrado Liofilizado

Luego, para el ensayo #2 se tomó la solución de saponina concentrada por evaporación y se la diluyó para obtener varias soluciones de diferente concentración. Finalmente, en el ensayo #3 se tomó un intervalo de concentraciones más pequeño basado en lo observado en el ensayo anterior y también se utilizó un control con fungicida comercial. Los tratamientos utilizados en los dos últimos ensayos con ambos hongos se muestran en la Tabla 2. En cada ensayo se procedió de la misma manera en la aplicación de cada tratamiento. Se preparó el medio de cultivo PDA y en cada caja petri se colocó un volumen de 1 ml de cada tratamiento y se lo dejó gelatinizar. Luego, sobre el agar se colocó un pedazo circular de 1 cm de diámetro con el hongo, utilizando un sacabocado. Las cajas petri se colocaron en la incubadora a una temperatura constante de 29°C en obscuridad.

Tabla 2. Tratamientos utilizados en base al extracto evaporado para observar su efecto en *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum*

Ensayo # 2	
Extracto Evaporado	
Tratamiento	Concentración (ppm)
T1 (Control)	0
T2	100
T3	500
T4	1000
T5	5000
T6	10000
T7	50000
T8	100000
T9	500000
T10	1000000

Ensayo #3				
<i>Cercospora fijiensis</i>			<i>Fusarium oxysporum</i>	
	Tratamiento	Concentración (ppm)	Tratamiento	Concentración (ppm)
Control H ₂ O	A	0	A	0
Control Fungicida	B (siganex)	33000	B (sportak)	3000
Extracto Evaporado	C	7500	C	3000
	D	10000	D	5000
	E	15000	E	10000
	F	20000	F	15000
	G	30000	G	20000
	H	40000	H	30000
			I	40000

5.8 Diseño experimental

En todos los ensayos se realizaron tres mediciones para la obtención de datos, estas mediciones fueron en el día: 4, 8 y 12. La variable de respuesta en este estudio fue el diámetro o halo de crecimiento del hongo que se midió en centímetros (cm). El diseño experimental escogido para

cada ensayo fue el diseño completamente aleatorizado (DCA), donde cada caja petri representó una unidad experimental. En cuanto a los ensayos # 1 y 2 se realizaron 4 repeticiones por cada tratamiento, mientras que en el tercer ensayo se realizó 6 repeticiones por tratamiento. Los datos que se generaron a través de los diferentes ensayos fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de la varianza (ANOVA) y una prueba de separación de medias (prueba de Tukey al 5%).

6 Resultados

6.1 Extracción y concentración de saponina

Posterior a la extracción de saponina realizada por microondas siguiendo la metodología explicada anteriormente en materiales y metodología, se obtuvo una solución turbia, la cual pasó al proceso de filtrado para eliminar las impurezas. La solución de saponina obtenida antes y después del filtrado se muestra en la Figura 5. La solución de saponina siguió un proceso de concentración utilizando dos metodologías distintas.



Figura 5. Solución de saponina antes (A) y después del filtrado (B)

La concentración por evaporación dio como resultado una solución opaca de color café. Partiendo de un volumen inicial de 200 ml, luego de este proceso de concentración, el volumen final alcanzado fue de 25 ml. Por otra parte, la concentración realizada a través de la liofilización generó como resultado una sustancia blanquecina opaca con textura esponjosa. El volumen resultante en esta metodología fue de 5 ml, luego de haber iniciado con un volumen de solución de 200 ml. Las soluciones de saponina antes y después de los procesos de concentración se puede observar en la Figura 6.

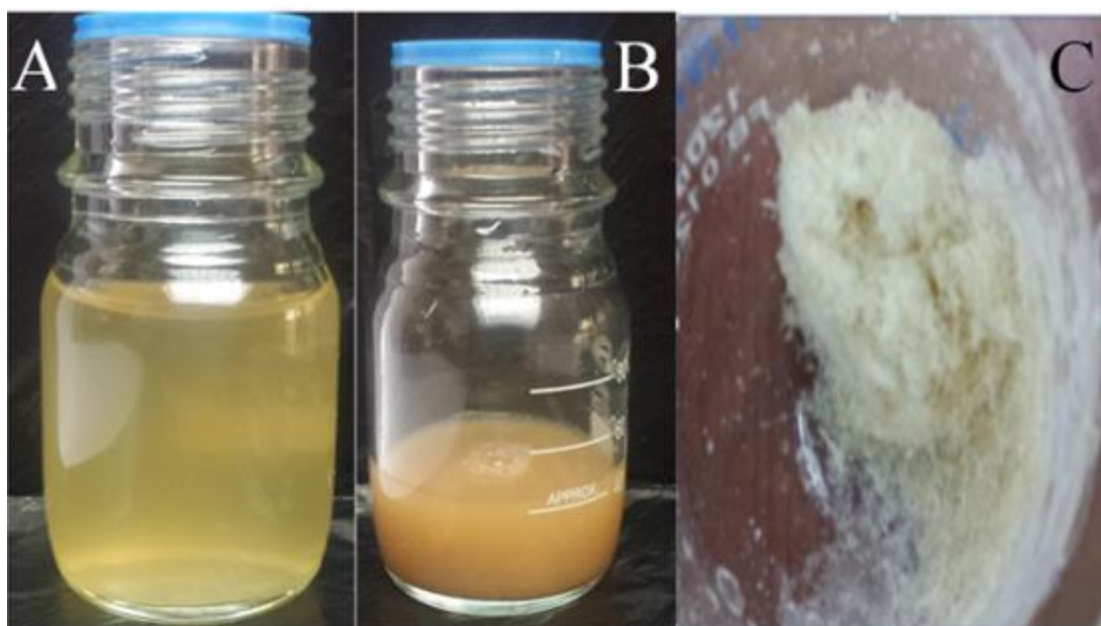


Figura 6. Solución de saponina no concentrada (A), concentrada por evaporación (B) y por liofilización (C)

6.2 Cuantificación de saponinas

Luego de haber concentrado las muestras por las dos metodologías, se cuantificó la cantidad de saponina presente en las soluciones por medio de espectrofotometría utilizando el reactivo Liebermann-Burchard. En primer lugar, todos los datos de cada medición de la absorbancia realizada en las soluciones se encuentran en el Anexo 9. Por otra parte, la cuantificación de la

saponina presente en los extractos de quinua dulce y amarga se observan en la Figura 7, donde se puede notar una clara diferencia en la cantidad de saponina que cada extracto posee, siendo mayor está en el extracto de quinua amarga. La cantidad de saponina en los extractos de quinua dulce y amarga fueron exactamente de 0.02 y 0.07 mg/ml respectivamente. Como se puede ver la cantidad de saponina en el extracto de quinua amarga es muy superior por lo que se evidencia existente entre las dos.

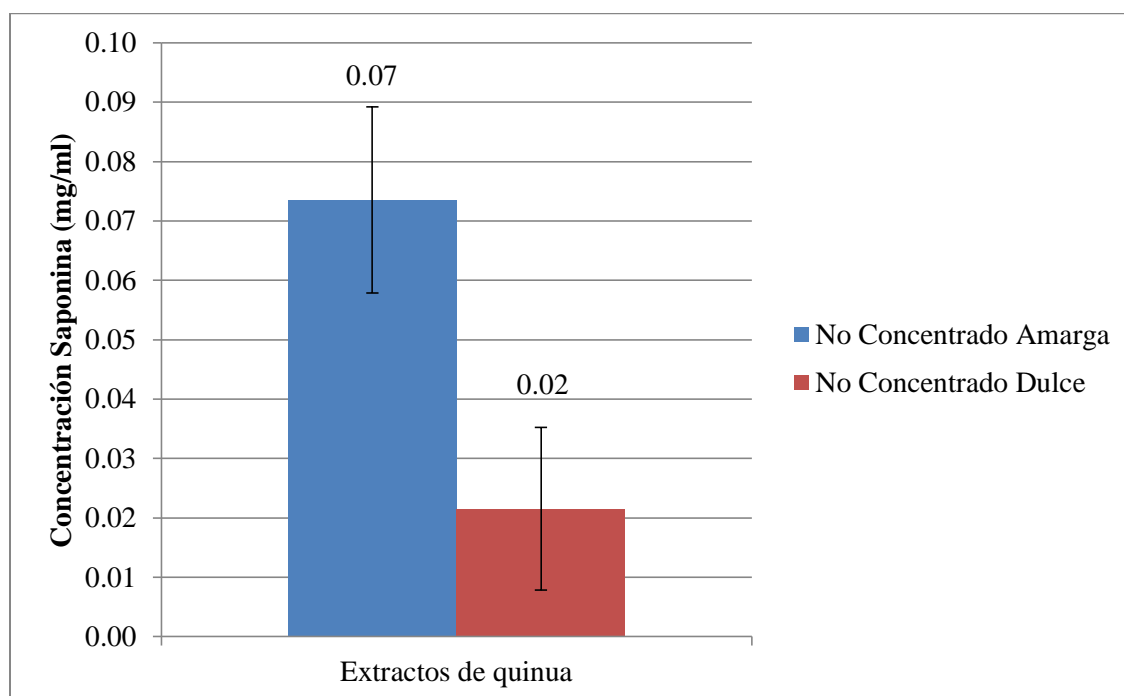


Figura 7. Comparación de la concentración de saponina en mg/ml presente en los extractos no concentrados de quinua amarga y dulce

Los valores de la cantidad de saponina en los diferentes extractos concentrados de quinua amarga se muestran en la Figura 8. En la que se puede ver que el extracto concentrado por liofilización es aquel que tiene una mayor cantidad de saponina, 0.49 mg/ml, seguido del extracto evaporado, 0.41 mg/ml y finalmente, el que menor cantidad de saponina contiene es el extracto no

concentrado con 0.07 mg/ml. Cada uno de estos extractos presentó una tonalidad de color diferente como se muestra en Figura 9.

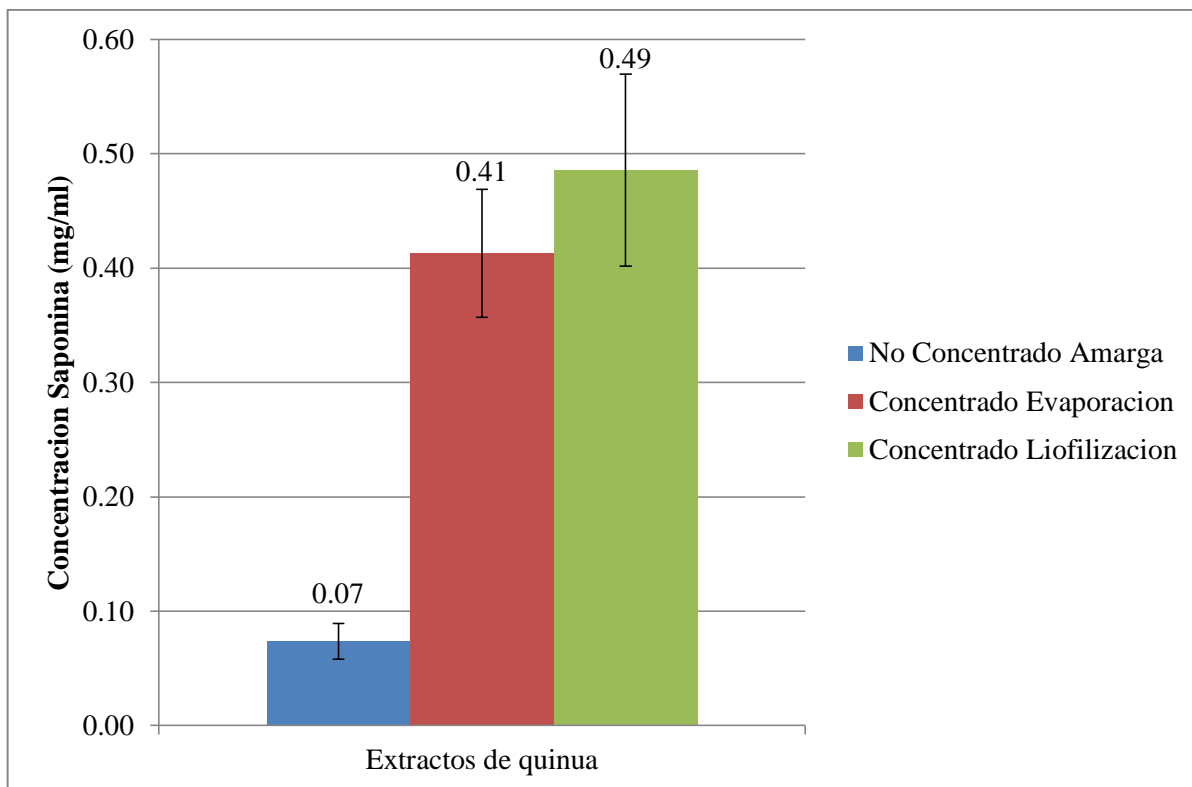


Figura 8. Comparación de la concentración de saponina en mg/ml presente en los extractos de quinua amarga

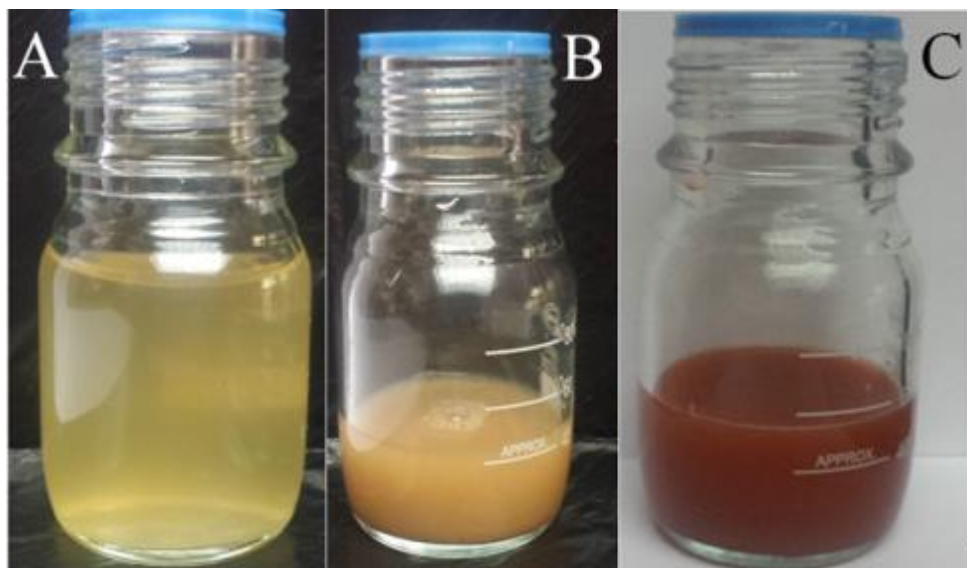


Figura 9. Extractos de quinua amarga no concentrado (A), evaporado (B) y liofilizado (C)


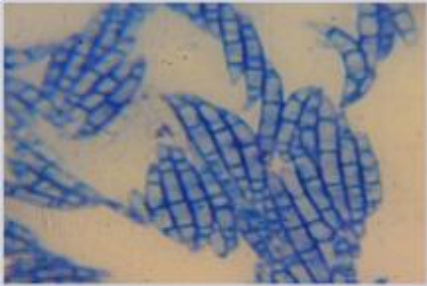


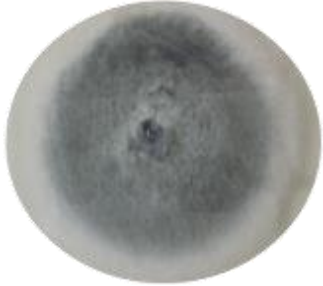


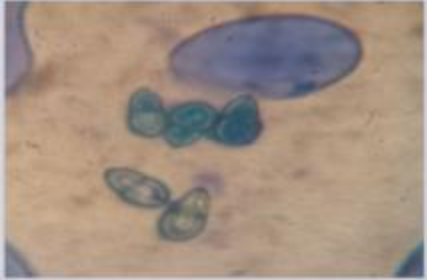
6.3 Cuantificación de la proteína total de la muestra

Posteriormente se realizó la cuantificación de proteína por medio de la metodología espectrofotométrica descrita en materiales y metodología. Los resultados encontrados muestran que el extracto proteico de quinua amarga presentó una cantidad de $6.25 \text{ mg}_{\text{proteína/ml solución}}$. Este valor indica que la quinua utilizada para este estudio contiene 12.5% de proteína total. En cambio, el extracto no concentrado de quinua amarga presentó una cantidad de proteína de $0.032 \text{ mg}_{\text{proteína/ml solución}}$. En términos de porcentaje la concentración de proteína de este extracto de quinua es de 0.064%.

