UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN HORTICULTURA Y FRUTICULTURA

Previo a la obtención del Título de:

Ingeniería en Horticultura y Fruticultura

TEMA:

Efecto toxicológico de extractos vegetales *sobre Fusarium oxysporum* bajo condiciones controladas.

AUTOR:

Wilder Lenin Yugcha Quintana

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Carmen Suarez, PhD

QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR

2015

I. PORTADA

UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN HORTICULTURA Y FRUTICULTURA

Previo a la obtención del Título de:

Ingeniería en Horticultura y Fruticultura

TEMA:

Efecto toxicológico de extractos vegetales *sobre Fusarium oxysporum* bajo condiciones controladas.

AUTOR:

Wilder Lenin Yugcha Quintana

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Carmen Suarez, PhD

QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR

2015

II. DECLARACIÒN DE AUTORÌA Y CESIÒN DE DERECHOS

Yo**, Wilder Lenin Yugcha Quintana,** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que consultado las referencias bibliográficas que se incluye en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

_____

Wilder Lenin Yugcha Quintana

III. CERTIFICACIÒN DEL DIRECTOR DE TESIS

El suscrito, Dr. Carmen Suarez Capello, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Egresado Wilder Lenin Yugcha Quintana, realizo la tesis de grado previo a la obtención del título de “Efecto toxicológico de extracto vegetales sobre *Fusarium oxysporum* en condiciones controlada”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Atentamente

Dr. PHD Carmen Suarez Capello
DIRECTORA DE TESIS

IV. TRIBUNAL DE TESIS

UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE INGENIERIA HORTICULTURA FRUTICULTURA

PRESENTADA AL CONSEJO DIRECTIVO COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE:

APROBADA:

_____

Dr. Fabricio Canchignia

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL TESIS

_____	_____
Ing. Jorge Mendoza	**ing. Ramiro Gaibor**
MIEMBRO DEL TRIBUNAL TESIS	**MIEMBRO DEL TRIBUNAL TESIS**

QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR

2015

V. AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por haberme dado la fuerza suficiente para lograr esta meta que hoy me he propuesto. A mis queridos padres Mariano y Consuelo, a mis hermanos Divis y Anita, a mi esposa Isabel por su apoyo incondicional durante todo este proceso de investigación y especialmente a mi querida hija Marina por ser el motivo de mi esfuerzo para salir adelante.

A las autoridades de esta prestigiosa Universidad, por contribuir con el inicio, de ejecución y culminación de la misma y a los todo el personal del laboratorio de ciencias básicas de la presente institución.

Al ing. Gustavo Quintana por su ayuda perenne en la realización de la tesis, al Ing. Washington Mora Silva por su apoyo y sus recomendaciones, al Ing. Denny Carriel, por su conocimiento y apoyo para el desarrollo del presente trabajo, Al Ing. Carmen Suarez Capello. PhD., director de esta tesis por la confianza depositada en mí, por su guía, su solidaridad y su apoyo técnico permanente durante todo el proceso de investigación.

A José Luis Bravo, Palacio Cevallos, Noboa Icaza, mis buenos amigos, parte importante en mi vida universitaria por los gratos momentos y convivencia estudiantil.

.

VI. DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres, Mariano Yugcha y Consuelo Quintana, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su apoyo incondicional perfectamente mantenido a través del tiempo, por sus consejos, por sus ejemplos de perseverancia y constancia que los caracteriza y que me han infundado siempre, pero más que nada por su amor.

A mi esposa Isabel Cabello y mi querida hija Marina, por su ternura, por ser mi sol e irradiar mi vida de luz, de alegría, por convertirse en mi fortaleza, para ser mejor cada día y lograr las metas propuestas.

A mis hermanos: Divis Omar y Ana María, por estar conmigo y apoyarme siempre. A mis sobrinos: Santiago Omar, para que vean en mi un ejemplo a seguir. A mis abuelitos Pedro Quintana y Victoria Zamora por sus consejos y la formación que han entregado a través de los años. A mis amigos por compartir conmigo en los buenos y malos momentos.

Comparto con ustedes mi alegría y este logro alcanzado.

VII. INDICE

I. PORTADA.....i

II. DECLARACIÒN DE AUTORÌA Y CESIÒN DE DERECHOS.....ii

III. CERTIFICACIÒN DEL DIRECTOR DE TESIS.....iii

IV. TRIBUNAL DE TESIS.....iv

V. AGRADECIMIENTO.....v

VI. DEDICATORIA.....vi

VII. **INDICE**.....vii

VIII. INDICE DE CUADRO.....x

IX. INDICE DE FIGURA.....xi

X. INDICE DE ANEXO.....xii

XI. RESUMEN.....xiii

XII. ABSTRACT.....xiv

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACION.....1

1. INTRODUCCIÓN.....2

1.1. Problematización.....3

1.2. Justificación.....4

1.3. OBJETIVOS.....5

1.3.1. General.....5

1.3.2. Específicos.....5

1.4. HIPÓTESIS.....5

CAPITULO II.....6

MARCO TEORICO.....6

2.1. FUNDAMENTACION TEORICA.....7

2.2. Extractos vegetales.....7

2.3. Propiedades antifungicas de diversas especies vegetales.....8

2.4. *Fusarium oxysporum*.....10

2.4.1. Características de la colonia.....11

CAPITULO III 12
METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION 12
3.1. Materiales y Métodos 13
3.2. Ubicación del experimento 13
3.3. Proceso de selección de las plantas 13
3.4. Factores de estudio 14
3.5. Determinación de propiedades antifungicas de los extractos. 16
3.6. Diseño experimental 16
3.7. Manejo del experimento 17
3.7.1. Obtención y procesamiento del material vegetal. 17
3.7.1.1. Infusión. 17
3.7.1.2. Maceración. 17
3.7.2. Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* 18
3.7.3. Multiplicación de cultivos puros. 18
3.7.4. Variable evaluada 18
3.7.4.1. Crecimiento radial del hongo. 18
CAPITULO IV 19
3. RESULTADOS Y DISCUSION 19
4.1. Resultados 20
4.1.1. Descripción de las especies seleccionadas en la zona del proyecto. 20
4.1.2. Establecimiento de jardín de multiplicación. 21
4.1.3. Descripción del desarrollo fenológico de las plantas. 21
4.1.4. Preparación de los extractos. 22
4.1.5. Crecimiento radial: hongo – extractos 22
4.1.5.1. Métodos de extracción 23
4.1.5.2. Concentraciones 24
4.1.5.3. Extractos vegetales 25
4.1.5.4. Interacción extractos vegetales por método de extracción 26
4.1.5.5. Interacción de extractos vegetales por concentraciones 27
4.1.5.6. Interacción extractos vegetales*método*concentración 28
4.2. Discusión 30

CAPITULO V 32
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 32
5.1. Conclusiones 33
5.2. Recomendaciones 34
CAPITULO VI 35
6. BIBLIOGRAFIAS 35
6.1. Literatura citada 36
CAPITULO VII 39
7. ANEXOS 39

VIII. INDICE DE CUADRO

Cuadro 1. ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS. UTEQ, 2013. 13

Cuadro 2. FACTORES EN ESTUDIO. UTEQ, 2013. 14

Cuadro 3 DESCRIPCION DE LOS TRATAMIENTOS EN ESTUDIO. UTEQ, 2013. 15

Cuadro 4 DESARROLLO FENOLÓGICO DE CADA ESPECIE EN ESTUDIO. UTEQ, 2013..... 21

Cuadro 5 ANÁLISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum* CON CUATRO EXTRACTOS VEGETALES. UTEQ, 2013. 23

IX. INDICE DE FIGURA

Figura 1 Prueba de efectos toxicológicos hongo-extractos vegetales. UTEQ, 2013. 16

Figura 2 Albahaca (*O. basilicum*)

Figura 3 Ruda (*R. minuta*) 20

Figura 4 Flor de muerto (*T.erecta*)

Figura 5 Ortiga (*U. dioica*) 20

Figura 6 Crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum* en los extractos obtenidos por maceración e infusión. UTEQ, 2013. 24

Figura 7 Efecto de la diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013. 25

Figura 8 Efecto de los extractos vegetales sobre el crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013. 26

Figura 9 Efecto toxicológico de la interacción extractos vegetales * método de extracción sobre el crecimiento (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013. 27

Figura 10 Efecto toxicológico de la interacción extractos vegetales * concentración sobre el crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013. 28

Figura 11 Efectos de la interacción extractos x método x concentración sobre el crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013. 29

