UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium* EN HORTALIZAS DE LA PARROQUIA DE SAN JOAQUÍN

TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO

AUTOR:

JORGE ENRIQUE CÁRDENAS VERDEZOTO

DIRECTORA:

ING. AÍDA ANTONIETA CAZAR RAMÍREZ

CUENCA - ECUADOR

2014

CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium* EN HORTALIZAS DE LA PARROQUIA DE SAN JOAQUÍN

RESUMEN

Los daños causados por *Fusarium* son un gran limitante para los cultivos de cebolla y ajo en Ecuador y representan grandes pérdidas económicas a los agricultores en la zona austral del país. Por este motivo se consideró como viable la aplicación de aceites esenciales puros y combinados para su control. Mediante la técnica de arrastre con vapor se obtuvo el aceite esencial de cuatro plantas que crecen en la zona. Para comprobar la actividad biocontroladora se realizaron ensayos in vitro y en invernadero. La dosis mínima inhibitoria se determinó a través de pruebas en placas Elisa. Se comprobó que los aceites esenciales de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus),* Cedrón *(Lippia citriodora)* y Guarmi Poleo *(Clinopodium spp.)* controlan el crecimiento de *Fusarium,* estableciendo como el aceite más efectivo el obtenido de la Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus),* en una dosis mínima de 1,65µl.

PALABRAS CLAVE: *Fusarium*, Guarmi Poleo, Aceites esenciales, Bioensayos in vitro, Ensayos en invernadero.

Ing. Aida Antonieta Cazar Ramirez
Director de tesis

Dr. Rene Benjamín Zuñiga Peralta
Director de Escuela

Jorge Enrique Cardenas Verdezoto
Tesista

ABSTRACT

BIOLOGICAL CONTROL OF *Fusarium* IN VEGETABLES AT SAN JOAQUIN PARISH

The damage caused by *Fusarium* is a major constraint to onion and garlic crops in Ecuador and represents great economic losses to farmers in the southern part of the country. For this reason we considered feasible the application of pure and combined essential oils to its control. By steam stripping technique it was possible to obtain the essential oil of four plants that grow in the area. In order to check the bio-control activity in-vitro and greenhouse tests were performed. The minimum inhibitory dose was determined by an Elisa (*enzyme-linked immunosorbent assay)* blocking test. It was found that the essential oils of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*), Lemon Verbena (Lippia citriodora) and *Guarmi Poleo* (Clinopodium spp.) control the growth of *Fusarium*, establishing that the most effective oil is the one obtained from Lemon Grass (Cymbopogon citratus) at a minimum dose of 1.65 µl.

KEYWORDS: *Fusarium*, *Guarmi Poleo*, Essential Oils, In Vitro Bioassays, Greenhouse Trials.

Ing. Aida Antonieta Cazar Ramírez
Thesis Director

Dr. Rene Benjamín Zúñiga Peralta
School Director

Jorge Enrique Cárdenas Verdezoto
Author

UNIVERSIDAD DEL AZUAY
DPTO. IDIOMAS

Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....ii

ABSTRACT.....iii

ÍNDICE DE CONTENIDOS iv

ÍNDICE DE TABLAS E ILUSTRACIONES..... ix

ÍNDICE DE ANEXOS xi

INTRODUCCIÓN 1

CAPITULO I: ACEITES ESENCIALES..... 4

1.1 Generalidades..... 4

1.2 Propiedades..... 5

1.3 Métodos de Extracción..... 6

1.3.1 Destilación por arrastre con vapor 6

1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS PARA LA OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES..... 8