6.4 Aislamiento e identificación de hongos

Como producto de los aislamientos realizados a partir de hojas de banano se obtuvieron varios hongos diferentes como se muestra en el Anexo 10, de los cuales se logró identificar mediante microscopía cuatro especies de hongos. En la Tabla 3 se puede observar cada uno de los hongos identificados junto con la respectiva microscopía de sus estructuras características. Los hongos identificados fueron: *Cercospora fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Collectotricum musae* y *Cordana musae*.

Tabla 3. Identificación mediante microscopía de hongos aislados de hojas de banano

IDENTIFICACION DE AISLAMIENTOS			
No. Hongo	Imagen de Micelio	Microscopía	Identificación
C1			<i>Fusarium oxysporum</i>
E1			<i>Cercospora fijiensis</i>
B1			<i>Collectotrichum musae</i>
B2			<i>Cordana musae</i>

6.5 Evaluación del efecto de la saponina en *Cercospora fijiensis*

Se realizaron tres ensayos con cada uno de los hongos bajo estudio y en cada ensayo se tomaron tres mediciones (4-8-12 días) del diámetro de crecimiento. En el primer ensayo se realizó una comparación entre los extractos concentrados y no concentrado en el medio de cultivo, frente a dos controles (agua y solvente). El análisis estadístico de los datos se observa en la Figura 11, en donde se indica el promedio de crecimiento del hongo en cada uno de los tratamientos. Claramente se observa que existe un aumento en el crecimiento promedio en los hongos tratados con el extracto evaporado y liofilizado en comparación con los controles. En promedio se observa que el tratamiento con extracto liofilizado alcanzó un diámetro de 6.09 cm, seguido del extracto evaporado con un valor promedio de 5.42 cm. Por otra parte, los controles con agua y solvente, presentaron valores medios de 3.63 cm y 2.82 cm respectivamente. El extracto sin concentrar tuvo un crecimiento promedio de 3.45 cm el cual se encuentra por debajo del control con agua pero sobre el segundo control con solvente. Se debe mencionar que para este ensayo se obtuvo en el análisis de los datos un coeficiente de variación (CV) de 2.59% el cual se encuentra dentro de los valores esperados para ensayos en condiciones de laboratorio.

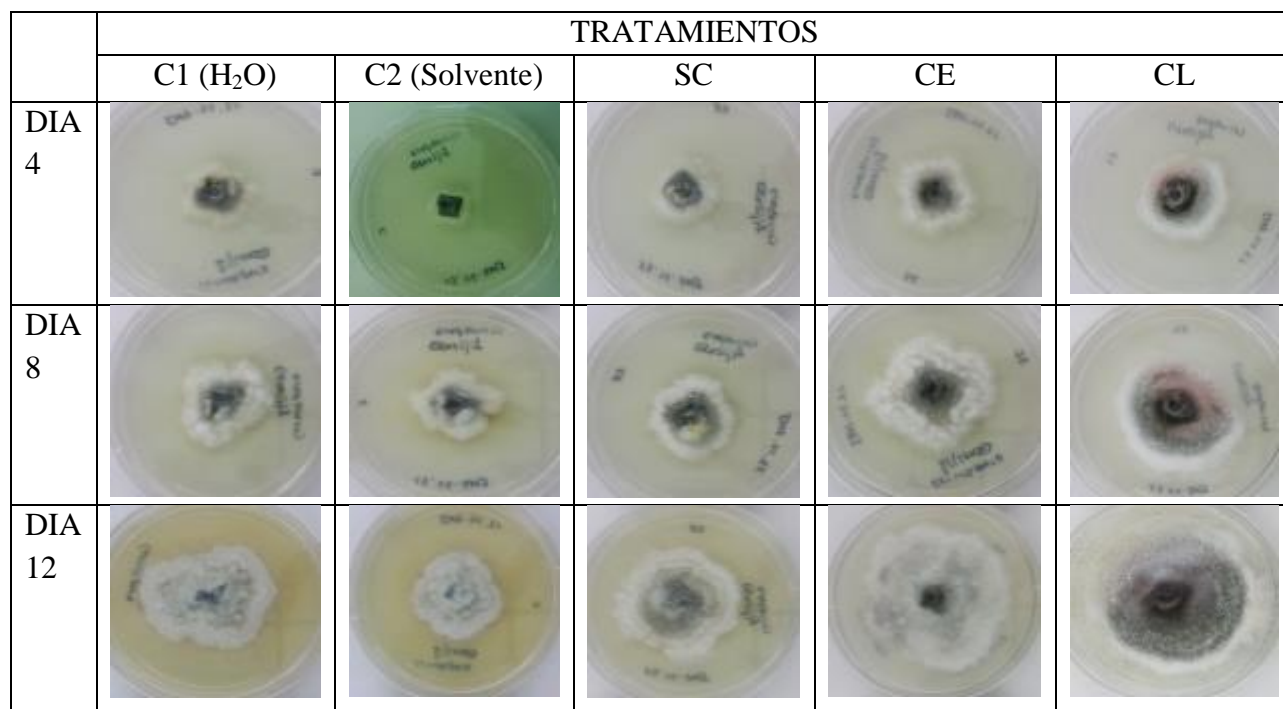


Figura 10. Efecto de los extractos puros de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) sobre el crecimiento *in vitro* de *Cercospora fijiensis*

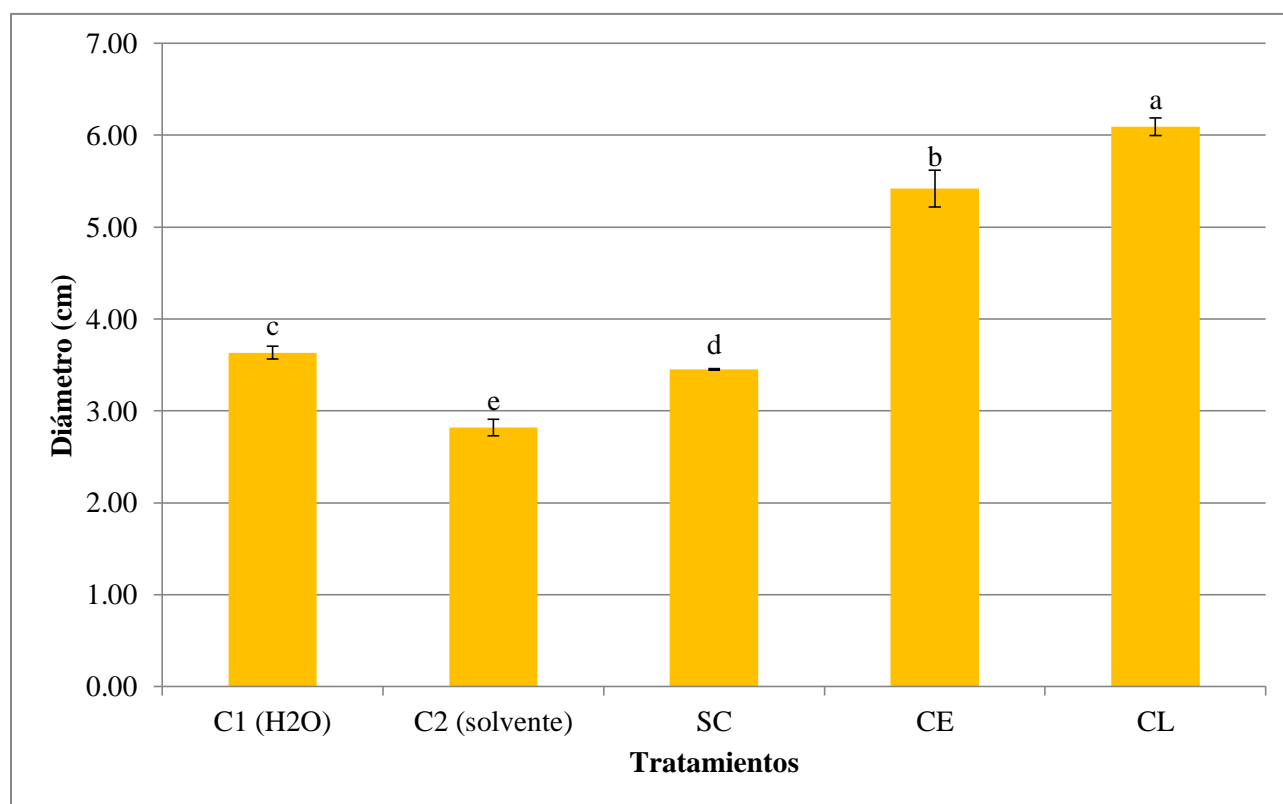


Figura 11. Evaluación del efecto de los extractos puros de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) sobre el crecimiento de *Cercospora fijiensis*

Tabla 4. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #1 con *Cercospora fijiensis*: (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey

a.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Tratamientos	4	31.24	7.81	635.14*	3.06
E.E	15	0.18	0.012		
TOTAL	19	31.42			

*sig.($p < 0.05$); CV= 2.59%

b.

Tratamiento	C2	SC	C1 (H ₂ O)	CE	CL
Media	2.82±0.09	3.45±0.01	3.63±0.07	5.42±0.20	6.09±0.09
Rango	e	d	C	b	a

Qp ($p < 0.05$)=4.37; Valor Tukey= 0.108

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el segundo ensayo, donde se observó el efecto que tiene el extracto evaporado en un rango de concentraciones sobre el hongo. Se puede destacar que únicamente los tratamientos 10 y 6 presentaron un crecimiento promedio diferente en comparación al control que en este caso es con agua. Los tratamientos presentan un diámetro de crecimiento promedio similar entre sí, con excepción de los tratamientos mencionados anteriormente. Esto puede notarse en la Figura 12 donde el control muestra un valor de 4.79 cm; el tratamiento 6, cuya media es la menor, presenta un diámetro de 2.53 cm; finalmente, la mayor media corresponde al tratamiento 10 con 5.66 cm. En este caso se obtuvo un CV de 4.09%, si bien todavía se encuentra dentro de lo esperado para este tipo de ensayos, también es necesario mencionar que está bastante cerca del máximo que es del 5%.

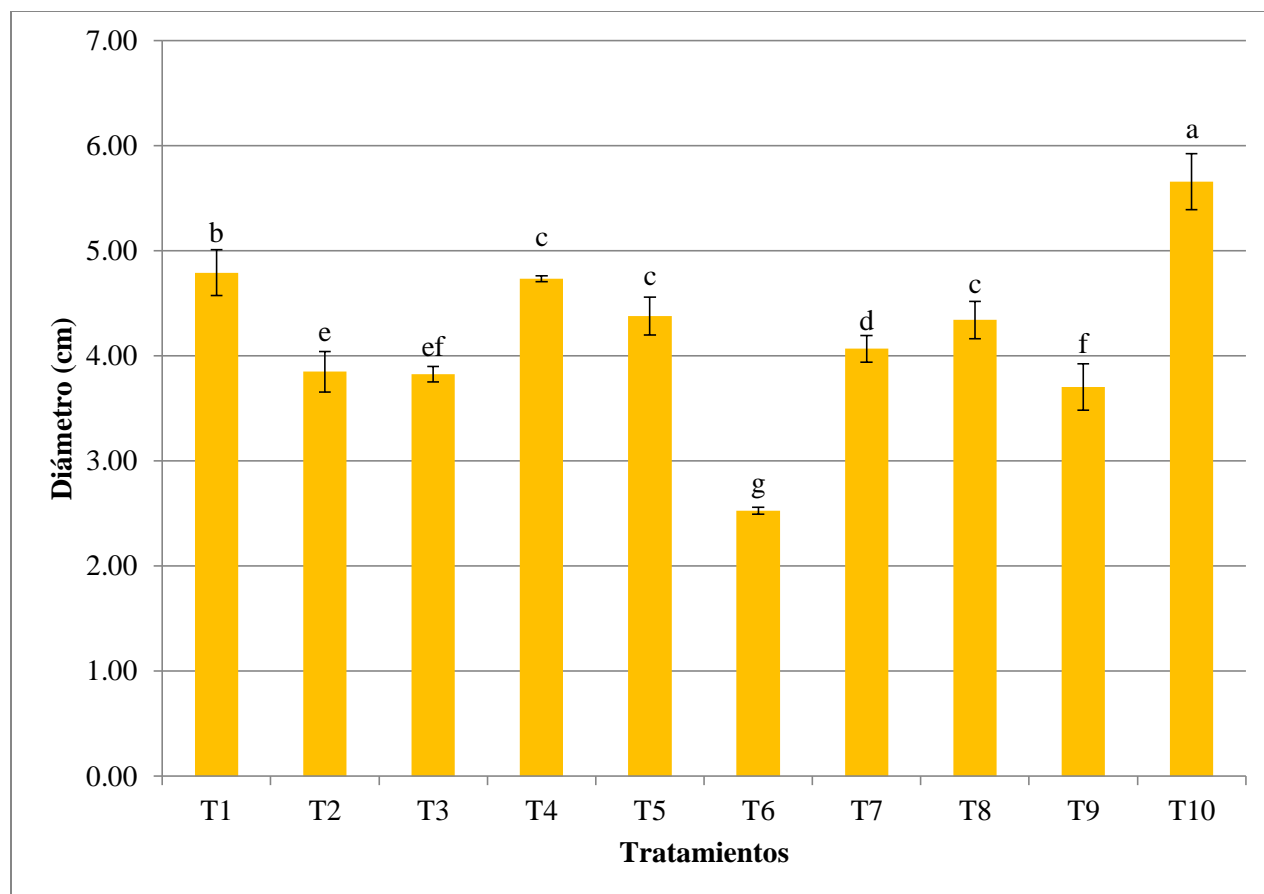


Figura 12. Evaluación del efecto de soluciones en base al extracto de saponina evaporado (CE) sobre el crecimiento de *Cercospora fijiensis* (T1=0 ppm, T2=100 ppm, T3=500 ppm, T4=1000 ppm, T5=5000 ppm, T6=10000 ppm, T7=50000 ppm, T8=100000 ppm, T9=500000 ppm, T10=1000000 ppm)

Tabla 5. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #2 con *Cercospora fijiensis*: (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey

a.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Tratamientos	9	24.58	2.73	93.19*	2.21
E.E	30	0.88	0.029		
TOTAL	39	25.46			

*sig.($p < 0.05$); CV= 4.09%

b.

Tratamiento	Media	Rango
T6	2.53±0.03	g
T9	3.70±0.02	f
T3	3.83±0.07	ef
T2	3.85±0.19	e
T7	4.07±0.12	d
T8	4.34±0.18	c
T5	4.38±0.18	c
T4	4.73±0.03	c
T1	4.79±0.22	b
T10	5.66±0.27	a

Qp ($p < 0.05$) = 4.83; valor Tukey = 0.131

En el ensayo final con *Cercospora fijiensis* se aplicó nuevamente el extracto evaporado, pero en un rango de concentraciones diferente. A continuación, en la Figura 13 se puede observar el crecimiento en promedio que el hongo tuvo en cada tratamiento. En este caso el diámetro promedio más alto es de 4.87 cm y se presentó en el tratamiento A (control con agua), seguido de los tratamientos F, G y H cuyos valores medios son de 4.32, 4.70 y 4.78 cm respectivamente. A pesar de que estos tratamientos estadísticamente son diferentes, los valores obtenidos son bastante cercanos entre sí por lo que su efecto es similar. Dentro de los tratamientos con saponina el de menor crecimiento promedio se observó en el tratamiento D con un valor de 2.56 cm. El control con fungicida (tratamiento B) muestra el menor crecimiento en general de todos los tratamientos utilizados en este estudio. En este tratamiento el hongo alcanzó un diámetro solo de 1.15 cm en promedio. Por medio del análisis de los datos obtenidos se determinó un CV para este ensayo de 1.20% el cual se encuentra por debajo del 5% de error que se permite en ensayos de laboratorio.