X. INDICE DE ANEXO

Anexo 1 EFICACIA DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN UTILIZADO PARA LA PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES UTEQ 2013.. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 2 DIFERENCIAS ESTADÍSTICA ENTRE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS VEGETALES UTEQ 2013 .....**¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 3 PROMEDIO DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum* SOBRE 4 EXTRACTOS VEGETALES UTEQ 2013 **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 4 EFECTO DE LA INTERACCIÓN DE EXTRACTO VEGETALES * MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Fusarium oxysporum* UTEQ 2013 .....**¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 5 PROMEDIO DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum* EN LA INTERACCION EXTRACTO POR CONCENTRACION UTEQ 2013 .....**¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 6 PROMEDIO DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum* EN LA INTERACCION EXTRACTOS-METODOS-CONCENTRACIONES UTEQ 2013 .....**¡Error! Marcador no definido.**

XI. RESUMEN

Se evaluó el efecto toxicológico de los extractos vegetales de Ortiga (*Urtica dioica*), flor de muerto (*Tagetes erecta*), albahaca (*Ocimum basilicum*) y ruda (*Ruta Minuta*) sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en condiciones controladas. Todos los extractos vegetales tuvieron un efecto fungistático *sobre F. oxysporum*. Para la preparación de los extractos vegetales se utilizaron dos métodos de extracción (infusión y maceración), las concentraciones utilizadas fueron: 10, 25 y 50% a partir de una solución madre preparada inicialmente.;.

El crecimiento micelial de *F. oxysporum* vario de acuerdo al tipo de extractos, concentración y método de extracción, en comparación con el testigo sin extracto en el medio de cultivo PDA.. El hongo aclcanzò el mayor promedio de crecimiento micelial en el extracto de flor de muerto (*T. erecta*) .

El menor crecimiento lo provoco el extracto de ortiga (*U. dioica*), con la concentración al 50%, en cuanto al método de extracción se encontró alta significancia estadística. Los resultados obtenidos en esta investigación soporta la hipótesis de que si existe una metodología sencilla de manera artesanal para la preparación de extractos vegetales.

XII. ABSTRACT

Toxicological effect of plant extracts of Nettle (Urtica dioica), dead flower (Tagetes erecta), basil (Ocimum basilicum) and rue (Ruta graveolens) on mycelial growth of Fusarium oxysporum was evaluated under controlled conditions. All plant extracts had a fungistatic effect on F. oxysporum. For the preparation of plant extracts Two methods of extraction (maceration infusion) was used, concentrations of extracts used were: 10, 25 and 50%, which were obtained from different studies extracts.

The mycelial growth of F. oxysporum varied according to the type of extracts, concentration and extraction method, the control without extract in the culture medium increased PDA without any difficulty. Followed by the dead flower extract (T. erecta) that reached the highest average mycelial growth than other extracts studied, but less than witness who reached the highest mycelial growth

The slower growth caused the extract nettle (U. dioica), with 50% concentration, in the method of extraction high statistical significance was found. The results obtained in this research supports the hypothesis that if there is a simple methodology for preparing traditional methods of plant extracts.

CAPITULO I

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACION

1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre utiliza las plantas, para curar dolencias, heridas y enfermedades tanto en humanos como en plantas, siendo muchas de ellas de fácil ubicación, en los bosques, o en los lugares no cultivados y quizás en más de una ocasión las habremos despreciado o simplemente considerado como “malas hierbas”.

Poco a poco se fue dejando de lado su uso y se reemplazaron por productos químicos aumentado la resistencia de patógenos. En la actualidad, cuando se busca nuevas alternativas para la prevención y control de enfermedades intentando una producción agrícola más sostenible y con efecto menos contaminante, se vuelve la vista al conocimiento ancestral y se promueve integral dicho conocimiento en la tecnología actual y hallar una armonía entre esos elementos por el bien del ambiente y el productor.

De manera similar, los cultivos se ven afectados por agentes causantes de enfermedades entre los que se destacan los hongos. En los últimos años el sector agrícola de Ecuador y los cultivos de los pequeños productores se han visto afectados por el hongo *Fusarium oxysporum*, patógeno que afecta una amplia variedad de especies vegetales de importancia comercial, con frecuencia la enfermedad conduce a la muerte de la planta, ocasionando pérdidas económicas a los agricultores y encareciendo los alimentos. El género *Fusarium* produce un marchitamiento vascular en las plantas que ataca una gran variedad de cultivos (ajo, algodón, arveja, banano, maracuyá, calabacita, melón ornamentales, crisantemos, tomate, etc.) económicamente importantes en todo el mundo.

El marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum* se torna más importante por su difícil control incluso con productos químicos y por la sobrevivencia del agente causal en los residuos vegetales y en el suelo, que pueden extenderse por aproximadamente un periodo de 20 años, ocasionando la inhabilitación del uso del terreno para nuevas cosechas.

1.1. Problematización

El hongo *F. oxysporum* causa pérdidas económicas hasta un 60% en la producción en los cultivos de maracuyá, banano, sandia y tomate, entre otros, y llegando incluso a la muerte de la planta, causando gran preocupación a los productores, los cuales se ven obligados a utilizar productos químicos de alta toxicidad con relativo éxito; desafortunadamente, estos agroquímicos no son fácilmente biodegradables, contaminan el medio ambiente y existe el riesgo de desarrollar resistencia a ellos y por lo tanto la búsqueda de alternativas de control o manejo del problema mantiene su vigencia.

El empleo de extractos vegetales es utilizado en varios países para el combate de enfermedades en cultivos de hortalizas; mientras que, en nuestro país es un campo poco explorado, por años existió evidencia del conocimiento de plantas con propiedades fúngicas. Aun en el caso de usarse, las recomendaciones son de carácter artesanal y folclórico conduciendo a resultados inconsistentes.

1.2. Justificación

F. oxysporum es un organismo de alta peligrosidad para los cultivos como el banano, maracuyá, tomate, entre otros.

Este hongo posee estructuras capaces de permanecer en el suelo por largo tiempo, inhabilitando los suelos para los cultivo. Los fungicidas y prácticas sanitarias son poco eficaces, por lo tanto es necesario continuar buscando formas o métodos de combatir este organismo. El uso de productos biológicos como organismos antagónicos o biocidas se presenta como una alternativa interesante capaz de bloquear el patógeno en su propio hábitat.

El empleo de plantas, o extractos de las mismas, sería una alternativa de uso inmediato y fácil de aplicar por parte de pequeños productores. En primer lugar definir y seleccionar plantas capaces de combatir *F. oxysporum* y luego desarrollar métodos de preparación sencillos y efectivos para beneficio de productores, especialmente en patosistemas complejos como los que están asociados al hongo en referencia.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

- Determinar el efecto biocida o biostático de especies vegetales (maleza) comunes en el trópico húmedo, contra *F. oxysporum*.

1.3.2. Específicos

- Seleccionar especies vegetales comunes de la zona del trópico húmedo con propiedades biocidas o biostático contra *F. oxysporum*.

- Determinar la metodología apropiada para la preparación de los extractos vegetales de manera artesanal.

1.4. HIPÓTESIS

- Entre la especies comunes en el trópico húmedo existen algunas con propiedades biocidas o biostaticos que se pueden usar contra *F. oxysporum.*

.

CAPITULO II
MARCO TEORICO

2.1. FUNDAMENTACION TEORICA

2.2. Extractos vegetales

El empleo de extractos de plantas y el uso de elicitores para el control de hongos fitopatogenos, son las técnicas que más han provocado interés en los últimos años por investigadores, los métodos convencionales para el control de enfermedades en plantas está originando problemas como: resistencia de patógenos a fungicidas, presencia de residuos de fungicidas en productos vegetales y daño irreparable al medio ambiente y al hombre (Ramirez & Rodriguez, 1995).

El uso de productos naturales es tan antiguo como la agricultura, siendo desplazados por mucho tiempo por la facilidad y eficacia de los productos químicos. Actualmente los preparados a base de diversas plantas se están aplicando en medicina moderna, farmacéutica, biotecnología y últimamente con contribución muy prometedora en la agricultura ecológica debido a las propiedades y principios activos de diferentes extractos vegetales (Ascon J & Talon, M, 2001), aunque es difícil encontrar referencias exactas en cuanto a métodos de extracción o uso de estas plantas.