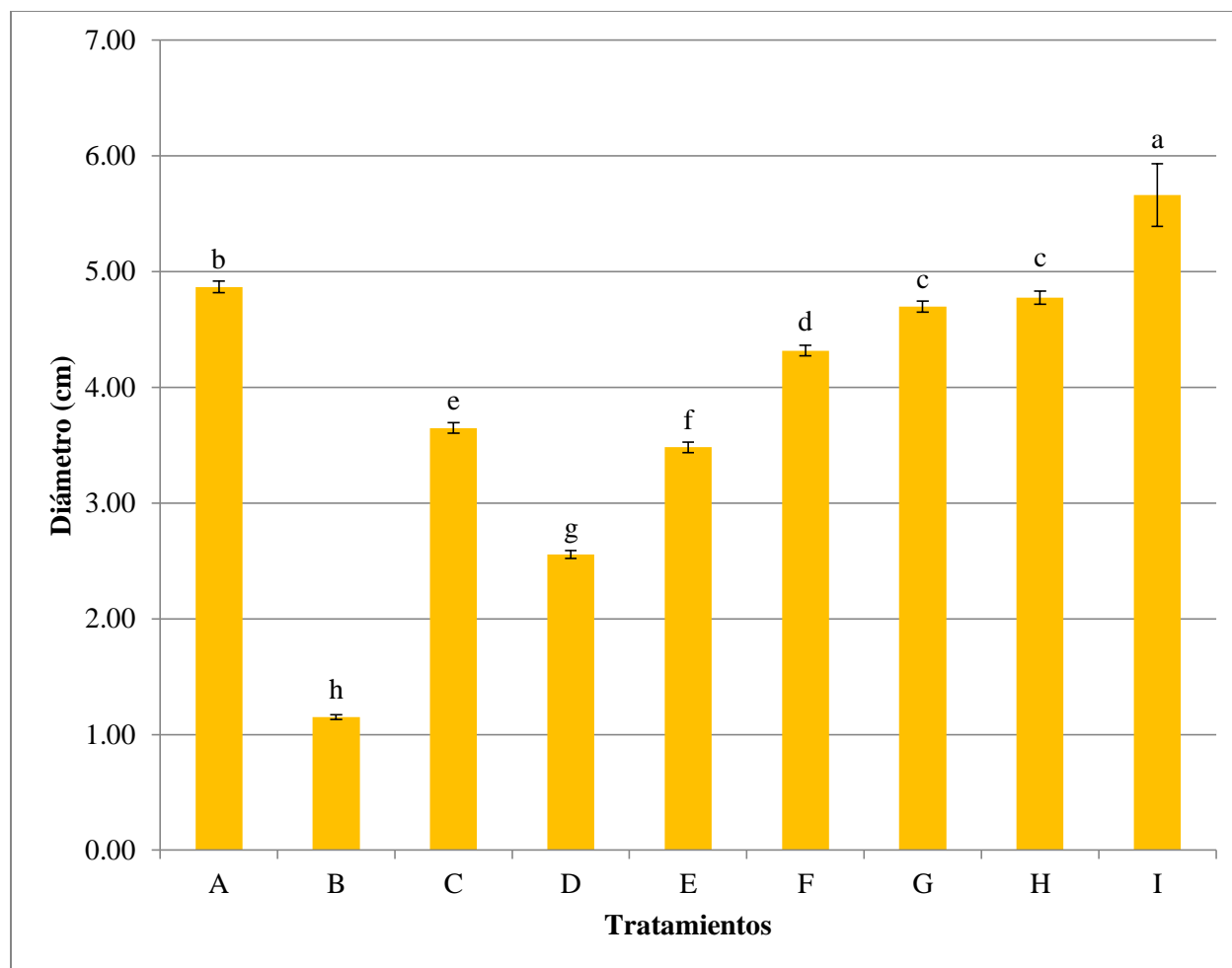


Figura 13. Evaluación del efecto de soluciones en base al extracto de saponina evaporado (CE) sobre el crecimiento de *Cercospora fijiensis* (A=0 ppm, B siganex=33000 ppm, C=7500 ppm, D=10000 ppm, E=15000 ppm, F=20000 ppm, G=300000 ppm, H=40000 ppm, I=1000000 ppm)

Tabla 6. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #3 con *Cercospora fijiensis*: (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey

a.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Tratamientos	7	70.52	10.07	5120.01*	2.25
E.E	40	0.08	0.002		
TOTAL	47	70.60			

*sig.($p < 0.05$); CV= 1.20%

b.

Tratamiento	Media	Rango
B	1.15±0.02	h
D	2.56±0.03	g
E	3.48±0.04	f
C	3.65±0.05	e
F	4.32±0.05	d
G	4.70±0.05	c
H	4.78±0.06	c
A	4.87±0.05	b
I	5.66±0.23	a

Qp ($p < 0.05$)= 4.52; valor Tukey= 0.03

6.6 Evaluación del efecto de la saponina en *Fusarium oxysporum*

Se realizaron tres ensayos con cada uno de los hongos bajo estudio y en cada ensayo se tomaron tres mediciones (4-8-12 días) del diámetro de crecimiento. En el primer ensayo se realizó una comparación entre los extractos concentrados y no concentrado a una concentración de 40000 ppm en el medio de cultivo, frente a dos controles, agua y solvente. En la Figura 15 se presentan los promedios de crecimiento en cada tratamiento, lo destacable es que el mayor crecimiento se obtuvo en el extracto liofilizado con 5.79 cm de diámetro. El crecimiento del hongo en presencia del extracto evaporado y el control con agua fue similar a pesar de que estadísticamente se observa que son diferentes. Los valores presentados en los tratamientos mencionados antes fueron de 3.59 cm y 3.24 cm respectivamente. Finalmente, los tratamientos con menor crecimiento promedio son el extracto sin concentrar y el control con solvente, siendo este último el menor de todos con un valor de 2.60 cm. También se debe mencionar que se obtuvo un coeficiente de variación en el análisis de los datos de 1.41% lo cual se encuentra dentro del rango determinado para este tipo de ensayos.

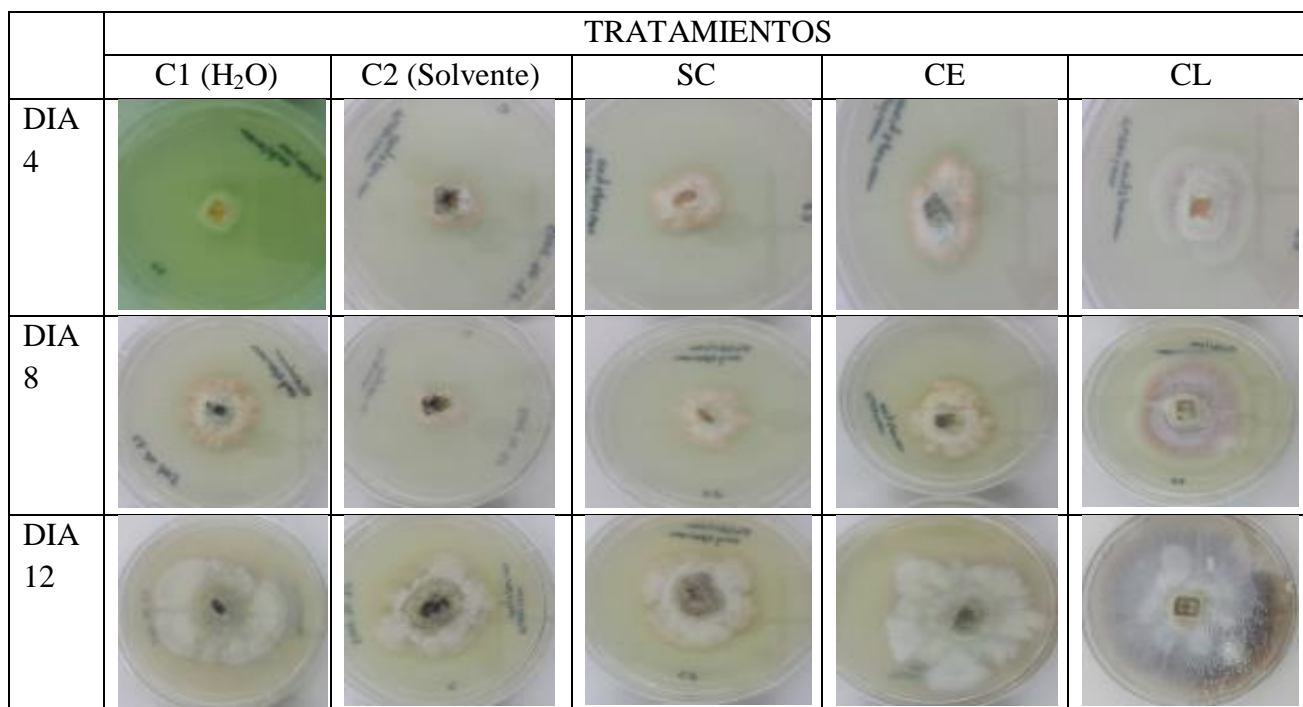


Figura 14. Efecto de los extractos puros de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum*

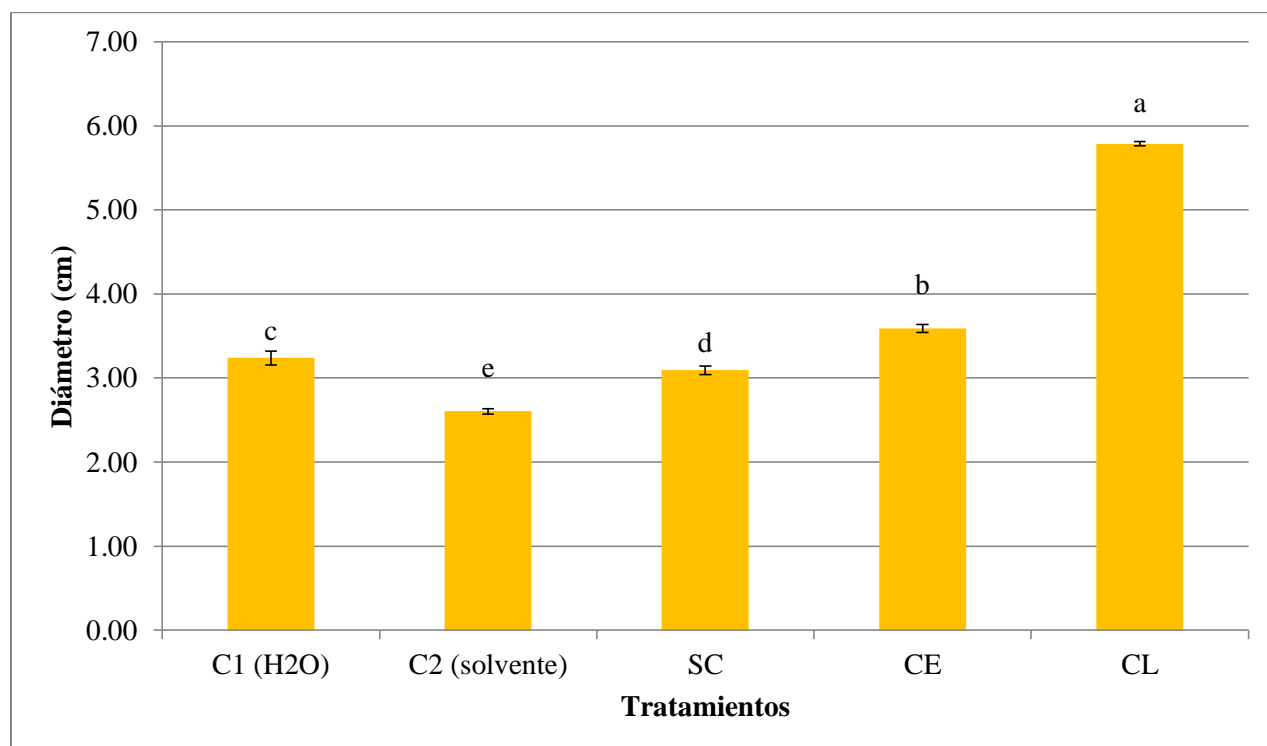


Figura 15. Evaluación del efecto de los extractos puros de saponina: no concentrado (SC), evaporado (CE) y liofilizado (CL) sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*

Tabla 7. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #1 con *Fusarium oxysporum*: (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey

a.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Tratamientos	4	24.60	6.15	2319.06*	3.06
E.E	15	0.04	0.003		
TOTAL	19	24.64			

*sig.($p < 0.05$); CV= 1.41%

b.

Tratamiento	C2	SC	C1 (H ₂ O)	CE	CL
Media	2.60±0.03	3.09±0.05	3.24±0.08	3.59±0.05	5.79±0.02
Rango	e	d	c	b	a

Qp ($p < 0.05$)= 4.37; valor Tukey= 0.0503

Los resultados obtenidos en el segundo ensayo con *Fusarium oxysporum* se presentan a continuación. En primer lugar, el diámetro promedio de cada tratamiento puede verse en el Figura 16. Se debe resaltar que el mayor diámetro de crecimiento obtenido pertenece a los tratamientos 5 y 6 con valores de 4.59 cm y 4.73 cm respectivamente, a pesar de que estos tratamientos tengan rangos distintos los valores del diámetro son muy cercanos entre sí. Existe una amplia diferencia entre estos tratamientos y el control con agua (tratamiento 1) que solamente tuvo un diámetro promedio de 3.26 cm; sin embargo el diámetro de crecimiento más bajo se observó en el tratamiento 2 con un valor de 2.65 cm. También es necesario mencionar que los tratamientos 8 y 9 presentan un efecto idéntico en el crecimiento del hongo, ya que se observa que presentan el mismo rango lo que significa que estadísticamente son iguales. Los diámetros en estos tratamientos son de 3.51 cm y 3.50 cm respectivamente; en cambio, el tratamiento 10 presenta un valor medio de 3.93 cm. Se debe mencionar que los datos obtenidos presentan una variación de 1.26% el cual se encuentra por debajo del valor máximo permitido.

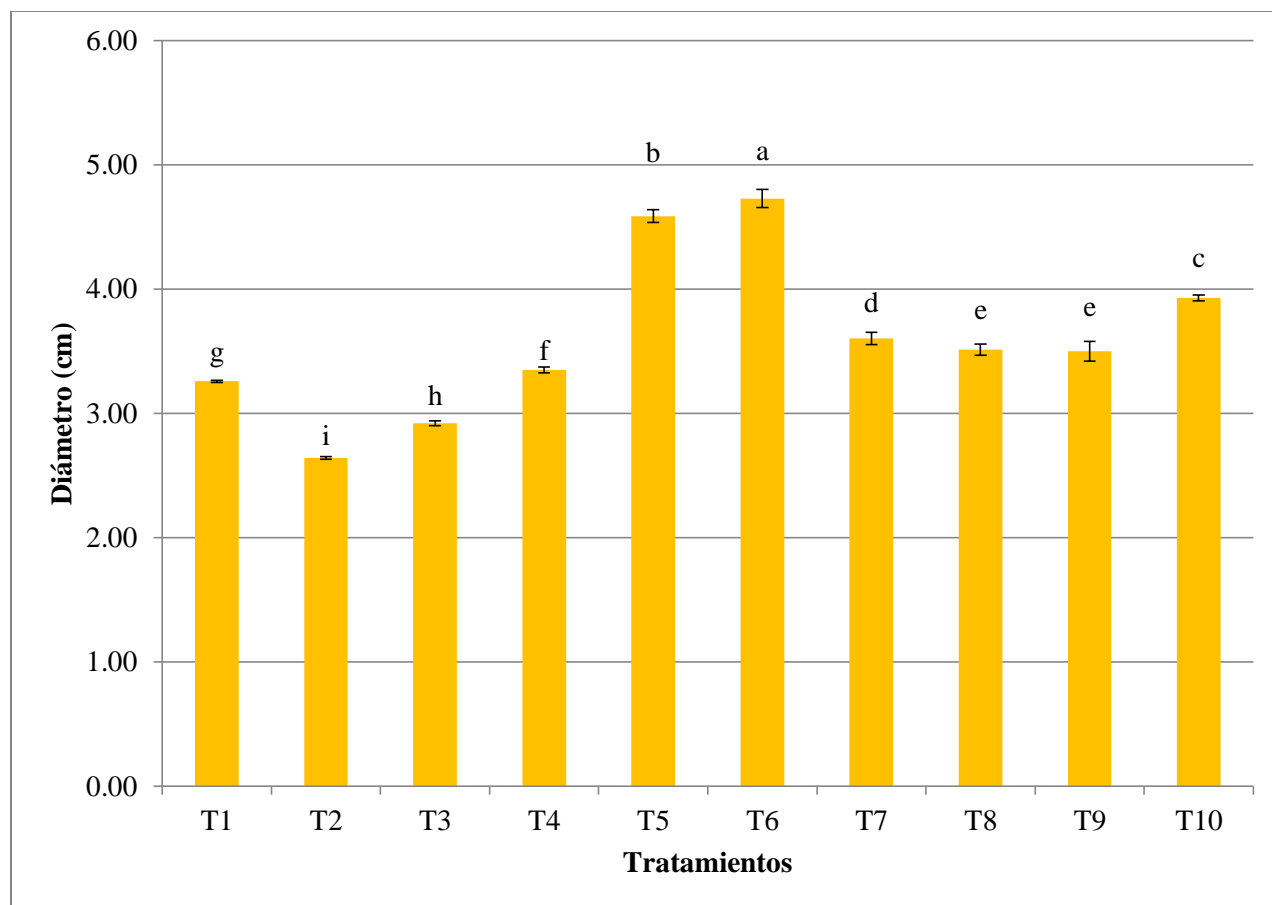


Figura 16. Evaluación del efecto de soluciones en base al extracto de saponina evaporado (CE) sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (T1=0 ppm, T2=100 ppm, T3=500 ppm, T4=1000 ppm, T5=5000 ppm, T6=10000 ppm, T7=50000 ppm, T8=100000 ppm, T9=500000 ppm, T10=1000000 ppm)

Tabla 8. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #2 con *Fusarium oxysporum*: (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey

a.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Tratamientos	9	15.27	1.69	841.64*	2.21
E.E	30	0.06	0.002		
TOTAL	39	15.33			

*sig.($p < 0.05$); CV= 1.26%

b.

Tratamiento	Media	Rango
T2	2.64±0.01	i
T3	2.92±0.02	h
T1	3.26±0.01	g
T4	3.35±0.03	f
T9	3.50±0.08	e
T8	3.51±0.05	e
T7	3.60±0.02	d
T10	3.93±0.05	c
T5	4.59±0.05	b
T6	4.73±0.07	a

Qp (p < 0.05) = 4.83; valor Tukey = 0.034

En el último ensayo con el hongo *Fusarium oxysporum* se aplicó nuevamente el extracto evaporado de quinua en concentraciones diferentes a las del ensayo anterior, además de agregar un control con funguicida. El crecimiento promedio que manifestó el hongo en cada tratamiento se presenta en la Figura 17. En este ensayo los diámetros de crecimiento más altos son de 4.74 cm, 4.71 cm y 4.59 cm que pertenecen a los tratamientos E, F y D respectivamente. Se debe mencionar que tanto el tratamiento E como el F presentan el mismo rango por lo que su efecto estadísticamente es el mismo a pesar de que los diámetros en cada uno sean diferentes. El menor crecimiento se presentó en el control con funguicida (tratamiento B) con un diámetro en promedio de 1.12 cm. También es necesario mencionar que el diámetro promedio en el control con agua es de 3.51 cm, si bien estadísticamente el efecto de este tratamiento es diferentes al de los tratamientos: C, G, H y I, los valores promedios que tienen estos últimos no difieren en gran medida del control con agua. El CV en este caso fue de 1.30% por lo que se puede mencionar que la variación de los datos se encuentra dentro del rango establecido para ensayos en condiciones de laboratorio.

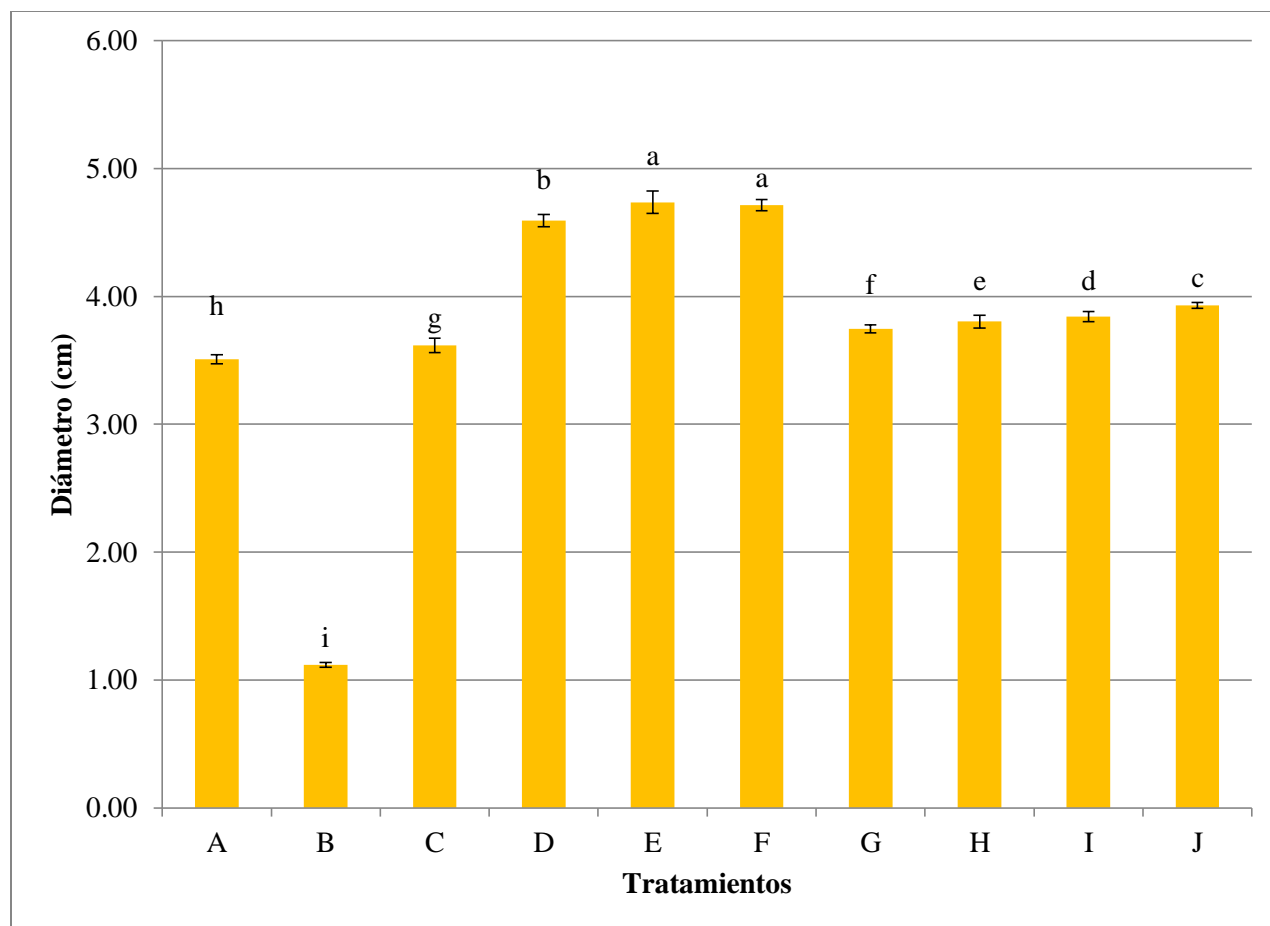


Figura 17. Evaluación del efecto de soluciones en base al extracto de saponina evaporado (CE) sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (A=0 ppm, B sportak=3000 ppm, C=3000 ppm, D=5000 ppm, E=10000 ppm, F=15000 ppm, G=20000 ppm, H=300000 ppm, I=40000 ppm, J=1000000 ppm)

Tabla 9. Análisis estadístico del diámetro en el ensayo #3 con *Fusarium oxysporum*: (a) ANOVA y (b) Prueba de Tukey

a.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Tratamientos	8	57.69	7.21	3069.37*	2.15
E.E	45	0.11	0.002		
TOTAL	53	57.80			

*sig.($p < 0.05$); CV=1.30%

b.

Tratamiento	Media	Rango
B	1.12±0.02	i
A	3.51±0.03	h
C	3.62±0.06	g
G	3.75±0.03	f
H	3.80±0.05	e
I	3.84±0.04	d
J	3.93±0.02	c
D	4.59±0.05	b
F	4.71±0.04	a
E	4.74±0.09	a

$Q_p (p < 0.05) = 4.61$; valor Tukey = 0.0304

Finalmente, los datos generados a través de las mediciones realizadas en cada uno de los ensayos con ambos hongos se pueden encontrar en el Anexo 11. Los cálculos para generar el análisis estadístico, análisis de varianza y prueba de Tukey, que se realizaron con los datos obtenidos de las mediciones en cada ensayo se encuentran en el Anexo 12. En cada análisis estadístico se puede mencionar que existió significancia estadística en cada ensayo realizado; por lo tanto existe una diferencia en el efecto de los tratamientos aplicados a cada hongo en estudio. Por otra parte, los gráficos de la cinética de crecimiento realizados se pueden observar en el Anexo 13. Finalmente, las imágenes donde se observa el efecto sobre el crecimiento de los hongos según los diferentes tratamientos utilizados en cada uno de los tres ensayos realizados se encuentran en el Anexo 14.

7 Discusión

7.1 Análisis del contenido de saponinas del material vegetal de quinua utilizado en este estudio

Para el presente estudio, y antes de comenzar con los ensayos *in vitro* de crecimiento fúngico, se caracterizó el contenido de saponinas obtenido del material de quinua (dulce y amarga) utilizando el método de espectrofotometría con el reactivo Liebermann-Burchard.

Aquí, el contenido de saponina del extracto no concentrado de quinua amarga fue de 0.07 mg/ml lo que en términos de porcentaje fue de 0.16%. En el estudio de Nieto (1992) realizado por INIAP se caracterizaron diferentes compuestos presentes en variedades amargas de quinua en el Ecuador. Los datos presentados para el porcentaje de saponina presente en la variedad INIAP-Ingapirca fue de 0.17%. En ambos estudios se observa un porcentaje de saponina similar lo cual permite asumir que la quinua recolectada en la comunidad de Zuleta y utilizada para esta investigación fue de tipo amargo. Adicional a lo mencionado anteriormente, INIAP en el boletín No.187 hace referencia a que una quinua se considera amarga si su contenido de saponina sobrepasa el 0.11% (Peralta, 1986).

En un estudio donde se realizó una evaluación agronómica de variedades comerciales de quinua dulce en el Ecuador se presentaron datos de las variedades con bajo contenido de saponina. Una de las variedades en estudio fue INIAP-Pata de Venado donde se obtuvo un valor de 0.06% de saponina (Mina, 2014). En el presente estudio, la cuantificación de saponina del extracto de quinua dulce (INIAP-Pata de Venado) presentó un valor de 0.02 mg/ml lo que en términos de porcentaje representa un 0.04%. Al comparar ambos estudios se observa que los valores se encuentran muy cercanos entre sí a pesar de que estos no sean iguales. Esta diferencia que existe entre los porcentajes de saponina obtenidos puede deberse al método de cuantificación utilizado

en cada estudio ya que en el trabajo de Mina (2014) se estimó la cantidad de este compuesto por medio de la prueba de la espuma, mientras que en la presente investigación se lo realizó a través de espectrofotometría.

7.2 Evaluación de la metodología de extracción de saponinas de la quinua

Para la extracción de saponinas existen varios métodos físico-químicos. Entre los métodos utilizados se encuentra la extracción por lavado o agitación, soxhlet, con altas presiones y por microondas. En el estudio de Gianna (2013) se realizó un análisis comparativo de las mencionadas metodologías de extracción de saponinas del grano de quinua. Los resultados obtenidos mostraron que la extracción utilizando microondas y soxhlet lograron los mayores porcentajes de saponina extraída, con 91.7% y 90.3% de recuperación respectivamente. El parámetro que diferencia ambas metodologías es el período de tiempo necesario para la extracción que en el caso del soxhlet fue de 390 minutos, mientras que utilizando microondas fue de 20 minutos. Si bien ambas metodologías lograron extraer prácticamente la misma cantidad de saponina, el factor tiempo de extracción tuvo un peso significativo en la elección del método utilizado en la actual investigación.

Por otra parte, en el estudio de Miranda et al. (2014) se evaluaron seis ecotipos de quinua amarga provenientes de Chile. Una de las variables a cuantificar fue el porcentaje de saponina en el grano de quinua. Los resultados de esa cuantificación mostraron que los seis cultivares de quinua chilena presentan un porcentaje de saponina en un rango que va desde 0.84% hasta 2.91%. Cabe mencionar que la saponina fue extraída con etanol al 50% y los extractos fueron concentrados a una temperatura de 40°C a presión reducida. En la investigación actual los extractos concentrados por liofilización y por evaporación presentaron un porcentaje de 0.98% y 0.94%, respectivamente. Al ser comparados los resultados puede observarse que la cantidad de saponina

en la quinua ecuatoriana se encuentra dentro del rango que presenta el estudio de Miranda et al (2014). El tipo de quinua que se utiliza en cada estudio, así como también la metodología de extracción y concentración utilizada pueden ser factores que expliquen la diferencia en los porcentajes obtenidos.

7.3 Evaluación del contenido de proteína en los extractos de saponina

Después de la extracción de saponinas por medio del método de microondas utilizando isopropanol al 20%, se evaluó el contenido de proteínas, las que podrían influir sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos en este estudio.

El grano de quinua contiene varios compuestos incluyendo proteína de origen vegetal. En el trabajo de Vega et al. (2012) se realizó un análisis e identificación de la proteína presente en los cultivares de quinua provenientes de Chile, utilizando el método de Kjeldahl con un factor de conversión de 6.25. Los resultados muestran que en promedio la quinua contiene 13.22% de proteína. Con referencia a las variedades de quinua en Ecuador se realizó un estudio de obtención y caracterización de aislados proteicos de quinua. El porcentaje de proteína encontrado en ese estudio varían entre 13.59% y 14.23% (Cuadrado, 2012). Tomando como punto de referencia ambos estudios mencionados anteriormente donde se presentan valores muy similares a pesar de que se trate de quinuas diferentes.

En el presente estudio, la cantidad de proteína obtenida del extracto no concentrado fue de 0.064%, como se observa claramente existe una amplia diferencia entre el valor obtenido en la presente investigación en comparación con los valores antes mencionados. Este contraste en las cantidades de proteína presente en una solución muestra que la metodología de extracción de saponina utilizada en esta investigación no produce una extracción de proteína significativa al

mismo tiempo. Además, después del proceso de concentración por evaporación a 86°C, existe la posibilidad de desnaturalización de la proteína. Por lo tanto, se asume que la proteína y subproductos en el grano de quinua no juegan un rol influyente en este estudio; por lo tanto, también sobre la evaluación del crecimiento de los fitopatógenos en medios con extractos de quinua.