Existe una creciente producción de informes de resultados del uso de extractos de origen vegetal y su caracterización por la presencia de metabolitos secundarios los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas, y que pueden ser agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides., (Bravo, Bermudez, & Montes, 2000). Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son antialimentarios, antivirales, antimicrobianos, repelentes, inhibidores de germinación de semillas que permiten su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y su producción

alimentaria, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables (Philogenet , Regnault, & Vicente, 2004).

En la naturaleza existen de 250.000 a 500.000 especies vegetales, de las cuales se estima que al menos el 10% han sido estudiados en sus aspectos químicos y propiedades biológicas. Mencionado anteriormente, esta temática no es nueva, se había dejado en el olvido por un largo periodo de tiempo y recientemente, el interés ha sido renovado valorando la diversidad de estructuras químicas en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos (Lizcano, 2007)

2.3. Propiedades antifungicas de diversas especies vegetales

Existen reportes que registran plantas con actividad anti fúngica, productos derivados de las semillas de cítricos (*Citrus sp*) principalmente naranja y toronja con acción fungicida y bactericida para el control de hongos: *Fusarium spp* y bacterias *Erwinia caratovora, Xanthononas campestris, Xanthomonas cucurbitae, Pseudomonas solanacearum,* (Scholaen, 2005)

(Pupo, Kalombo, Herrera, Malherios, & Varga, 2011), Evaluaron el efecto antifungico de 11 extractos de flores de *Tagetes erecta* de hojas de yarumo (*L. peltata)* sobre *Alternaría solani*, estimulando el crecimiento del hongo, y también observando inhibición en diferentes grados.

(Pawar & Thaker, 2007), probaron la actividad antifungica de 75 aceites esenciales sobre el crecimiento de *F. oxysporum* y *Alternaría porri*; entre ellos el de *T. erecta* que no tuvo un efecto inhibitorio sobre *Alternaría*, mientras que su eficacia fue muy pobre para *F. oxysporum*

(Sandoval, 2006) Evaluó la acción de 13 extractos vegetales para el control de *Botrytis cinérea* en condición *in vitro*, solo el extracto de ruda presentó efecto fungistático sobre el hongo. (Duarte, Pino, Infante, Sanchez, & Travieso, 2013), mencionan que el uso de aceite esencial de ruda tiene acción fungistático contra *Alternaría solani.*

Según (Politeo, Jukic, & Milos, 2007) y (Fernandez, Viña, Murilli, & Mendez, 2007), la albahaca es fuente de compuestos aromáticos y aceites esenciales con constituyentes biológicos que poseen propiedades insecticidas, nematicidas, fungistáticos y antimicrobianas.

(Uscategui, 2013), al estudiar la efectividad de 17 hidrosoles, aceites esenciales y mezclas de diversos extractos vegetales sobre *Phytophthora infestans, F. oxysporum* y *Rhizoctonia solani,* encontró que todos los hidrosoles mostraron un efecto inhibitorio sobre los patógenos, excepto el extracto de ortiga presentó solo el 50% de inhibición de *F. oxysporum*.

(Chavez & Aquino, 2012), probarón los extractos de ajo (*Allium sativum*), ortiga (*Urtica dioica*) y caraguata *(Eryngium Pandanifolium)* contra *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp y *Sclerotium* sp, patógenos del suelo. El extracto de ajo inhibió por completo todos los hongos; mientras que, el extracto de ortiga presentó un crecimiento micelial ligeramente menor que el resto de los extractos y en comparación del testigo.

La aplicación de extractos vegetales de hojas de matico *(Piper aduncun*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y flores de manzanilla (*Matricharia chamomilla*) permiten controlar bajo condiciones *in vitro* y en plántulas, el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloesporoides*, causante de la antracnosis en tomate de árbol.

(Hernandez & Vasquez , 2007). Las propiedades fungicidas de los extractos de hojas del árbol del paraíso *Azadirachta indica*, en fruta de pera controló en un 85% la pudrición causada por *alternaría solani* (Srivastava & Bihari, 1997).

(Alfonso, Almanza, Hernandez, & Mendoza, 2005), reseñan el buen desempeño del extracto de ajo, al realizar un estudio de ocho extractos vegetales sobre el crecimiento radial de *Rhizoctonia solani*, los cuales tuvieron un efecto inhibitorio sobre el patógeno

(Srivastava & Bihari, 1997), resaltan el buen desempeño de los extractos vegetales de ajo y cebolla, al realizar un estudio de las propiedades fungicidas de 10 extractos acuosos sobre *Curvularia tuberculata* y *Alternaria alternata*, ya que neem (*Azadirachta indica*), venturosa (*Lantana cámara L*.) y albahaca (*Ocimum basilicum L*.), en dosis media y baja, inhibieron el crecimiento de estos patógenos

2.4. *Fusarium oxysporum*

Este organismo es un hongo ascomiceto, de distribución cosmopolita, de muy difícil manejo por su gran capacidad para establecerse y colonizar casi cualquier tipo de suelo. Además, puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en suelos infectados y recuperarse rápidamente a fumigaciones o a otras prácticas agrícolas que se incluyan en el manejo de esta enfermedad, las mismas que afectan significativamente la rentabilidad del cultivo (Apocada, 2006)

2.4.1. Características de la colonia

La característica distintiva de *F.* oxysporum, es la formación de microconidias que crecen en fialides cortas formadas sobre la hifas y la producción de clamidosporas. La colonia es de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa – dextrosa - agar (PDA) a 25ºC, (Leslie & Summerell, 2006).

La morfología de la colonia, en PDA, varia ampliamente, observándose un micelio algodonoso abundante o con una morfología pionotal (micelio plano y húmedo). Además, la coloración puede variar de blanco, rosado, durazno a purpura o violeta, lo que da idea de la gran variabilidad de este patógeno (Garces, Orozco, Bautista, & Valencia, 2001)

Los conidios son hialinos y de dos tipos: el primero son macroconidias moderadamente curvadas en forma de hoz, con una célula apical más o menos puntiagudos y en muchas especies en forma de pie (Nelson, Toussoun, & Marasas, 1983). El segundo tipo, son microconidias usualmente unicelulares, elipsoides a cilíndricas, rectas o curvadas, se forman sobre fialides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados (Barnett & Hunter, 1999)

Estas esporas o conidios, están dispersos en el micelio aéreo o en esporodoquios, formados por conidióforos delgados o robustos, simples o ramificados irregularmente (Carrillo, 2003). Los conidios son muy variables debido a su composición química y por los cambios en el ambiente en que crecen, lo que deriva en cambios morfológicos de la colonia (Nelson, Toussoun, & Marasas, 1983).

CAPITULO III
METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1. Materiales y Métodos

3.2. Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en la finca experimental La María en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en el Km. 1½ vía Quevedo-Santo Domingo de los Tsáchilas a una altura entre 75 a 80 msnm; longitud 79°, 28', 30'' O y latitud 01º; clima tropical húmedo.
La temperatura máxima es de 32º C y la mínima es de 22º C, con precipitaciones anuales de 2.000 a 2.300 mm y helofania anual de 870 horas/luz.

3.3. Proceso de selección de las plantas

Se seleccionó un grupo de 4 especies vegetales asociadas a los cultivos de la zona con propiedades anti-hongos. Para ello, se consultaron diversas fuentes referentes a las propiedades antifungicas de las plantas, así como en consulta con experto en el tema[1]. De esta forma se seleccionaron las especies indicadas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS. UTEQ, 2013.

Nº	Nombre vulgar	Nombre científico
1	Ortiga	*Urtica dioica*
2	Flor de muerto	*Tagetes erecta*
3	Albahaca	*Ocimum basilicum*
4	Ruda	*Ruda Minuta*

[1] 2013. Comunicación personal Ing. Alfredo Romero, docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo

3.4. Factores de estudio

En el Cuadro 2 se muestran los factores en estudio utilizados en la presente investigación.

Cuadro 2. FACTORES EN ESTUDIO. UTEQ, 2013.

Factor A: Extractos	**E_1**	Ortiga (*Urtica dioica*)
	E_2	Flor de muerto (*Tagetes erecta*)
	E_3	Albahaca (*Ocimum basilicum*)
	E_4	Ruda (*Ruda Minuta*)
Factor B: Concentración	**C_1**	10%
	C_2	25%
	C_3	50%
Factor C: Métodos	**M1**	Infusión
	M2	Maceración
Tratamiento adicional	**A_1**	Sin extracto

Con la combinación de los tres factores se generaron 24 tratamientos, a los cuales se añadió un tratamiento adicional como control (testigo absoluto) los mismos que se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 3 DESCRIPCION DE LOS TRATAMIENTOS EN ESTUDIO. UTEQ, 2013.