7.4 Evaluación del efecto *in vitro* en el crecimiento de los fitopatógenos de banano

Los ensayos realizados sobre la evaluación del crecimiento de *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* en medios con extractos de saponinas muestran que las saponinas no poseen una total propiedad inhibitoria ni estimulante en el crecimiento y desarrollo de estos microorganismos bajo estudio, ya que depende de la concentración del extracto de saponinas de la quinua. Así mismo, se encontró que a mayor concentración hubo una promoción del crecimiento fúngico (Figura 11 y 15).

Los efectos inhibitorios pueden ser discutidos a través del estudio realizado por Apalaza (2002), donde se analizó el efecto que producían varios productos comerciales a base de saponinas del quillay (*Quillaja saponaria*) sobre la incidencia y severidad de oídio en pepino y zapallo. Los resultados presentados en esa investigación muestran que estos productos causan un porcentaje de inhibición promedio de 37.9% y 41.7% para pepino y zapallo, respectivamente. La diferencia que se presenta en la capacidad inhibitoria de ambas investigaciones podría darse debido a que los microorganismos en cada estudio son diferentes, además que en el estudio de Apalaza (2002) los ensayos se los realizó en invernadero mientras que la presente investigación fue realizada *in vitro* en el laboratorio.

En otra investigación realizada por López (2006) se utilizó extractos de: llantén (*Plantago major*), pronto alivio (*Lipia alba*) y helecho marranero (*Pteridium aquilinum*) para evaluar su efecto sobre *Collectotrichum musae* y *Botrytis cinerea*. Por medio de una caracterización de metabolitos secundarios en estas plantas medicinales se observó que dentro de estos se encuentran saponinas. En este caso los extractos etanólicos de las tres especies tuvieron un control exitoso de las enfermedades fúngicas mencionadas, pero este efecto fue gracias al etanol, ya que el control con solvente puro mostró el mismo efecto inhibitorio. En cambio, los extractos acuosos no mostraron efecto de inhibición en el crecimiento de ambos hongos patógenos. En comparación con los resultados de la presente investigación se podría mencionar que el efecto es similar, ya que en ambos casos las soluciones con saponinas, si bien son de diferente origen, no presentan inhibición favorable para el control de enfermedades fúngicas.

La saponina proveniente de una misma especie vegetal puede causar un efecto diferente dependiendo del hongo utilizado para su aplicación. Esta particularidad se ve reflejada en la investigación de Lanzotti (2011) donde se utilizó saponina extraída de la cebolla blanca (*Allium cepa*) para aplicarla *in vitro* en varias especies de hongos aislados, tanto del suelo como foliares. Se encontró que este extracto de saponina brindaba un porcentaje promedio de inhibición tan solo del 10% y 15% en *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* y *Aspergillus niger*, respectivamente; mientras que en el caso de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* la solución de saponina causó una inhibición promedio del 70% y 65% respectivamente. El comportamiento que presentó el hongo *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* en el estudio mencionado anteriormente puede ser comparado con el presentado por *Fusarium oxysporum* en la presente investigación. Los comportamientos bastante similares de ambos hongos frente a aplicaciones de

saponinas pueden servir como punto de partida para plantearse una posible resistencia de este patógeno a la molécula utilizada.

Finalmente, la saponina no solo ha sido aplicada en hongos sino también se ha realizado estudios para observar su efecto en bacterias. En la investigación de Miranda (2014) se observa el efecto que tiene esta sustancia extraída de cultivares de quinua en Chile sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos en esa investigación mostraron que estos extractos provenientes de quinua poseen un potencial antibacteriano prometedor. Los porcentajes promedio de inhibición tanto para *E. coli* como para *S. aureus* fueron de 80% y 65% respectivamente. En contraste, los resultados obtenidos en la presente investigación con enfermedades fúngicas, con los presentados anteriormente en el estudio con microorganismos de tipo bacteriano, abren la posibilidad de que la saponina proveniente de quinua puede tener una propiedad antibacteriana mas no una antifúngica.

Por otro lado existe un efecto en la promoción de crecimiento de los hongos por acción de las saponinas. En la investigación de Nicol et al. (2003) se muestra que las saponinas aisladas del ginseng (*Panax quinquefolius*) causan una estimulación en el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora cactorum* y *Pythium irregulare*. El efecto observado se explica a través de la posibilidad de que los microorganismos mencionados posean la capacidad de desintoxicar las saponinas del ginseng o a su vez utilizar estos compuestos como una fuente nutritiva para su desarrollo. Por ende, se podría pensar que las saponinas actúan como estimuladores alelopáticos en ciertos microorganismos patógenos.

Los hongos patógenos de genero *Fusarium* podrían tener la capacidad de utilizar las saponinas como una fuente nutritiva para su crecimiento, como lo explica Jiao et al. (2015) en su

investigación. Se realizó una evaluación del crecimiento *in vitro* con *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en medios de cultivo adicionados con saponinas del ginseng. Los resultados mostraron que las cantidades de saponina en el medio, luego del desarrollo del hongo fueron significativamente menores, lo cual explicaría que el patógeno tiene una capacidad de degradar estas sustancias para su beneficio. Por lo tanto, se podría asumir que este comportamiento también se presenta en la actual investigación con el hongo *Fusarium oxysporum* aislado del banano.

La capacidad de los hongos para desintoxicar la molécula de saponina se evidencia en la investigación de Morrissey et al. (2000), donde se analizó el mecanismo por el cual el hongo *Stagonospora avenae* tiene la capacidad de infectar cultivares de avena a pesar de la presencia de saponinas en este cultivo. Los resultados mostraron que este patógeno puede realizar una hidrólisis secuencial al degradar la molécula retirando el azúcar de la L-ramosa lo cual suprime la actividad antifúngica de la saponina. En otra investigación realizada en avena por Osbourn et al. (2006) se demostró que el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae* produce una enzima llamada avenacinasa, la cual se encarga de oxidar el glucósido de la molécula de saponina; es decir, esta enzima producida por el patógeno desintoxica la saponina de la avena por medio de glicólisis. Finalmente, Bouarab et al. (2002) en su investigación plantea la posibilidad de que los subproductos resultantes de la degradación enzimática de la saponina no solo perderían su capacidad antifúngica sino que estos llegarían a suprimir las respuestas de defensa en la planta al interferir con los procesos de traducción de señales fundamentales que conducen a la resistencia a enfermedades fúngicas. En base a las investigaciones mencionadas anteriormente, se puede pensar que tanto *Cercospora fijiensis* como *Fusarium oxysporum* estarían produciendo una

degradación enzimática, por hidrólisis o glicólisis, de la saponina de la quinua con el fin de eliminar la toxicidad de esta molécula.

8 Conclusiones

- La quinua recolectada en la localidad de Zuleta y utilizada en esta investigación presentó una cantidad de saponina que permite clasificarla dentro del grupo de quinuas amargas.
- Los métodos de concentración que demostraron mayor eficiencia para obtener una solución con la mayor cantidad de saponina fueron: evaporación y liofilización.
- El extracto de quinua no presentó cantidades significativas de proteína, por lo tanto el solvente (isopropanol al 20%) utilizado extrajo saponina en su mayoría.
- A través del aislamiento de hongos de las hojas del banano se pudo encontrar e identificar 4 hongos: *Fusarium oxysporum*, *Cercospora fijiensis*, *Cordana musae* y *Collectotrichum musae*.
- El crecimiento *in vitro*, tanto de *Cercospora fijiensis* como de *Fusarium oxysporum*, se promovió en los extractos puros de saponina concentrada.
- El hongo *Cercospora fijiensis* mostró un menor crecimiento en los medios con el extracto concentrado de quinua a concentraciones de 100 ppm a 500000 ppm; mientras que, desde 500000 ppm a 1000000 ppm existió un aumento en su crecimiento fúngico durante los diferentes ensayos realizados.
- El hongo *Fusarium oxysporum* demostró una aceleración en su crecimiento a causa del extracto concentrado a partir de una concentración de 1000 ppm y mostró una

disminución en el crecimiento en concentración de 100 ppm a 500 ppm. De 5000 ppm a 15000 ppm existió un pico significativo de crecimiento fúngico.

9 Recomendaciones

- Se recomienda utilizar como fuente de saponina otros cultivares de quinuas amargas que posean mayor cantidad de esta sustancia.
- Realizar la extracción de saponina utilizando otros métodos que varíen tanto en la ausencia de la molienda previa del grano como en la temperatura de extracción, siendo esta última menor.
- Hacer las diferentes concentraciones de los extractos de quinua utilizando otros métodos de concentración para de ese modo obtener saponina con mayor pureza.
- Se recomienda realizar la cuantificación de saponina mediante métodos que posean mayor exactitud en la medición de la cantidad de este tipo de moléculas como lo son los métodos cromatográficos, por ejemplo HPLC.
- Se debe realizar secuenciamientos de los hongos aislados del banano para confirmar los resultados obtenidos en la microscopía.
- Evaluar el efecto de la saponina en otros hongos patógenos que afectan a otros cultivos para la evaluación de crecimiento fúngico.
- Como se observó un potencial inhibitorio de la saponina en el estudio de Miranda (2014), se recomienda evaluar el efecto de esta molécula en microorganismos de tipo bacteriano que afectan a los cultivos.

- Se recomienda ampliar la investigación del posible efecto de la saponina sobre la estimulación de la síntesis del mensajero secundario AMP cíclico.
- Se debe continuar con la investigación sobre los mecanismos por los que el hongo elimina la capacidad toxica de la molécula de saponina.
- Investigar sobre otros mecanismos por los cuales existe una inhibición y promoción de crecimiento dependiente de la concentración de saponinas.

10 Bibliografía

- Aguilar, R. (2013). Hongos Asociados en la Pudrición de la Corona en Frutos de Banano. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 81-88.
- Alonso, S. (2009). *Producción de Saponinas Triterpénicas in vitro*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Álvarez, E. (2013). *Guía para el Reconocimiento y Manejo de Sigatoka Negra en Banano*. Cali: CIAT.
- Apablaza, G. (2002). Control de Oidio de la Cucurbitáceas con Saponinas Presentes en Extractos de Quillay. *Ciencia e Investigación Agrícola*, 8390.
- Augstburger, F. (2001). *Agricultura en el Trópico y Subtrópico: Banano*. Alemania: Naturland.
- Avalos, C. (2009). El Polémico Uso de Agroquímicos. *Generación*, 10-15.
- Baluart, F. (2012). Buena química con la minería. *Minería Chilena*, 7-9.
- Bernards, M. (2008). The allelopathic potencial of ginsenosides. *Biological Control of Olan Pathogens and Diseases*, 157-175.
- Bornacelly, H. (2009). *Estudio del Ciclo de Vida de la sigatoka negra*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Bouarab, K. (2002). A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature*, 76-98.
- Cordovéz, V. (2014). *Secado por Liofilización*. España: Universidad de Granada.
- Cuadrado, S. (2012). *La quinua en el Ecuador situación actual y su industrialización*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Delgado, M. (2012). Arabidopsis heterotrimeric G-protein regulates cell wall defense and resistance to necrotrophic fungi. *Molecular Plant*, 98-114.

- Emmer, M. (2000). Cyclic AMP Receptor Protein of *E. coli*: Its Role in the Synthesis of Inducible Enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 480-487.
- Espinosa, V. (2008). Efecto del extracto de *Yucca schidigera* en el perfil bioquímico y hemático de cerdos en crecimiento y engorde. *FCV-LUZ*, 51-58.
- Fagiani, M. J. (2012). *Ficha técnica del cultivo de banano*. Jujuy: INTA.
- FAO. (2012). *Aumenta la importación de agroquímicos en Ecuador*. Ecuador: FAO America Latina.
- FAO. (2013). Manual de Fungicidas e Insecticidas Ecológicos. *EcoTenda*, 42-64.
- Farrera, R. (2004). Acerca de los Plaguicidas y su Uso en la Agricultura. *CENIAP HOY*, 23-30.
- Fernández, C. (2002). Biopesticidas y la Agricultura del Futuro. *FuturEco*, 14-19.
- Fernández, E. (2013). *Métodos para la cuantificación de proteínas*. España: Universidad de Córdoba.
- Fernández, G. (2002). Biopesticidas. *Phytoma*, 14-19.
- Garcés, E. (2001). *Fusarium oxysporum*: El Hongo que nos Falta Conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 7-25.
- Gianna, V. (2013). *Extracción, Cuantificación y Purificación de Saponinas de Semillas de Quinoa*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.
- Gonzabay, R. (2013). *Cultivo de Banano en el Ecuador*. Quito: AFESE.
- González, A. (2013). *Extracción y cuantificación de proteínas vegetales*. Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes.
- González, S. (2010). *Evaluación de la Eficiencia de Fungicidas Naturales y Químicos*. Tenerife: Universidad de Tenerife.
- Guerra, J. (2008). *Saponinas Esteroides de la Planta de Agave*. España: Universidad de Cadiz.

- Guerrero, M. (2010). *Guía técnica del cultivo de banano*. El Salvador: CENTA.
- Hidalgo, M. (2006). Efecto de la sigatoka negra sobre la Fotosíntesis en Cultivo de Banano. *Agronomía Costarricense*, 35-41.
- INEC. (2009). *Análisis del Sistema Agroalimentario del Banano en el Ecuador*. Ecuador.
- Jacome, A. M. (2011). *Aumento de Agroquímicos Naturales en Ecuador*. Guayaquil: ESPOL.
- Jiao, X. (2015). Effects of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* Infection on the Metabolism of Ginsenosides in America Ginseg Roots. *Molecules*, 535-552.
- Lanzotti, V. (2011). Antifungal saponins from bulbs of white onion. *Phytochemistry*, 133-139.
- Lei, F.-J. (2010). Allelopathic effects of ginsenosides on in vitro growth and antioxidant enzymes activity of ginseng callus. *Allelopathy Journal* , 13-22.
- López, A. (2006). Evaluación de Extractos Vegetales para Manejo de Hongos Patógenos en Banano y Fresa Almacenados. *Acta Agron*, 39-44.
- Luengo, M. (2001). Saponósidos: Ámbito Farmacéutico. *Fitoterapia*, 124-128.
- Martínez, A. (2001). *Saponinas Esteroides*. Antioquia: Universidad de Antioquia.
- Martínez, I. (2011). *Manejo de sigatoka negra en Cultivo de Banano*. Costa Rica: CORBANA.
- Martínez, L. (2013). *Mal de Panama: Fusarium oxysporum*. México DF: SAGAPRA.
- Meyhuay, M. (2010). *Operaciones Poscosecha de Quinua*. Lima: FAO.
- Mina, D. (2014). *Evaluación agronómica de líneas F5 de quinua en dos localidades de la sierra en Ecuador*. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Miranda, M. (2014). Antimicrobial potencial and phytochemical content of six diverse sources of quinoa seeds. *Agricultural Sciences*, 1015-1024.
- Monteros, C. (2005). *INIAP-Pata de Venado Nueva variedad de quinua*. Quito: INIAP.

- Morrissey, J. (2000). Stagonospora avenae secretes multiple enzymes that hydrolyze oat leaf saponins. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 1041-1052.
- Nicol, R. (2003). Ginsenosides stimulate the growth of soilborne pathogens of American ginseng. *Phytochemistry*, 257-264.
- Nieto, C. (1992). *INIAP-Ingapirca e INIAP-Tunkahuan*. Quito: INIAP.
- Olivera, Z. (15 de Octubre de 2013). Innovador uso de la quinua en la industria cosmética. *Los Andes*, pág. 4.
- Orozco, M. (2008). Prácticas Culturales para el Manejo de la sigatoka negra en Banano. *Tropical Plant Pathology*, 189-196.
- Osbourn, A. (2003). Saponins in cereals. *Phytochemistry*, 1-4.
- Osbourn, A. (2006). Fungal pathogens of oat roots and tomato leaves employ closely related enzymes to detoxify different host plant saponins. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 971-978.
- Pallás, V. (2008). *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología*. México: Mundi-Prensa.
- Peralta, E. (1986). *INIAP-Imbaya e INIAP Cochasqui Primeras variedades de quinua para la sierra ecuatoriana*. Quito: INIAP.
- Pérez, D. (2002). Etnobotánica medicinal y biocidas para malaria en la región Ucayali. *Folia Amazónica*, 87-108.
- Rivera, O. (2011). *Uso de Bioplaguicidas en la Agricultura Orgánica*. Brasil: BioAtlántica.
- Rodríguez, M. (2012). *Mal de Panamá: Medidas de Control y Prevención*. Tenerife: Cabildo de Tenerife.
- Rossi, D. (2013). *Los Agroquímicos usados en Las Plantaciones Bananeras y sus Efectos en el Agua, la Gente, y el Ambiente*. Lehigh University: Department of Earth and Environmental Science.