Tratamientos		Detalles
N°	**Símbolo**	
T_1	$E_1M_1C_1$	Extracto _ ortiga + infusión + concentración 10%
T_2	$E_1M_1C_2$	Extracto _ ortiga + infusión + concentración 25%
T_3	E_1MC_3	Extracto _ ortiga + infusión + concentración 50%
T_4	$E_1M_2C_1$	Extracto _ ortiga + maceración + concentración 10%
T_5	E_1M2C_2	Extracto _ ortiga + maceración + concentración 25%
T_6	$E_1M_2C_3$	Extracto _ ortiga + maceración + concentración 50%
T_7	$E_2M_1C_1$	Extracto_ flor_ muerto + infusión + concentración 10%
T_8	$E_2M_1C_2$	Extracto_ flor_ muerto + infusión + concentración 25%
T_9	$E_2M_1C_3$	Extracto_ flor_ muerto + infusión + concentración 50%
T_{10}	$E_2M_2C_1$	Extracto _ flor_ muerto + maceración + concentración 10%
T_{11}	E_2M2C_2	Extracto _ flor_ muerto + maceración + concentración 25%
T_{12}	$E_2M_2C_3$	Extracto _ flor_ muerto + maceración + concentración 50%
T_{13}	$E_3M_1C_1$	Extracto _albahaca+ infusión + concentración 10%
T_{14}	$E_3M_1C_2$	Extracto _ albahaca + infusión + concentración 25%
T_{15}	$E_3M_1C_3$	Extracto _ albahaca + infusión + concentración 50%
T_{16}	$E_3M_2C_1$	Extracto _ albahaca + maceración + concentración 10%
T_{17}	$E_3M_2C_2$	Extracto_ albahaca + maceración + concentración 25%
T_{18}	$E_3M_2C_3$	Extracto _ albahaca + maceración + concentración 50%
T_{19}	$E_4M_1C_1$	Extracto _ ruda + infusión + concentración 10%
T_{20}	$E_4M_1C_2$	Extracto _ ruda + infusión + concentración 25%
T_{21}	$E_4M_1C_3$	Extracto _ ruda + infusión + concentración 50%
T_{22}	$E_4M_2C_1$	Extracto _ ruda + maceración + concentración 10%
T_{23}	$E_4M_2C_2$	Extracto _ ruda + maceración + concentración 25%
T_{24}	$E_4M_2C_3$	Extracto _ ruda + maceración + concentración 50%
T_{25}	A_1	PDA

E1 ortiga, E2 flor de muerto, E3 albahaca, E4 ruda; M1 método por infusión, M2 método por maceración; C1 concentración 10%, C2 concentración 25%, C3 concentración 50%; A1 testigo

3.5. Determinación de propiedades antifungicas de los extractos.

Se tomaron 10, 25 y 50 ml de cada extracto y se le adicionó PDA hasta llevarlo a 100 ml para obtener las diferentes concentraciones. Se sembró en el centro de cada caja Petri un disco de 5 mm de diámetro de micelio de *F. oxysporum* tomadas del borde de la colonias previamente preparada y se incubaron al medio ambiente del laboratorio (ver Figura 1). Como testigo se utilizó el mismo procedimiento pero el PDA sin extracto.

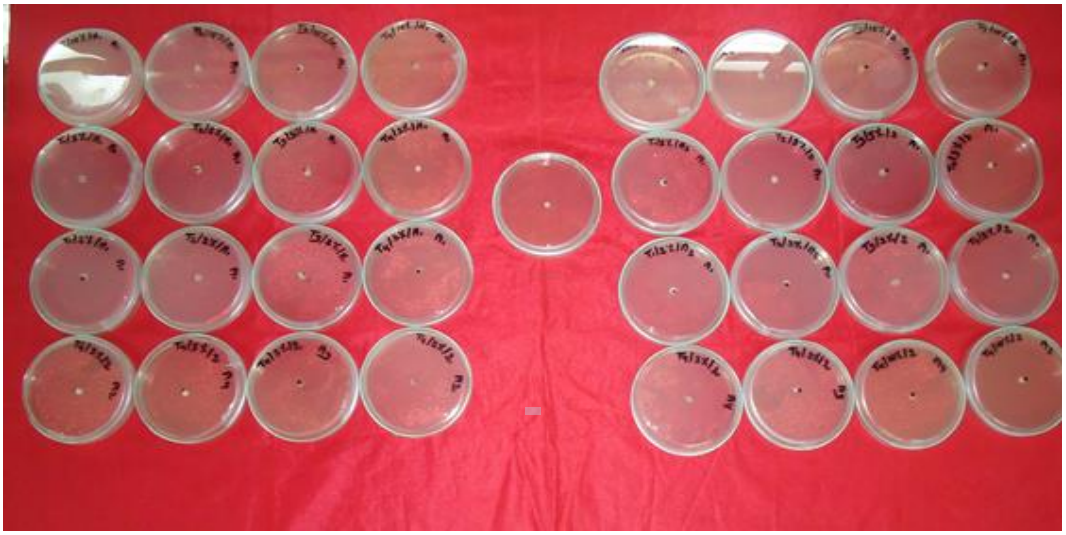

Figura 1 Prueba de efectos toxicológicos hongo-extractos vegetales. UTEQ, 2013.

3.6. Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con arreglo factorial 2*3*4+1 (dos métodos de extracción, tres concentraciones y cuatro especies vegetales, más un testigo absoluto) con cuatro repeticiones. Como unidad experimental se consideró un plato Petri. Las variables fueron sometidas al análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe efecto significativo entre los tratamientos. Posteriormente se comparon las medias de los tratamientos mediante la prueba DMS y Tukey, a un nivel de significancia de 0,05.

3.7. Manejo del experimento

3.7.1. Obtención y procesamiento del material vegetal.

Para preparar los extractos se empleó hojas de cada especie, cosechadas durante la etapa fenológica de floración.

Al existir un procedimiento standard para la preparación de extractos, se inició un proceso de “ensayo y error” para determinar el procedimiento apropiado al objetivo trazado.

Se usaron ramas con hojas maduras lavadas con agua corriente, y seguidos por agua estéril. Se probó material recién colectado y dejó secar en ambiente del laboratorio. También usando métodos de esterilización en autoclave y pasteurización**.**

En cada caso se usó la relación de 1 parte del material vegetal por 10 de agua para cada proceso de extracción y ésta se consideró la solución madre. En función de los resultados que se observaba se fueron haciendo los ajustes necesarios hasta conseguir el extracto puro, libre de organismos contaminantes que permitan el crecimiento del patógeno seleccionado. Básicamente se usaron dos métodos de extracción:

3.7.1.1. Infusión.- El material de cada especie vegetal se cortó en trozos pequeños en proporción de 1:10 (P/V), se colocaron en un recipiente resistente al calor sobre el cual se vertió el agua hirviendo, se tapó y se dejó reposar por 24 horas.

3.7.1.2. Maceración.- se realizó el mismo procedimiento del método anterior excepto que se le agregó agua fría estéril en un recipiente cerrado a temperatura ambiente por 24 horas.

3.7.2. Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum*

Se obtuvo a partir de tallo de maracuyá con síntomas de la enfermedad, el tejido dañado se lavó con agua corriente. Después se cortaron trozos de tejido de 1 cm de área dañada y parte sana en el mismo tronco, posteriormente bajo condiciones asépticas las secciones fueron sumergidas durante 30 segundo en una solución de hipoclorito de sodio al 10% con agitación constante, se enjuagaron 3 veces con agua destilada, esto con el fin de eliminar el exceso de cloro. Después se sembraron en medio de cultivo cinco trozos por caja de Petri, enseguida se pasaron a incubar a 25º C durante cinco días, momento en el que se identificó el organismo con claves taxonómicas (Barnett & Hunter, 1999).

3.7.3. Multiplicación de cultivos puros.

Una vez aislado el hongo, se hizo repique de colonias en medio de cultivo PDA, en 10 cajas Petri de 9 cm de diámetro y se mantuvieron en incubadora a 25° C, durante 7 días. Estas colonias se usaron para realizar las diferentes pruebas del ensayo.

3.7.4. Variable evaluada

3.7.4.1. Crecimiento radial del hongo.

Una vez sembrado el patógeno en el PDA con las diferentes concentraciones de los extractos vegetales, se llevaron a cabo mediciones del diámetro de la colonia cada dos días, durante nueve días, tiempo en el cual el hongo invadió completamente la caja Petri de control.