- Sotomayor, I. (2012). *Mal de Panamá: Amenaza Potencial para la Industria Bananera del Ecuador*. Quevedo: INIAP.
- Townsend, B. (2006). Saponin Glycosylation in Cereals. *Phytochemistry*, 109-114.
- Vega, A. (2012). Nutricional aspects of six quinoa ecotypes from three geographical areas of Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 175-181.
- Ventura, C. (2010). *Los Compuestos Esteroidales o Saponinas*. México: Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Vicente, L. P. (2009). Enfermedades de banano y plátano. *Producción Agropecuaria*, 11-18.
- West, D. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. Madrid: Thomson.
- Yugcha, E. (2012). *Zonificación agroecológica del cultivo de banano en el Ecuador*. Quito: MAGAP.

11 Anexos

Anexo 1. Requerimientos agroecológicos de la planta de banano

Parámetro	Rango
Pendiente	Planos a Ligeramente inclinados
Profundidad	Profundos
Textura	Franco, limoso, arcilloso, franco arcilloso, franco arenoso, franco limoso
Pedregosidad	Muy Poca
pH	5.5 - 7.5 (pH neutro)
Salinidad	No salino
Toxicidad	Nula
Nivel de fertilidad	Alta a Media
Drenaje	Bien drenado
Precipitación	1200 – 4000 mm al año
Temperatura	>20 ⁰ C (temp. media anual)
Períodos de humedad	185 – 195 días al año

(Yugcha, 2012)

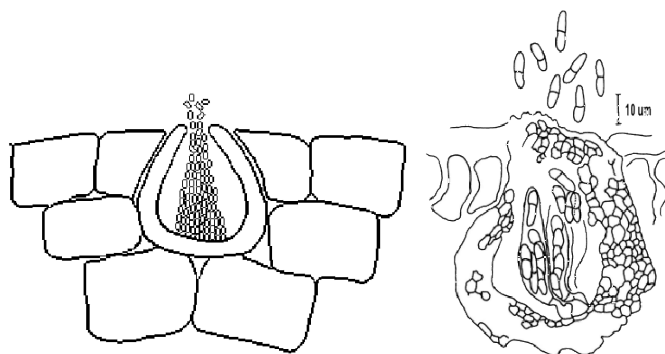
Anexo 2. Diferentes variedades de banano, características y genotipo

VARIEDAD	CARACTERISTICAS	GENOTIPO
Sucier	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivada en Asia • Resistente a <i>Fusarium oxysporum</i> • Bajos rendimientos 	AA
Ney Poovan	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivada en Sud-India • Muy resistente a <i>Fusarium oxysporum</i> • Variedad escasamente descrita 	AB
Gros Michel	<ul style="list-style-type: none"> • Alto rendimiento • Planta de gran tamaño • Susceptible a <i>Fusarium oxysporum</i> 	AAA
Cavendish Gigante	<ul style="list-style-type: none"> • Planta de tamaño medio • Sabor del fruto débil • Frutos de mayor tamaño que en el C. enano 	
Cavendish Enano	<ul style="list-style-type: none"> • Resiste climas poco favorables • Resistente a <i>Fusarium oxysporum</i> • Susceptible a la Sigatoka 	
Lactan	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento acelerado (precocidad) • Fruto muy sensible a parásitos 	

Banano Francés	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente a <i>Fusarium oxysporum</i> • Susceptible a enfermedades bacterianas • Frutas ricas en fécula • Fruta utilizada para cocción 	AAB
Mysore	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivada en la India • Crecimiento rápido (gran tamaño) • Resistente a <i>Fusarium oxysporum</i> y bacterias 	
Silk (seda)	<ul style="list-style-type: none"> • Planta de tamaño medio • Resistente a la Sigatoka • Susceptible a <i>Fusarium oxysporum</i> 	AAB
Pome	<ul style="list-style-type: none"> • Planta de tamaño medio • Rendimiento moderado • Resistente a <i>Fusarium oxysporum</i> y Sigatoka 	
IC2	<ul style="list-style-type: none"> • Cruce de Gros Michel y <i>Musa acuminata</i> • Resistente a la Sigatoka • Tolerante a <i>Fusarium oxysporum</i> 	AAAA
Klue Teparod	<ul style="list-style-type: none"> • Única variedad natural tetraploide • Frutos color gris, textura esponjosa y sabor dulce • Resistente a varias enfermedades 	ABBB

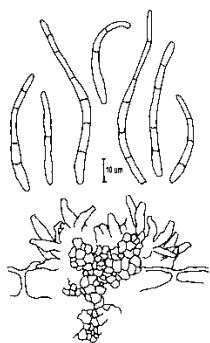
(Fagiani, 2012)

Anexo 3. Espermogonio (izq.) y pseudotecio (der.) de *Mycosphaerella fijiensis*



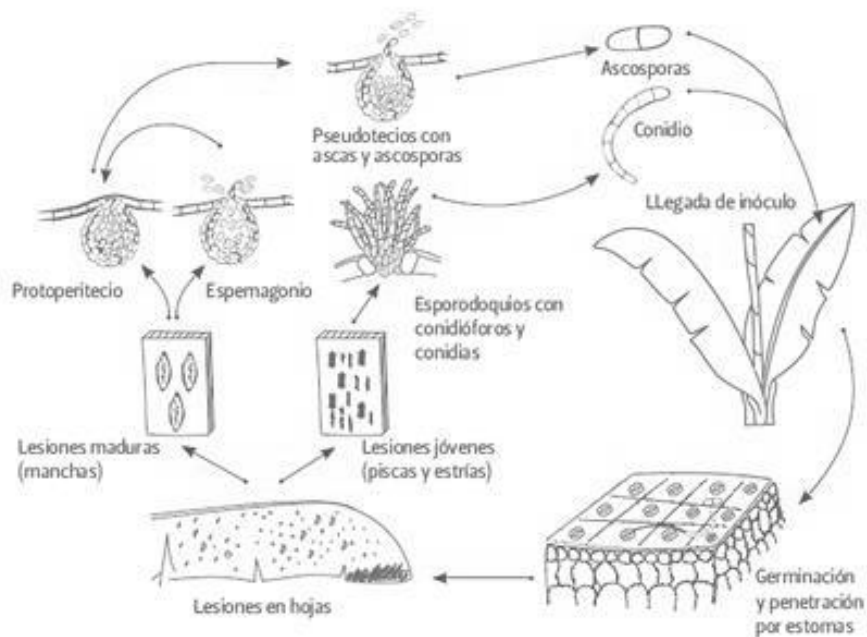
(Álvarez, 2013)

Anexo 4. Conidias de *Pseudocercospora fijiensis*



(Álvarez, 2013)

Anexo 5. Ciclo de vida de la sigatoka negra



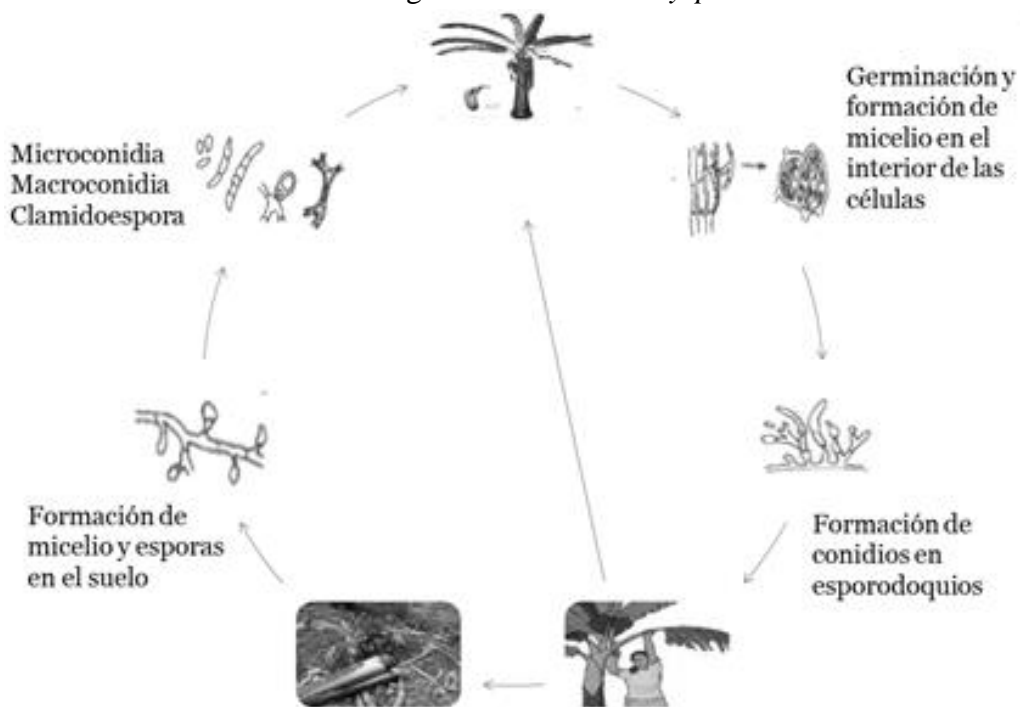
(Bornacelly, 2009)

Anexo 6. Diferentes tipos de esporas en *Fusarium oxysporum*



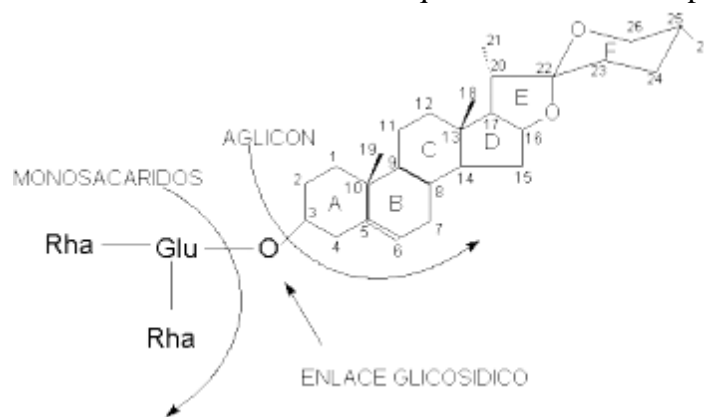
(Sotomayor, 2012)

Anexo 7. Ciclo biológico de *Fusarium oxysporum* var. *cubense*



(Garcés, 2001)

Anexo 8. Estructura molecular del esqueleto base de las saponinas



(Guerra, 2008)

Anexo 9. Mediciones de la absorbancia y concentración de saponina en cada extracto de quinua amarga: no concentrado (A), evaporado (B), liofilizado (C) y en extracto de quinua dulce: no concentrado (D)













A.	No Concentrado (Quinua Amarga)				
Medición	AM	AR	AP	AS	CS
1	0.487	0.006	0.225	0.256	0.0524
2	0.495	0.006	0.225	0.264	0.0541
3	0.511	0.006	0.225	0.399	0.0837
4	0.611	0.006	0.225	0.399	0.0837
5	0.630	0.006	0.225	0.399	0.0837
6	0.630	0.006	0.225	0.399	0.0837
				\bar{x}	0.0735
				S	0.0157

B.	Concentrado Evaporación (Quinua Amarga)				
Medición	AM	AR	AP	AS	CS
1	2.015	0.006	0.359	1.650	0.357
2	2.036	0.006	0.359	1.671	0.362
3	2.149	0.006	0.359	1.784	0.387
4	2.256	0.006	0.359	1.891	0.410
5	2.579	0.006	0.359	2.214	0.481
6	2.582	0.006	0.359	2.217	0.481
				\bar{x}	0.413
				s	0.0560

C.	Concentrado Liofilización (Quinoa Amarga)				
Medición	AM	AR	AP	AS	CS
1	2.035	0.006	0.497	1.532	0.331
2	2.574	0.006	0.497	2.071	0.449
3	2.837	0.006	0.497	2.334	0.507
4	3.000	0.006	0.497	2.497	0.543
5	3.000	0.006	0.497	2.497	0.543
6	3.000	0.006	0.497	2.497	0.543
				\bar{x}	0.486
				s	0.0840

D.	No Concentrado (Quinoa Dulce)				
Medición	AM	AR	AP	AS	CS
1	0.300	0.006	0.258	0.036	0.0043
2	0.325	0.006	0.258	0.061	0.0098
3	0.373	0.006	0.258	0.109	0.0203
4	0.379	0.006	0.258	0.115	0.0216
5	0.429	0.006	0.258	0.165	0.0325
6	0.468	0.006	0.258	0.204	0.0410
				\bar{x}	0.0216
				s	0.0137

Anexo 10. Hongos aislados a partir de hojas de banano

AISLAMIENTOS DE HONGOS			
No. Hongo	Imagen del Micelio	No. Hongo	Imagen del Micelio
A1		C2	
A2		C3	
B1		D1	
B2		D2	
B3		E1	
C1		E2	

Anexo 11. Datos obtenidos del diámetro (cm) del hongo *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* en los diferentes ensayos

Ensayo #1: <i>Cercospora fijiensis</i>		Tratamientos				
		C1 (H ₂ O)	C2	SC	CE	CL
M1 (día 4)	R1	2.10	1.70	2.40	3.30	3.80
	R2	2.00	1.75	2.45	3.80	4.00
	R3	2.10	1.90	2.40	3.50	3.90
	R4	2.05	1.75	2.40	3.40	3.85
M2 (día 8)	R1	3.40	2.60	3.20	5.40	6.45
	R2	3.30	2.61	3.19	6.15	6.35
	R3	3.45	2.67	3.20	5.80	6.70
	R4	3.40	2.60	3.20	5.80	6.40
M3 (día 12)	R1	5.50	4.20	4.75	6.90	7.90
	R2	5.30	3.90	4.70	7.10	7.80
	R3	5.50	4.25	4.80	6.85	8.10
	R4	5.50	3.90	4.75	7.00	7.85

Ensayo #2: <i>Cercospora fijiensis</i>		Tratamientos									
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
M1 (día 4)	R1	2.40	2.10	2.70	3.00	2.10	1.00	2.30	2.10	1.80	3.30
	R2	3.40	1.90	2.50	3.10	2.30	1.00	2.30	2.20	1.65	3.80
	R3	2.70	2.20	2.30	3.00	2.30	1.00	2.40	2.50	1.90	3.40
	R4	2.80	2.15	2.50	3.10	2.20	1.00	2.30	2.15	1.80	3.50
M2 (día 8)	R1	4.70	3.60	3.70	5.30	4.30	2.50	3.90	3.60	3.70	5.40
	R2	5.10	3.20	3.40	5.10	4.50	2.40	3.80	4.50	3.10	6.15
	R3	4.90	4.40	3.50	5.25	4.80	2.50	4.20	3.75	4.25	5.80
	R4	4.90	3.45	3.40	5.20	4.55	2.50	4.00	3.90	3.70	5.50
M3 (día 12)	R1	6.50	5.90	5.20	5.80	6.40	4.00	5.90	6.75	5.80	7.30
	R2	6.70	5.80	5.80	6.10	5.90	4.30	5.70	7.00	5.50	8.00
	R3	6.80	5.70	5.40	5.95	6.80	4.10	6.10	6.90	5.70	7.90
	R4	6.60	5.80	5.50	5.90	6.40	4.00	5.90	6.75	5.55	7.85