CAPITULO IV
3. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados

4.1.1. Descripción de las especies seleccionadas en la zona del proyecto.

Las especies vegetales usadas se escogieron de diferentes lugares: la ortiga se la encontró en los bordes de un caminos y en tierras húmedas y ricas en residuos orgánicos; en el caso de la ruda y flor de muerto se localizaron cerca de viviendas como planta medicinal; mientras que, la albahaca se localizó en un potrero. Todas estas plantas se encuentran durante todo el año como malezas asociadas a los sistemas de producción de la zona.

Figura 2 Albahaca (*O. basilicum*)

Figura 3 Ruda (*R. minuta*)

Figura 4 Flor de muerto (*T.erecta*)

Figura 5 Ortiga (*U. dioica*)

4.1.2. Establecimiento de jardín de multiplicación.

Además de las muestras para extracción, se recolectaron especímenes tiernos y semillas para la multiplicación de cada especie; con estas se estableció un jardín de multiplicación en la Finca Experimental La María de la UTEQ. En este caso se prepararon parcelas de 5 x 3 metros. Para el manejo de cada especie vegetal, no se aplicó ningún tipo de fertilización y el control de maleza se hizo manualmente. Fue a partir de estas parcelas que se colectaba material para las pruebas; de este modo se evitaba alteraciones por la localización ecológica de los especímenes.

4.1.3. Descripción del desarrollo fenológico de las plantas.

Un seguimiento de la fenología de las plantas en el jardín de multiplicación permitió establecer algunos de los parámetros de desarrollo de su ciclo vital. En el Cuadro 4 se muestran los valores obtenidos para los parámetros de germinación, tiempo a la floración, altura y ciclo vital de cada especie.

Cuadro 4 DESARROLLO FENOLÓGICO DE CADA ESPECIE EN ESTUDIO. UTEQ, 2013

Especies	Germinación (días)	Floración (días)	Altura (cm)	Ciclo fenológico (días) 1/
Ortiga (*U. dioica*)	4	20	0.60	50
Flor de muerto (*T. erecta*)	4	41	1.10	90
Ruda (*R. minuta*)	4	41	1.20	90
Albahaca (*O. basilicum*)	5	41	0.80	90

1/ Promedió de 5 plantas

Las especies completaron su ciclo vital entre 50 y 90 días, luego de abundante formación de semilla que sirve para reanudar el ciclo.

4.1.4. Preparación de los extractos.

Se realizarón varias pruebas preliminares para realizar extractos de una manera consistente con la investigación en marcha. Un problema recurrente fue el desarrollo de bacterias y levadura, que tornaba los extractos desagradables para manipular e inconvenientes. Finalmente se encontró la metodología que permitió eliminar bacterias y hongos contaminantes, esta consistió en desinfectar las muestras con una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 10 segundos, seguida de un tripe lavado con agua corriente esterilizada y fría y un enjuague final con agua destilada esterilizada. Se dejaron escurrir por 24 horas sobre papel periódico a temperatura ambiente de laboratorio, y las muestras estuvieron listas para ser sometidas a las metodologías de extracción: infusión y maceración. Una vez trascurrido el lapso previsto, los extractos vegetales se filtraron y se colocaron en frascos de color ámbar, agregando 10 ml de antibiótico (Tetraciclina) por cada 100 ml de extractos.

4.1.5. Crecimiento radial: hongo – extractos

El análisis de varianza que se indica en el Cuadro 5 muestra alta significancia estadística encontrada para todas las fuentes de variación (extractos, dosis, métodos e interacciones); indicando no solo el efecto simple de cada uno, sino que la eficacia de acción de cada una de las especies en uso depende de la forma de extracción. El coeficiente de variación fue de 3,09%.

Cuadro 5 ANÁLISIS DE VARIANZA DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum* CON CUATRO EXTRACTOS VEGETALES. UTEQ, 2013.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	CM	F	P
Extractos	3	2148,07	716,02	241,59	<0,0001
Método	1	56,37	56,37	19,02	<0,0001
Concentración	2	372,42	186,21	62,83	<0,0001
Extracto * Método	3	1121,38	373,79	126,12	<0,0001
Extracto * Concentración	6	359,84	59,97	20,24	<0,0001
Extracto * Método * Concentración	6	406,57	67,76	22,86	<0,0001
Error	74	219,32	2,96		
Total	95	4678,83			

gl: grados de libertad, SC: sumatoria de cuadrados, CM: cuadrados medios, F: prueba de F, P: probabilidad de igualar el valor de F

4.1.5.1. Métodos de extracción

En la Figura 6 se muestra que utilizando cualquier método de extracción se reprime el crecimiento del patógeno. Esto indicaría que las cuatro especies en prueba tienen capacidad antifúngica. Sin embargo, cuando se usa agua caliente (infusión) el extracto es más potente.

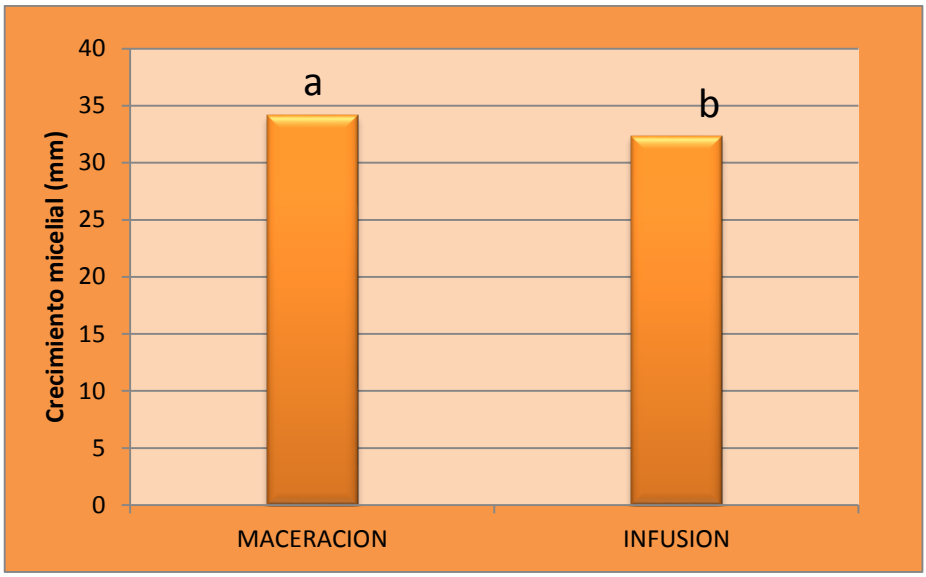

Figura 6 Crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum* en los extractos obtenidos por maceración e infusión. UTEQ, 2013.

4.1.5.2. Concentraciones

En relación a las concentraciones, se presentó una relación inversa con el crecimiento de *Fusarium*. Con la dosis baja (10%) se presentó el mayor crecimiento micelial; mientras que, con las concentraciones media y alta (25 y 50%) su crecimiento fue inferior, aunque estos promedios fueron estadísticamente iguales entre sí (Figura 7).

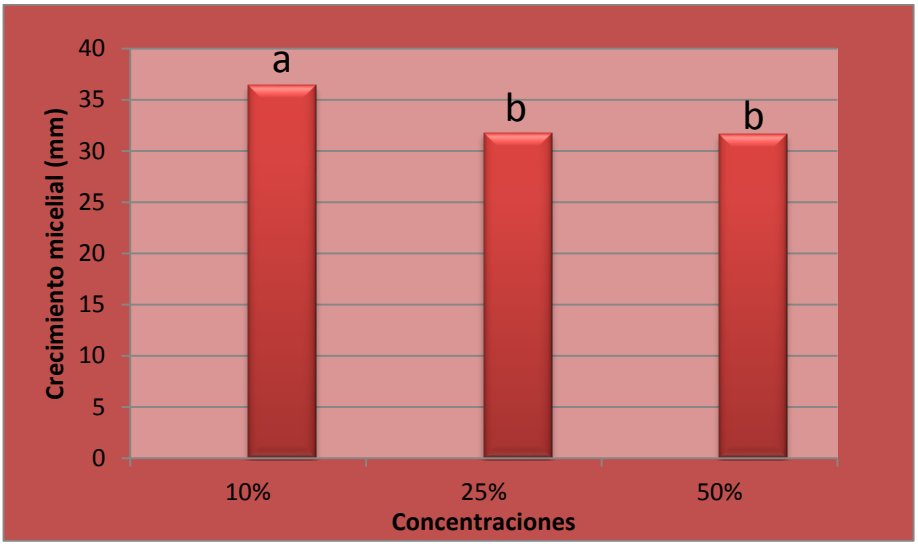

Figura 7 Efecto de la diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013.