Ensayo #3: <i>Cercospora fijiensis</i>		Tratamientos							
		A	B	C	D	E	F	G	H
M1 (día 4)	R1	2.80	1.00	2.10	1.00	2.25	2.75	2.65	2.70
	R2	2.90	1.00	2.50	1.00	2.10	2.80	2.60	2.75
	R3	2.75	1.00	2.10	1.00	2.35	2.70	2.70	2.60
	R4	2.70	1.00	2.10	1.00	2.20	2.75	2.75	2.85
	R5	2.85	1.00	2.30	1.00	2.15	2.70	2.65	2.70
	R6	2.90	1.00	2.25	1.00	2.10	2.80	2.80	2.65
M2 (día 8)	R1	5.00	1.15	3.70	2.50	3.50	4.75	4.80	4.95
	R2	4.95	1.20	3.65	2.40	3.50	4.55	4.80	4.70
	R3	4.90	1.20	3.75	2.50	3.65	4.50	4.85	4.85
	R4	5.00	1.15	3.80	2.45	3.55	4.65	4.55	5.00
	R5	5.10	1.20	3.75	2.50	3.40	4.50	4.75	4.90
	R6	5.00	1.25	3.70	2.50	3.50	4.55	4.90	4.95
M3 (día 12)	R1	6.75	1.25	5.00	4.00	4.80	5.50	6.60	6.65
	R2	7.00	1.25	4.90	4.30	4.75	5.75	6.70	6.70
	R3	6.80	1.30	5.00	4.10	4.60	5.55	6.55	6.80
	R4	6.75	1.25	4.95	4.30	4.75	5.60	6.65	6.80
	R5	6.65	1.20	5.10	4.25	4.70	5.60	6.60	6.70
	R6	6.80	1.30	5.00	4.20	4.80	5.70	6.65	6.70

Ensayo #1: <i>Fusarium oxysporum</i>		Tratamientos				
		C1 (H ₂ O)	C2	SC	CE	CL
M1 (día 4)	R1	2.00	1.30	2.10	2.60	3.70
	R2	2.30	1.30	2.15	2.50	3.70
	R3	2.30	1.29	2.10	2.70	3.65
	R4	2.20	1.30	2.25	2.60	3.75
M2 (día 8)	R1	2.80	2.30	2.75	3.00	5.80
	R2	3.00	2.35	2.90	3.20	5.80
	R3	2.90	2.10	2.80	2.90	5.60
	R4	2.90	2.25	2.80	3.00	5.75
M3 (día 12)	R1	4.60	4.30	4.25	5.00	7.90
	R2	4.70	4.20	4.40	5.25	7.90
	R3	4.55	4.30	4.30	5.15	8.00
	R4	4.60	4.25	4.30	5.20	7.90

Ensayo #2: <i>Fusarium oxysporum</i>		Tratamientos									
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
M1 (día 4)	R1	2.25	2.25	2.25	2.15	2.85	2.80	2.40	2.50	2.20	2.55
	R2	2.30	2.20	2.15	2.15	2.70	2.90	2.20	2.55	2.40	2.45
	R3	2.30	2.25	2.20	2.20	2.65	2.80	2.20	2.35	2.45	2.50
	R4	2.25	2.20	2.20	2.15	2.70	2.80	2.35	2.40	2.30	2.50
M2 (día 8)	R1	2.90	2.40	3.20	3.00	4.40	4.60	3.35	3.25	3.30	2.95
	R2	2.85	2.45	3.20	3.20	4.30	4.80	3.25	3.35	3.25	2.90
	R3	2.90	2.45	3.00	3.00	4.45	4.60	3.35	3.30	3.35	3.00
	R4	2.90	2.40	3.15	3.00	4.35	4.70	3.30	3.20	3.25	3.00
M3 (día 12)	R1	4.60	3.25	3.40	4.85	6.70	6.60	5.25	4.85	4.75	5.00
	R2	4.65	3.30	3.40	4.80	6.60	6.80	5.20	4.80	4.90	5.25
	R3	4.60	3.25	3.50	4.85	6.60	6.70	5.20	4.80	5.00	5.15
	R4	4.60	3.30	3.40	4.85	6.75	6.65	5.20	4.80	4.85	5.15

Ensayo #3: <i>Fusarium oxysporum</i>		Tratamientos								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
M1 (día 4)	R1	2.25	1.00	2.30	2.90	2.80	2.75	2.20	2.30	2.40
	R2	2.30	1.00	2.20	2.70	2.90	2.85	2.20	2.25	2.25
	R3	2.30	1.00	2.25	2.75	2.80	2.85	2.15	2.40	2.30
	R4	2.30	1.00	2.30	2.85	2.80	2.85	2.30	2.25	2.25
	R5	2.25	1.00	2.40	2.70	2.90	2.90	2.25	2.30	2.30
	R6	2.25	1.00	2.35	2.65	2.90	2.75	2.20	2.20	2.20
M2 (día 8)	R1	3.20	1.10	3.25	4.40	4.60	4.45	3.40	3.50	3.45
	R2	3.15	1.15	3.30	4.30	4.80	4.55	3.50	3.50	3.50
	R3	3.15	1.10	3.30	4.45	4.60	4.50	3.50	3.65	3.50
	R4	3.15	1.10	3.40	4.30	4.40	4.65	3.50	3.60	3.60
	R5	3.15	1.15	3.35	4.35	4.70	4.70	3.45	3.45	3.65
	R6	3.20	1.10	3.40	4.45	4.65	4.65	3.50	3.40	3.50
M3 (día 12)	R1	4.95	1.25	5.25	6.70	6.55	6.80	5.55	5.60	5.75
	R2	5.00	1.30	5.10	6.60	6.80	6.65	5.50	5.60	5.65
	R3	5.20	1.20	5.20	6.60	6.70	6.70	5.65	5.65	5.70
	R4	5.00	1.25	5.20	6.65	6.70	6.80	5.60	5.50	5.70
	R5	5.20	1.25	5.25	6.60	6.85	6.70	5.50	5.60	5.75
	R6	5.15	1.20	5.30	6.70	6.80	6.75	5.50	5.70	5.70

Anexo 12. Cálculo de los componente del ANOVA y prueba de Tukey con los datos obtenidos del diámetro en los ensayos con *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum*

Ensayo #1: *Cercospora fijiensis*

Repeticiones	Tratamientos				
	C1 (H ₂ O)	C2	SC	CE	CL
R1	3.67	2.83	3.45	5.20	6.05
R2	3.53	2.75	3.45	5.68	6.05
R3	3.68	2.94	3.47	5.38	6.23
R4	3.65	2.75	3.45	5.40	6.03

s	0.07	0.09	0.01	0.20	0.09
ΣXi	14.53	11.28	13.81	21.67	24.37
\bar{Xi}	3.63	2.82	3.45	5.42	6.09
$(\Sigma Xi)^2$	211.22	127.16	190.81	469.44	593.73
ΣXi^2	52.82	31.81	47.70	117.48	148.46
Yi^2	1592.37				
Yij^2	398.28				
Yij	85.66				
\bar{X}	4.28				
FC	366.85				

CV	2.59%
$S_{\bar{x}}$	0.025
S_d	0.035

Ensayo #2: *Cercospora fijiensis*

Repeticiones	Tratamientos									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	4.53	3.87	3.87	4.70	4.27	2.50	4.03	4.15	3.77	5.33
R2	5.07	3.63	3.90	4.77	4.23	2.57	3.93	4.57	3.42	5.98
R3	4.80	4.10	3.73	4.73	4.63	2.53	4.23	4.38	3.95	5.70
R4	4.77	3.80	3.80	4.73	4.38	2.50	4.07	4.27	3.68	5.62

s	0.22	0.19	0.07	0.03	0.18	0.03	0.12	0.18	0.22	0.27
ΣXi	19.17	15.40	15.30	18.93	17.52	10.10	16.27	17.37	14.82	22.63
\bar{Xi}	4.79	3.85	3.83	4.73	4.38	2.53	4.07	4.34	3.70	5.66
$(\Sigma Xi)^2$	367.36	237.16	234.09	358.47	306.83	102.01	264.60	301.60	219.53	512.27
ΣXi^2	91.98	59.40	58.54	89.62	76.81	25.51	66.20	75.50	55.03	128.28

Y_i^2	2903.93
Y_{ij}^2	726.86
Y_{ij}	167.50
\bar{X}	4.19
FC	701.41

CV	4.09%
$S_{\bar{x}}$	0.0271
S_d	0.0383

Ensayo #3: *Cercospora fijiensis*

Repeticiones	Tratamientos							
	A	B	C	D	E	F	G	H
R1	4.85	1.13	3.60	2.50	3.52	4.33	4.68	4.77
R2	4.95	1.15	3.68	2.57	3.45	4.37	4.70	4.72
R3	4.82	1.17	3.62	2.53	3.53	4.25	4.70	4.75
R4	4.82	1.13	3.62	2.58	3.50	4.33	4.65	4.88
R5	4.87	1.13	3.72	2.58	3.42	4.27	4.67	4.77
R6	4.90	1.18	3.65	2.57	3.47	4.35	4.78	4.77

s	0.05	0.02	0.05	0.03	0.04	0.05	0.05	0.06
ΣX_i	29.20	6.90	21.88	15.33	20.88	25.90	28.18	28.65
\bar{X}_i	4.87	1.15	3.65	2.56	3.48	4.32	4.70	4.78
$(\Sigma X_i)^2$	852.64	47.61	478.88	235.11	436.11	670.81	794.30	820.82
ΣX_i^2	142.12	7.94	79.82	39.19	72.70	111.81	132.39	136.82
Y_i^2	4336.29							
Y_{ij}^2	722.79							
Y_{ij}	176.93							
\bar{X}	3.69							
FC	652.20							

CV	1.20%
$S_{\bar{x}}$	0.00640
S_d	0.00905

Ensayo #1: *Fusarium oxysporum*

Repeticiones	Tratamientos				
	C1 (H ₂ O)	C2	SC	CE	CL
R1	3.13	2.63	3.03	3.53	5.80
R2	3.33	2.62	3.15	3.65	5.80
R3	3.25	2.56	3.07	3.58	5.75
R4	3.23	2.60	3.12	3.60	5.80

s	0.08	0.03	0.05	0.05	0.02
ΣXi	12.95	10.41	12.37	14.37	23.15
\bar{Xi}	3.24	2.60	3.09	3.59	5.79
$(\Sigma Xi)^2$	167.70	108.44	152.93	206.40	535.92
ΣXi^2	41.95	27.11	38.24	51.61	133.98
Yi^2	1171.40				
Yij^2	292.89				
Yij	73.25				
\bar{X}	3.66				
FC	268.25				

CV	1.41%
$S_{\bar{x}}$	0.0115
S_d	0.0163

Ensayo #2: *Fusarium oxysporum*

Repeticiones	Tratamientos									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	3.25	2.63	2.95	3.33	4.65	4.67	3.67	3.53	3.42	3.50
R2	3.27	2.65	2.92	3.38	4.53	4.83	3.55	3.57	3.52	3.53
R3	3.27	2.65	2.90	3.35	4.57	4.70	3.58	3.48	3.60	3.55
R4	3.25	2.63	2.92	3.33	4.60	4.72	3.62	3.47	3.47	3.55

s	0.0096	0.0096	0.0210	0.0236	0.0498	0.0725	0.0498	0.0459	0.0782	0.0236
ΣXi	13.03	10.57	11.68	13.40	18.35	18.92	14.42	14.05	14.00	14.13
\bar{Xi}	3.26	2.64	2.92	3.35	4.59	4.73	3.60	3.51	3.50	3.53
$(\Sigma Xi)^2$	169.87	111.65	136.50	179.56	336.72	357.84	207.84	197.40	196.00	199.75
ΣXi^2	42.47	27.91	34.13	44.89	84.19	89.48	51.97	49.36	49.02	49.94
Yi^2	2093.14									
Yij^2	523.35									
Yij	142.55									
\bar{X}	3.56									
FC	508.01									

CV	1.26%
$S_{\bar{x}}$	0.00710
S_d	0.01004

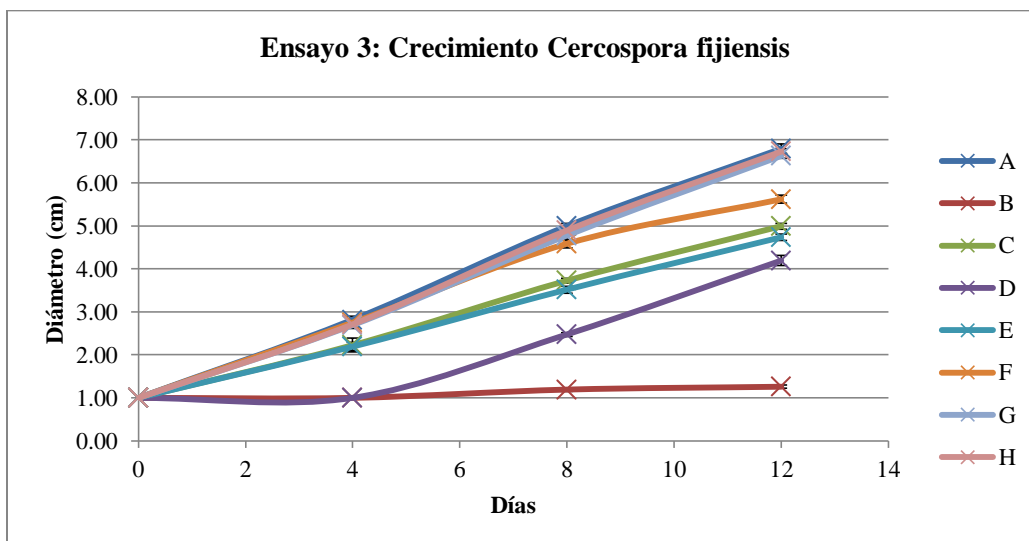
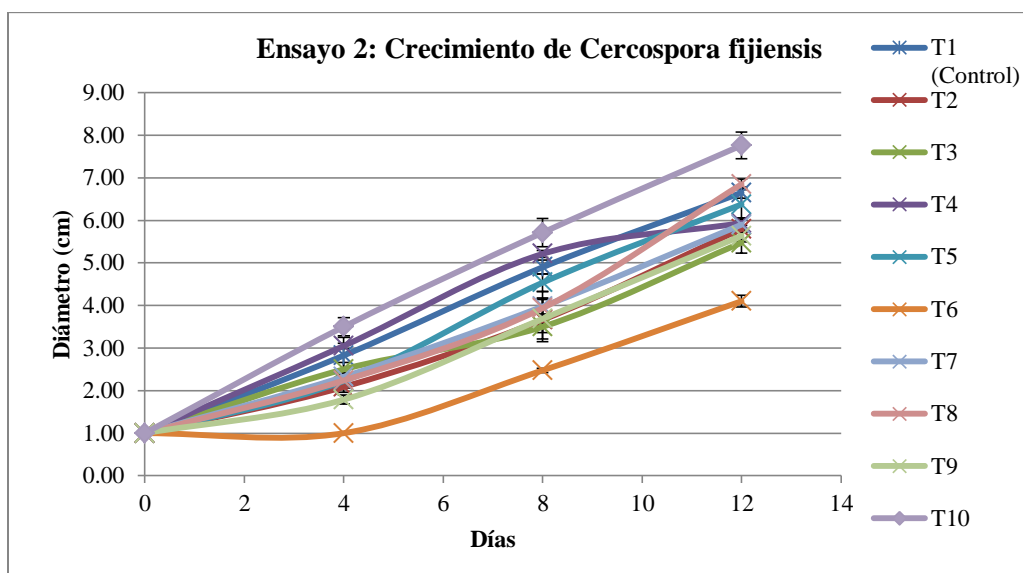
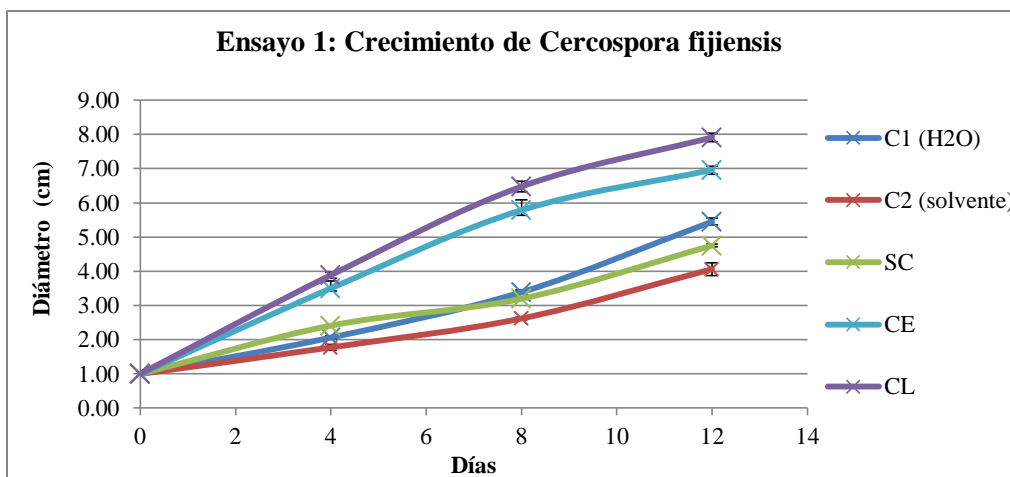
Ensayo #3: *Fusarium oxysporum*