4.1.5.3. Extractos vegetales

En el tratamiento control sin extractos (figura 8) el hongo cubrió la caja Petri en 9 días; mientras que, el promedio de crecimiento es de 1 cm por días. Las diferencias entre tratamiento fueron significativas al 0,05%. El menor promedio se obtuvo con el extracto de ortiga, y entre los extractos de ruda y albahaca no hubo diferencia estadística.

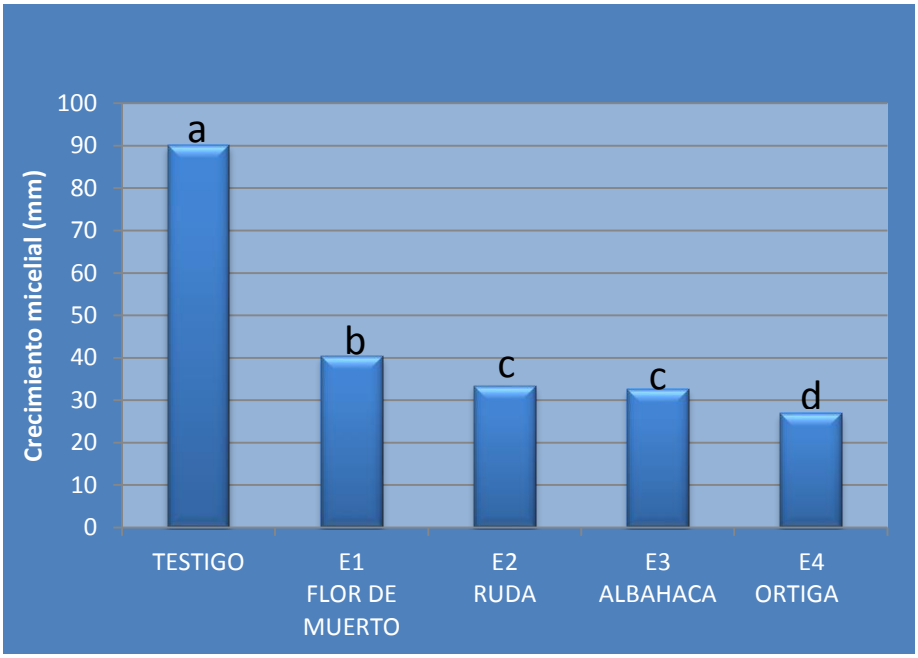

Figura 8 Efecto de los extractos vegetales sobre el crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013.

4.1.5.4. Interacción extractos vegetales por método de extracción

Considerando que todas las especies en prueba, independientemente del método de extracción usado, reprimieron el crecimiento del hongo en más del 50%, se hace evidente que por cualquier método que se extraiga el principio activo se va a producir esta represión. Sin embargo, se apreció cierta especificidad en cuanto a la interacción de las especies con el método extracción, pues la ruda y la ortiga mostraron su máxima eficiencia por el método de infusión; mientras que, con albahaca y ortiga la maceración fue más eficiente (Figura 9 y Cuadro en anexo 4).

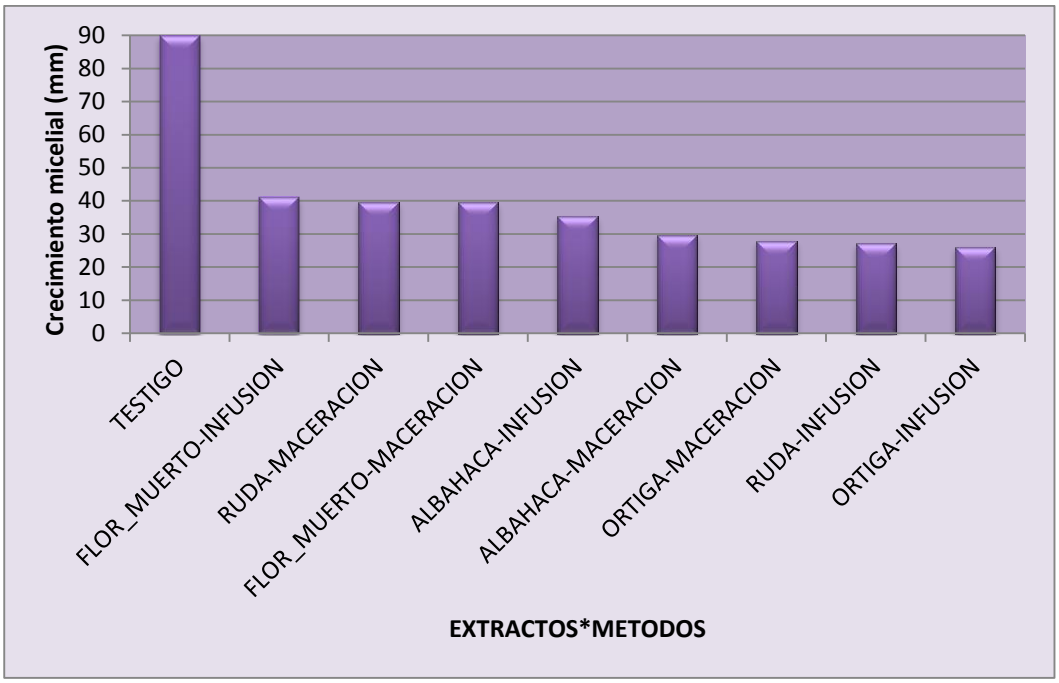

Figura 9 Efecto toxicológico de la interacción extractos vegetales * método de extracción sobre el crecimiento (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013.

4.1.5.5. Interacción de extractos vegetales por concentraciones

Todos los extractos vegetales con sus respectivas concentraciones redujeron el crecimiento micelial del patógeno, el extracto de flor de muerto con la concentración media y baja tuvieron diferencia estadística frente a los demás tratamientos, sin embargo la ortiga en la mayor concentración, fue la que produjo el menor crecimiento micelial (Figura 10 y cuadro en anexo 5)

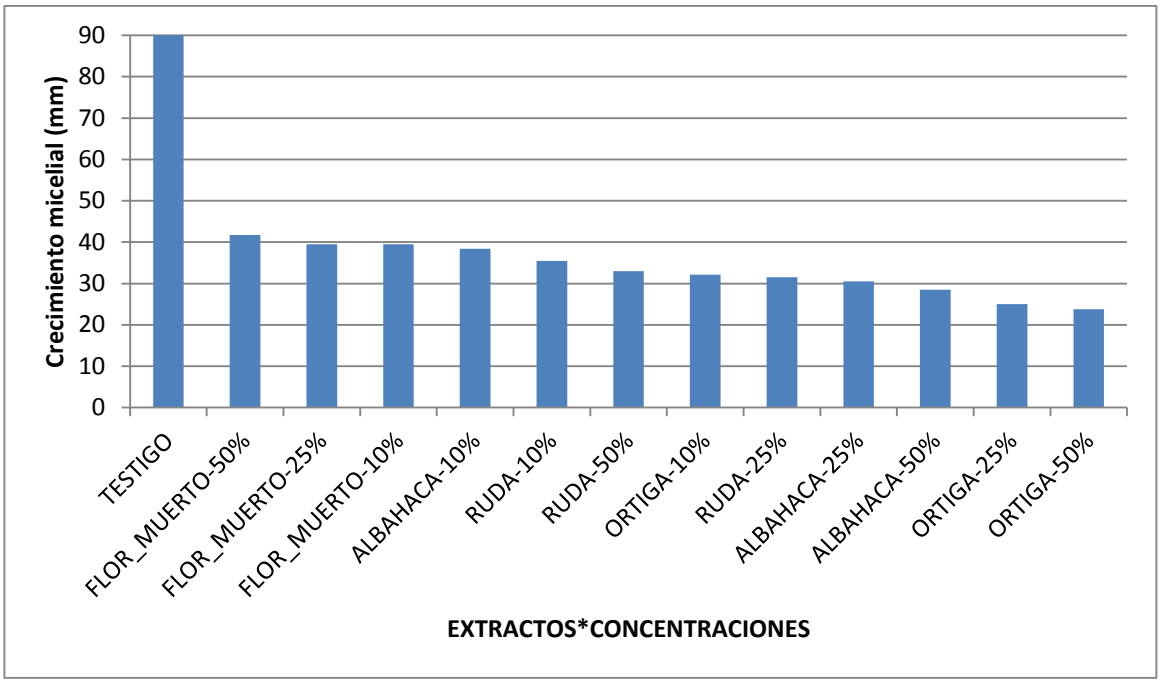

Figura 10 Efecto toxicológico de la interacción extractos vegetales * concentración sobre el crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013.