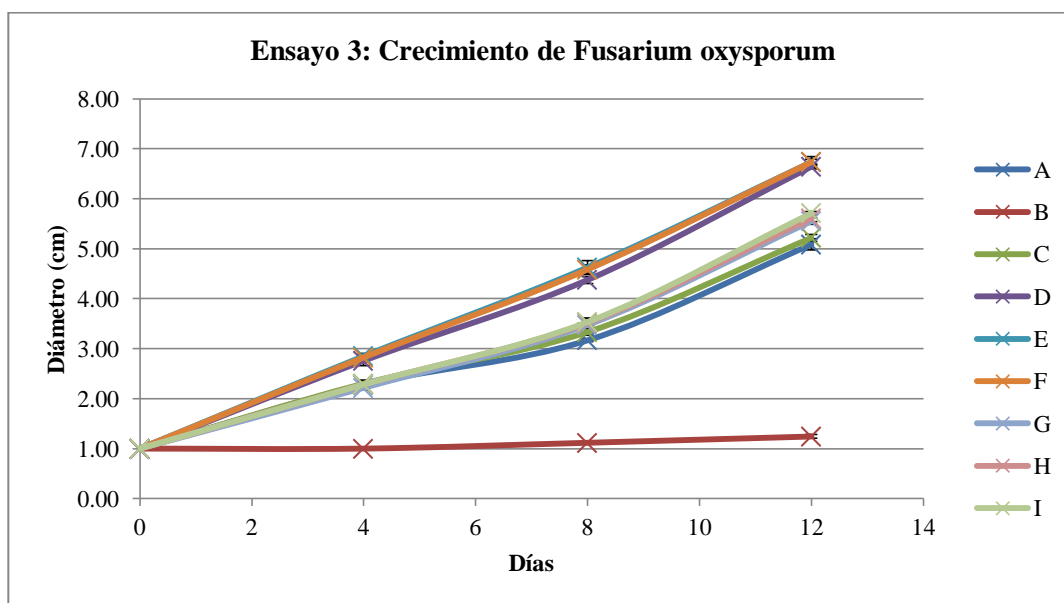
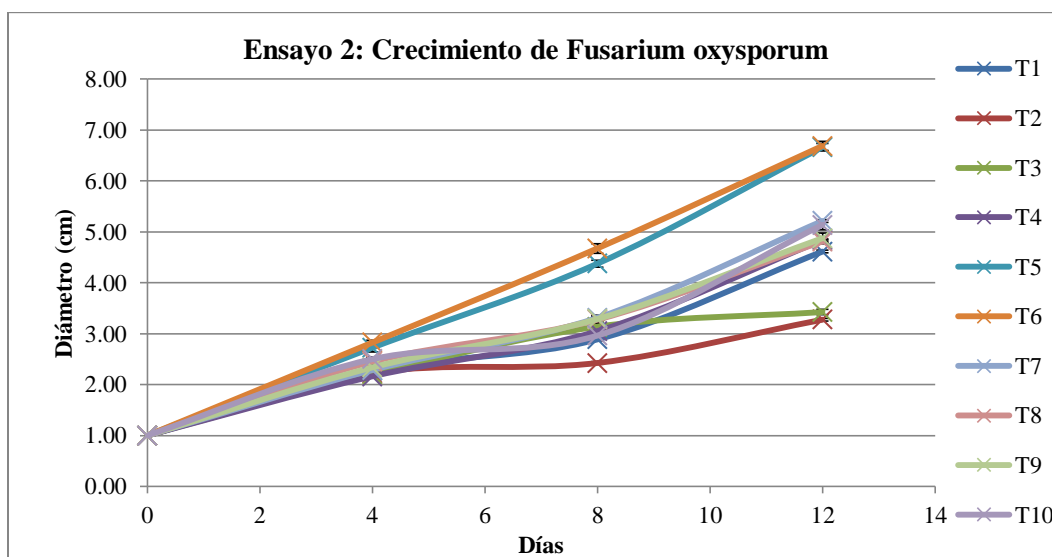
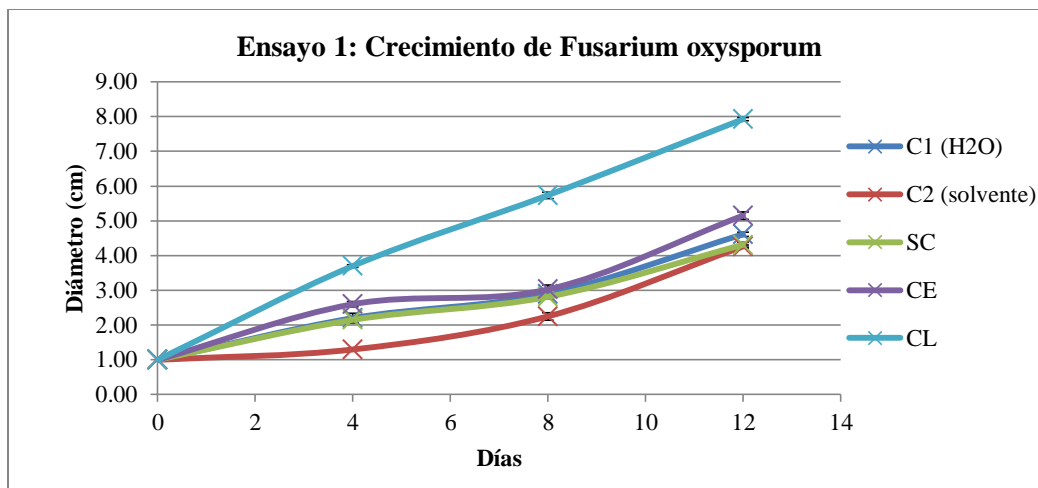
Repeticiones	Tratamientos								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
R1	3.47	1.12	3.60	4.67	4.65	4.67	3.72	3.80	3.87
R2	3.48	1.15	3.53	4.53	4.83	4.68	3.73	3.78	3.80
R3	3.55	1.10	3.58	4.60	4.70	4.68	3.77	3.90	3.83
R4	3.48	1.12	3.63	4.60	4.63	4.77	3.80	3.78	3.85
R5	3.53	1.13	3.67	4.55	4.82	4.77	3.73	3.78	3.90
R6	3.53	1.10	3.68	4.60	4.78	4.72	3.73	3.77	3.80

s	0.0346	0.0195	0.0558	0.0468	0.0865	0.0440	0.0306	0.0488	0.0391
ΣX_i	21.05	6.72	21.70	27.55	28.42	28.28	22.48	22.82	23.05
\bar{X}_i	3.51	1.12	3.62	4.59	4.74	4.71	3.75	3.80	3.84
$(\Sigma X_i)^2$	443.10	45.11	470.89	759.00	807.51	799.95	505.50	520.60	531.30
ΣX_i^2	73.86	7.52	78.50	126.51	134.62	133.33	84.25	86.78	88.56
Y_i^2	4882.97								
Y_{ij}^2	813.93								
Y_{ij}	202.07								
\bar{X}	3.742								
FC	756.13								

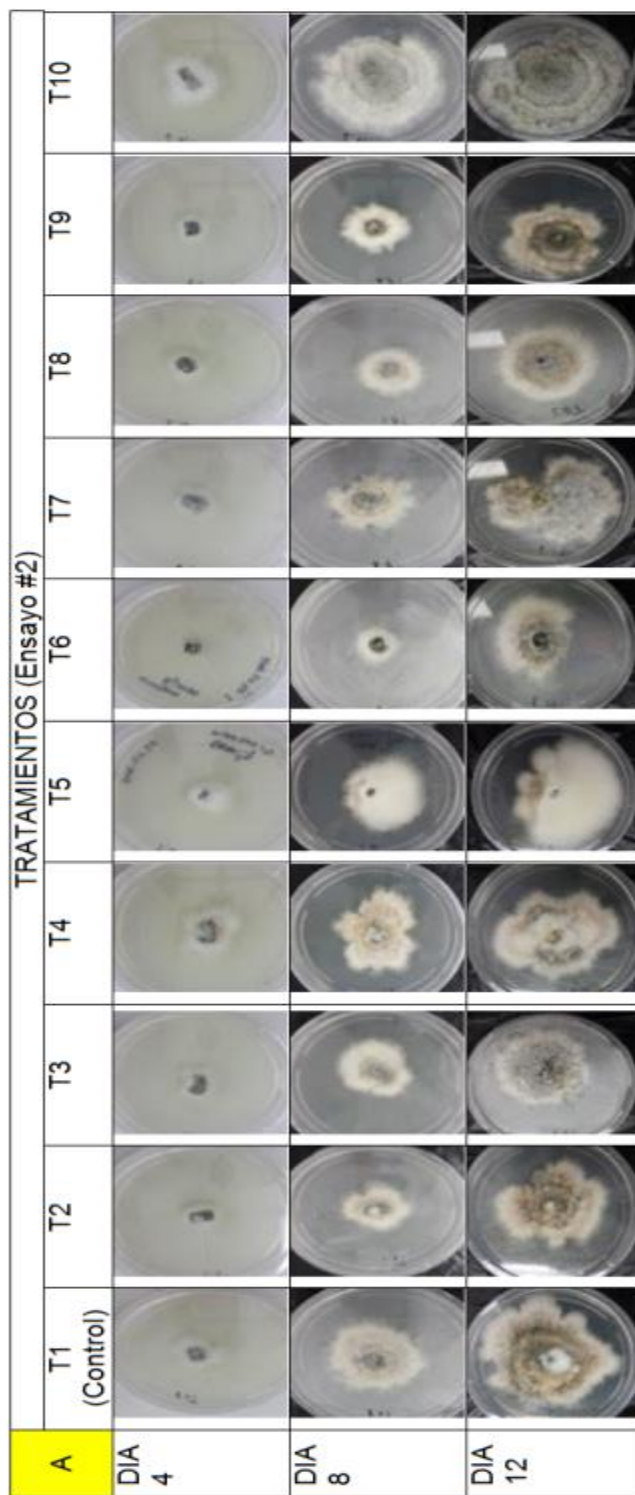
CV	1.30%
$S_{\bar{x}}$	0.00660
S_d	0.00933





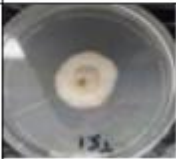





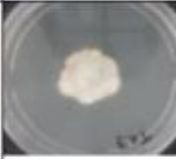

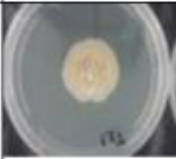
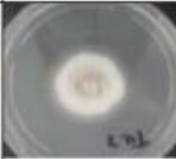
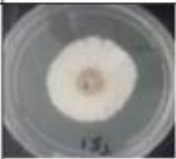
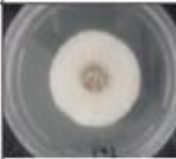

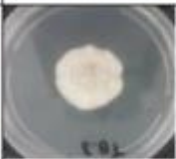





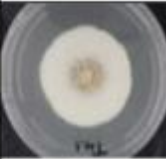
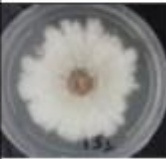
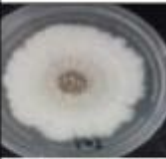
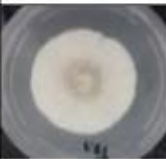



Anexo 13. Gráficos de la cinética de crecimiento en *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum*












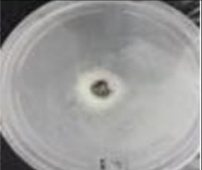
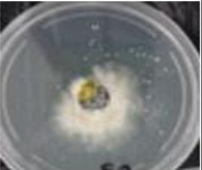
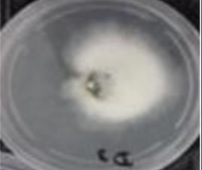

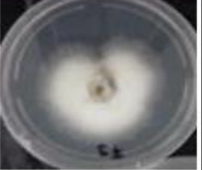
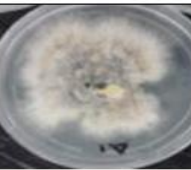
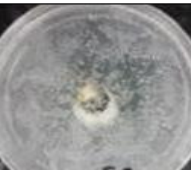

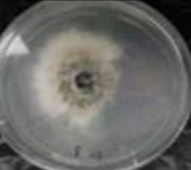
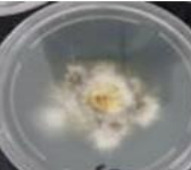

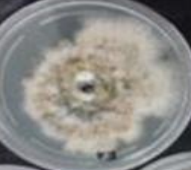
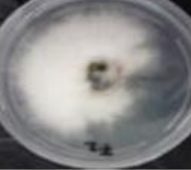


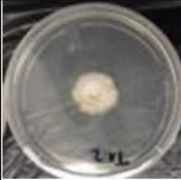



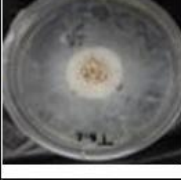

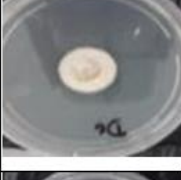
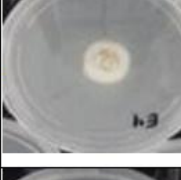
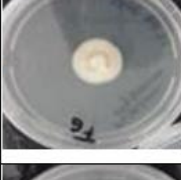
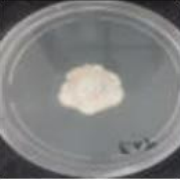

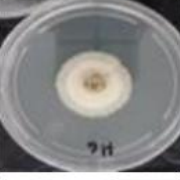



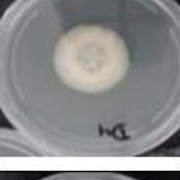
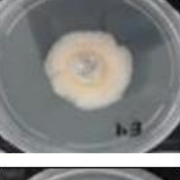



Anexo 14. Efecto de las diferentes soluciones de saponina en el crecimiento *in vitro* de *Cercospora fijiensis* (A) y *Fusarium oxysporum* (B) en los diferentes ensayos



TRATAMIENTOS (Ensayo #2)										
	T1 (Control)	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
B										
										
										

		TRATAMIENTOS (Ensayo #3)							
A		A (Control)	B (Siganex)	C	D	E	F	G	H
DIA 4									
DIA 8									
DIA 12									

		TRATAMIENTOS (Ensayo #3)								
		A (Control)	B (Sportak)	C	D	E	F	G	H	I
B	DIA 4									
	DIA 8									
	DIA 12	