4.1.5.6. Interacción extractos vegetales*método*concentración

En la Figura 11 se muestran los resultados de la interacción extracto-métodos-concentración; los extractos de ruda, albahaca y ortiga por ambos métodos de extracción y en concentración media y alta, mostraron el menor crecimiento micelial de F. oxysporum mientras que, el extracto de ortiga por infusión expresó su máxima eficacia en dosis alta (Cuadro en anexo 6)

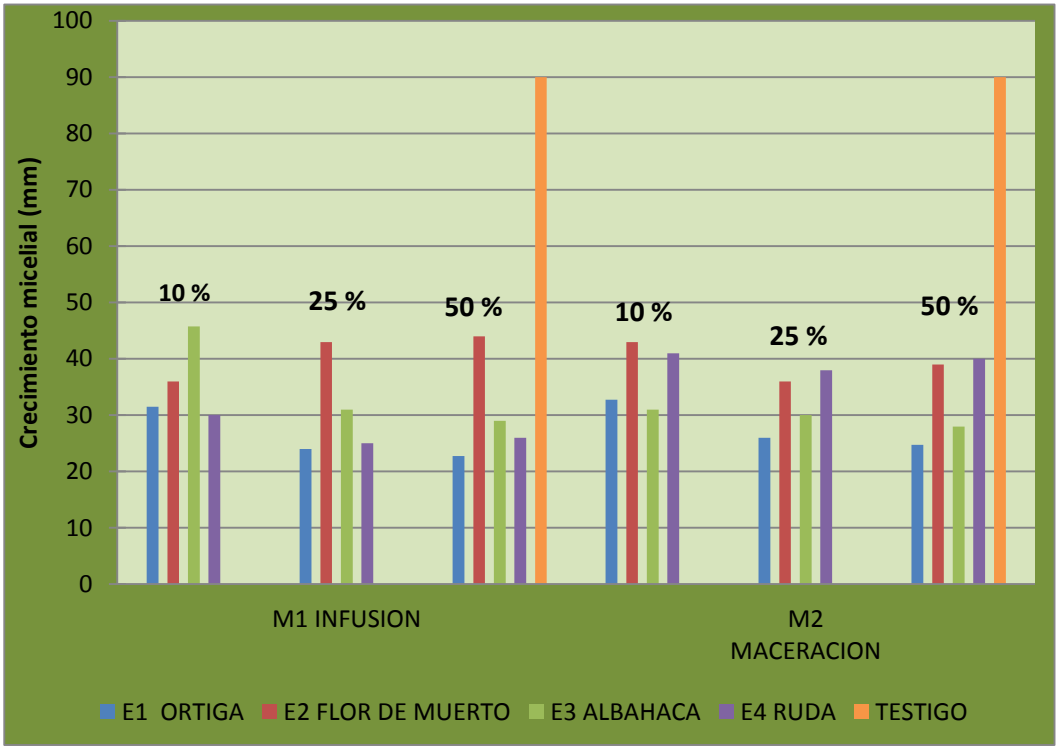

Figura 11 Efectos de la interacción extractos x método x concentración sobre el crecimiento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013.

4.2. Discusión

En la prueba de efecto toxicológico de los extractos vegetales sobre *F. oxysporum*, se pudo mostrar que existen plantas asociadas a cultivos con propiedades fungistático o biostático que redujeron más del 50% el crecimiento micelial del patógeno, concordando con (Sangeetha, 2013), quien menciona que la mayoría de los extractos derivados de especies vegetales produce una reducción en la velocidad de crecimiento de este patógeno, afectando a la membrana celular del patógeno

El tratamiento con extracto de ortiga, obtenido por el método de infusión, en dosis alta (50%), fue la que provocó el menor crecimiento micelial de *F. oxysporum*, por lo que la planta posee al menos un efecto biostático, similar al trabajo de investigación realizado por (Uscategui, 2013) ; (Chavez & Aquino, 2012), quienes establecieron que el extracto de ortiga tiene efecto inhibitorio sobre *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*

El extracto de albahaca y ruda, en concentración 50%, también redujeron el crecimiento micelial provocando un efecto fungistático, esto coincide con (Politeo, Jukic, & Milos, 2007) y (Fernandez, Viña, Murilli, & Mendez, 2007).

El hecho que *F. oxysporum* haya resultado con un menor crecimiento micelial sobre la ortiga indica que la presencia de ciertos principios activos que contienen las hojas como quinonas, taninos y flavonoides, estos compuestos secundario biológicamente activos con propiedad fungistáticos (Quisi, 2013). Mientras que, el resto de los extractos que presentaron un promedio de crecimiento micelial superior que en la ortiga, no se reportan datos que contengan quinonas; sin

embargo, la presencia de alcaloides, flavonoides, acridona y fenoles le confieren sus propiedades de biocontroladoras a dichas especies (Ramos, Sanabria, Rodriguez, & Ulacio, 2012) ; (Garcias, Martinez, Ortega, & Castro, 2010). Aunque los dos métodos de extracción dieron resultados positivos, el efecto sobre el hongo que directamente proporcional a la concentración del extracto, lo cual coincide con (Viveros & Castaño, 2006) quienes mencionan que su efecto se reduce al disminuir la concentración del extracto.

La presente investigación demostró que es posible disponer de una metodología sencilla para la preparación de extractos vegetales con propiedades antifungicas, abriendo posibilidades interesantes para los productores. Un aspecto a tener en cuenta es la metodología de extracción y la concentración de cada especie a considerar como se observó con la alta significancia estadística encontrada con las interacciones.

CAPITULO V
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Todos los extractos vegetales presentaron un efecto antifúngico con *F. oxysporum* en condiciones controladas, con lo que quedó demostrado que un método de extracción sencillo es capaz de extraer los principios activos en cantidades suficientes como para intentar control.

- Los extractos que presentaron mayor control sobre *F. oxysporum* con ambos métodos de extracción fue la ortiga (*U. dioica*) y la ruda (*R. graveolens*) utilizando como método de extracción la infusión en las dosis media y alta.

- Existe interacción entre las especies usadas, el método de extracción y la concentración, lo que debe tomarse en cuenta en futuros estudios.

- La ortiga (*Urtica dioica*) fue la especie que presentó un efecto fungistático con ambos métodos de extracción

5.2. Recomendaciones

- Usar el extracto de ortiga (*Urtica dioica*), flor de muerto (*Tagetes erecta*), albahaca (*Ocimum basilicum***)** y ruda (*Ruta graveolens*) contra *Fusarium oxysporum* en el cultivo de maracuyá, y otros que son severamente afectados por este patógeno para determinar su eficacia en campo.

- Continuar pruebas *in-vitro* de estas especies contra otros patógenos, especialmente del suelo, como *Rhyzoctonia* spp, *Phytophthora* y otros.

- Ampliar estos estudios con todas las especies usando concentraciones más altas (75 y 100%).

- Explorar posible acción de estas especies para recuperar suelos contaminados con este hongo.

- Es necesario que en pruebas con otras especies vegetales, se determine en condiciones controladas, el método adecuado (maceración o infusión) para extraer los principios activos y usarlos para control de plagas.

CAPITULO VI
6. BIBLIOGRAFIAS

6.1. Literatura citada

Alfonso, B., Almanza, F., Hernandez, F., & Mendoza, M. (Abril de 2005). Efecto inhibitorio de extractos vegetales acuosos sobre *Rhizoctonia solani* Kuhn *in intro*. (M. Capo, & J. Valdes, Edits.) *Agraria Nueva Epoca, 1*(1), 1-7.

Apocada, M. (2006). Enfermedades causada por *Fusarium oxysporum* en el tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Enfermedades de hortalizas*.

Ascon J & Talon, M. (2001). Relaciones entre el metabolismo primarios y secundarios de las plantas. En M. Ascon J & Talon, *Fundamento de la biologia vegetal* (págs. 261-262). Madrid: Interamericana.McGraw Hill.

Barnett, H., & Hunter, B. (1999). *Ilustrados generos de hongos imperfectos.* (S. A. Fitopatologia, Ed.) Minnesota.

Bravo, L., Bermudez, k., & Montes, R. (2000). Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes quimicos. *Manejo integrado de Plagas, 57*, 29-34.

Carrillo, L. (2003). *http://www.unsa.edu*. Recuperado el 15 de Enero de 2013, de http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/htextocubierta.pdf

Chavez, A., & Aquino, A. (2012). Control de los hongos del suelo *Rhizoctonia sp*., *Fusarium sp*. y *Sclerotium sp*. con extractos vegetales. *Investigacion agrarias, 14*(1), 17 -23.

Duarte, Y., Pino, O., Infante, D., Sanchez, Y., & Travieso, M. (2013). Efecto *in vitro* de acetite esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Porteccion vegetal, 28*(01), 54-59.

Fernandez, K., Viña, A., Murilli, E., & Mendez, J. (2007). Actividad antioxidante y antimicrobial de los volátiles de cuatro variedades de albahaca cultivas en el departamento de Tolima. *Scientia et Technica.*(33), 339 - 341.

Garces, E., Orozco, M., Bautista, G., & Valencia, F. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta de conocer. *Acta biologia Colombiana, 6*(1), 7-25.

Garcias, C., Martinez, A., Ortega, J., & Castro, F. (2010). Componentes quimicos y su relación con las actividades biologicas de algunos extractos vegetales. *Quimica Viva, 9*(2), 86 - 96.

Hernandez, E., & Vasquez , J. (2007). Evaluación de tres extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporoides* (Penz) & Sacc.) en tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*. 86 p.

Leslie, J., & Summerell, B. (2006). *Fusarium*, manual de laboratorio. 113 - 228.

Lizcano, C. (2007). *http://www.javeriana.edu.com*. Recuperado el 14 de Enero de 2013, de http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis100.pdf

Nelson, P., Toussoun, T., & Marasas, W. (1983). Especies de *Fusarium*. *Manual ilustrado para identificacion*, 193.

Pawar, V., & Thaker, S. (2007). Evaluacion de *Fusarium oxysporum* f. sp. Cicer y *Alternaria porri*, con efectos de algunos aceites esenciales. *Microbiologia, 23*, 10-11.

Philogenet , B., Regnault, C., & Vicente, C. (2004). Porductos fitosanitario insecticidas de origen vegetal. *Mundi*, 1-18.

Politeo, O., Jukic, M., & Milos, M. (2007). Composición química y la capacidad antioxidante de agliconas libres volátiles de albahaca (*Ocimum basilicum*) en comparación con el aceite esencial. *Qumica de los alimentos, 101*(1), 379 - 385.

Pupo, Y., Kalombo, D., Herrera, L., Malherios, D., & Varga, B. (2011). Efecto de extractos vegetales en el crecimiento y germinación de esporas de *Alternaria solani* (E. & M.) J. & G. en condiciones in vitro. *Micologia, 28*(01), 1-2.

Quisi, R. (25 de Julio de 2013). *http://dspace.espoch.edu*. Recuperado el 05 de Marzo de 2014, de http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/2594

Ramirez, A., & Rodriguez, A. (1995). *http://190.60.31.203:8080/pdf*. Recuperado el 13 de enero de 2013, de http://190.60.31.203:8080/jspui/bitstream/123456789/3825/1/054.pdf

Ramos, N., Sanabria, M., Rodriguez, D., & Ulacio, D. (2012). Efecto del extracto etanolico de albahaca genovesa (*Ocimum basilicum* var. Genovese) sobre *Cercospora* apii Freseen y el tizon temprano del celery (*Apium graveolens*). *Revista Cientifica UDO Agricola, 12*(2), 472 - 478.

Sandoval, P. (2006). Busqueda de plantas con propiedades fungicida/fungistaticas para el control *in vitro* de *Botrytis cinerea* Pers. *Tesis* . Chile.

Sangeetha, G. (2013). La actividad antimicrobiana de las plantas medicinales y la inducción de compuestos relacionados con la defensa en el banano frutos cv. Robusta contra los agentes patógenos de la pudrición de la corona. *Control Biologico, 64*(1), 16 - 25.

Scholaen, S. (2005). Manejo integrado de plagas en hortalizas. 24-31.

Srivastava, A., & Bihari, B. (1997). Estudios sobre propiedades biofungicidas de extractos de hoja de algunas plantas. *Fitopatologia, 50*(3), 40 - 411.

Uscategui, Y. (16 de Diciembre de 2013). *http://intellectum.unisabana.edu.* Recuperado el 05 de Marzo de 2014, de http://intellectum.unisabana.edu.co:8080/jspui/handle/10818/9330

Viveros, J., & Castaño, J. (2006). Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis Morelet*. *Agronomia, 14*(1), 37 - 50.

CAPITULO VII
7. ANEXOS

Anexo 1 EFICACIA DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN UTILIZADO PARA LA PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE *Fusarium oxysporum*. UTEQ, 2013.

METODO	PROMEDIO (mm)
Maceración	34,17 a
Infusión	32,33 b

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes evaluado con la prueba de Tukey (P<0,05

Anexo 2 DIFERENCIAS ESTADÍSTICA ENTRE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS VEGETALES SOBRE *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013.

CONCENTRACION	PROMEDIO (mm)
10%	36,38 a
25%	31,75 b
50%	31,63 b

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes evaluado con la prueba de Tukey (P<0,05)

Anexo 3 PROMEDIO DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum* SOBRE CUATRO EXTRACTOS VEGETALES. UTEQ, 2013.

EXTRACTOS	PROMEDIO (mm)
Testigo	90,00 a
Flor de muerto	40,25 b
Ruda	33,33 c
Albahaca	32,46 c
Ortiga	26,96 d

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes evaluado con la prueba de Tukey (P<0,05)

Anexo 4 EFECTO DE LA INTERACCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES * MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Fusarium oxysporum.* UTEQ, 2013.

EXTRACTO	METODO	PROMEDIO (mm)
Testigo		90,00 a
Flor de muerto	Infusión	41,00 b
Ruda	Maceración	39,67 bc
Flor de muerto	Maceración	39,50 bc
Albahaca	Infusión	35,25 c
Albahaca	Maceración	29,67 d
Ortiga	Maceración	27,83 d
Ruda	Infusión	27,00 d
Ortiga	Infusión	26,08 d

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes evaluado con la prueba de Tukey (P<0,05)

Anexo 5 PROMEDIO DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum* EN LA INTERACCION EXTRACTO POR CONCENTRACION. UTEQ, 201.3

EXTRACTO	CONCENTRACION	PROMEDIO (mm)	
TESTIGO		90,00	a
Flor de muerto	50%	41,75	b
Flor de muerto	25%	39,50	bc
Flor de muerto	10%	39,50	bc
Albahaca	10%	38,38	bcd
Ruda	10%	35,50	bcde
Ruda	50%	33,00	cde
Ortiga	10%	32,13	cdef
Ruda	25%	31,50	defg
Albahaca	25%	30,50	defg
Albahaca	50%	28,50	efg
Ortiga	25%	25,00	fg
Ortiga	50%	23,75	g

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes evaluado con la prueba de Tukey (P<0,05)

Anexo 6 PROMEDIO DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum* EN LA INTERACCION EXTRACTOS-METODOS-CONCENTRACIONES. UTEQ, 2013.

EXTRACTO	METODO	CONCENTRACION	PROMEDIO (mm)
TESTIGO			90,00 a
Albahaca	Infusión	10%	45,75 b
Flor de muerto	Infusión	50%	44,00 bc
Flor de muerto	Maceración	10%	43,00 cd
Flor de muerto	Infusión	25%	43,00 cd
Ruda	Maceración	10%	41,00 de
Ruda	Maceración	50%	40,00 ef
Flor de muerto	Maceración	50%	39,00 ef
Ruda	Maceración	25%	38,00 fg
Flor de muerto	Infusión	10%	36,00 g
Flor de muerto	Maceración	25%	36,00 g
Ortiga	Maceración	10%	32,75 h
Ortiga	Infusión	10%	31,50 hi
Albahaca	Maceración	10%	31,00 hi
Albahaca	Infusión	25%	31,00 hi
Ruda	Infusión	10%	30,00 ij
Albahaca	Maceración	25%	30,00 ij
Albahaca	Infusión	50%	29,00 ij
Albahaca	Maceración	50%	28,00 jk
Ruda	Infusión	50%	26,00 kl
Ortiga	Maceración	25%	26,00 kl
Ruda	Infusión	25%	25,00 lm
Ortiga	Maceración	50%	24,75 lm
Ortiga	Infusión	25%	24,00 lm
Ortiga	Infusión	50%	22,75 m

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes evaluado con la prueba de Tukey (P<0,05)