1.4.1 HIERBA LUISA 8

1.4.1.1 Características Botánicas..... 8

1.4.1.2 Condiciones de Crecimiento y Cultivo 9

1.4.1.3 Usos..... 9

1.4.1.4 Propiedades Medicinales 9

1.4.1.5 Principios Activos 9

1.4.2 CEDRÓN 10

1.4.2.1 Características Botánicas 10

1.4.2.2 Condiciones de Crecimiento y Cultivo 11

1.4.2.3 Usos 11

1.4.2.4 Propiedades Medicinales 11

1.4.2.5 Principios Activos 12

1.4.3 ROMERO 12

1.4.3.1 Características Botánicas 13

1.4.3.2 Condiciones de Crecimiento y Cultivo 13

1.4.3.3 Usos 13

1.4.3.4 Propiedades Medicinales 13

1.4.3.5 Principios Activos 14

1.4.4 GUARMI POLEO 14

1.4.4.1 Características Botánicas 15

1.4.4.2 Condiciones de Crecimiento y Cultivo 15

1.4.4.3 Usos 15

1.4.4.4 Propiedades Medicinales 15

1.4.4.5 Principios Activos 16

1.5 Aceites esenciales como biocontroladores 16

CAPITULO II: CULTIVOS DE CEBOLLA Y AJO 18

2.1 La Cebolla 18

2.1.1 Clasificación Taxonómica 19

2.1.2 Descripción botánica 19

2.1.2.1 Tallo 19

2.1.2.2 Hoja 20

2.1.2.3 Bulbo 20

2.1.2.4 Raíz 20

2.1.3 Ecología 20

2.2 El Ajo 22

2.2.1 Clasificación Taxonómica 22

2.2.2 Descripción botánica 23

2.2.3 Ecología 23

2.3 Labores culturales 24

2.3.1 Preparación de Suelos 24

2.3.2 Fertilización 24

2.3.3 Control de Malezas 25

2.3.4 Riegos 25

2.4 Enfermedades 26

2.4.1 *Fusarium* 26

2.4.1.1 Clasificación taxonómica 28

2.4.1.2 Características de la Enfermedad 29

2.4.1.3 Condiciones favorables de Proliferación 31

2.4.1.4 Medidas de Control 32

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS 34

3.1 Preparación de material vegetal 34

3.2 Extracción de aceites esenciales 34

3.3 Aislamiento de *Fusarium sp.* 35

A. Aislamiento a partir de muestras vegetales 35

B. Purificación del *Fusarium sp.* 36

C. Mantenimiento de cultivos puros 36

D. Extracción de Esporas 36

E. Identificación del Patógeno 37

3.4 Bioensayos in Vitro 37

3.4.1 Bioensayos con Aceites Esenciales Puros 37

3.5 Elaboración de mezclas de aceites esenciales. 39

3.6 Ensayo en Invernadero 41

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN 44

4.1 Rendimiento de los aceites esenciales 44

4.2 Diámetro del halo de inhibición 45

4.3 Porcentaje de inhibición....47

4.4 Bioensayos con aceites esenciales puros....48

4.5 Elaboración de mezclas de aceites esenciales....51

4.6 Ensayo en Invernadero....51

4.7 Numero de Plantas Sanas y Atacadas....53

4.8 Número de Lesiones....55

DISCUSIÓN....57

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES....60

Conclusiones....60

Recomendaciones....62

BIBLIOGRAFÍA....63

ÍNDICE DE TABLAS E ILUSTRACIONES

Esquema 1.- Distribución de bioensayo de aceites esenciales puros. **.....39**

Esquema 2.- Diseño de mezclas de aceites esenciales. **.....40**

Esquema 3.- Diseño de mezclas de aceites esenciales. **.....41**

Esquema 4.- Tratamientos utilizados en el ensayo de invernadero con dispersante Sodio Dodecil Sulfato (SDS) al 2%. **.....42**

Esquema 5.- Rendimiento de los aceites esenciales por kilogramo de especie vegetal. **.....44**

Esquema 6.- Diámetro del halo de inhibición… **……..46**

Esquema 7.- Porcentaje de inhibición. **.....47**

Esquema 8.- Resultados del bioensayo de aceites esenciales puros **.....49**

Esquema 9.- Dosis mínimas de efectividad de los aceites esenciales. **.....50**

Esquema 10.- Altura promedio de las plantas. **.....52**

Esquema 11.- Numero de plantas sanas y atacadas **.....53**

Esquema 12.- Numero de lesiones **.....55**

Gráfico 1.- Rendimiento de los aceites esenciales **.....45**

Gráfico 2.- Diámetro del halo de inhibición **.....46**

Gráfico 3.- Porcentaje de inhibición **.....47**

Gráfico 4.- Dosis mínima de efectividad **.....50**

Gráfico 5.- Altura promedio de las Plantas **.....53**

Gráfico 7.- Promedio de las lesiones **.....56**

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: EXTRACCION DE ACEITES ESENCIALES .....

ANEXO 2: AISLAMIENTO DE *FUSARIUM SP.*.....

ANEXO 3: CRECIMIENTO DE *FUSARIUM SP.* .....

ANEXO 4: EXTRACCION DE ESPORAS.....

ANEXO 5: ELABORACION DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES.....

ANEXO 6: BIOENSAYO CON ACEITES ESENCIALES PUROS.....

ANEXO 7: DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION .....

ANEXO 8: PORCENTAJE DE INHIBICION.....

ANEXO 9: TABLA DE CRECIMIENTO (EN cm).....

ANEXO 10: ENSAYO EN INVERNADERO (SIEMBRA) .....

ANEXO 11: RESULTADOS.....

Cárdenas Verdezoto Jorge Enrique

Trabajo de Graduación

Ing. Aída Antonieta Cazar Ramírez, Ms. C

Junio del 2014

CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium* EN HORTALIZAS DE LA PARROQUIA DE SAN JOAQUÍN

INTRODUCCIÓN

La parroquia de San Joaquín, ubicada al occidente de la ciudad de Cuenca, cuenta con aproximadamente 300 hectáreas de terreno destinadas al cultivo de legumbres, hortalizas y granos. Un alto porcentaje de los cultivos corresponde a plantaciones de ajo y cebolla, las cuales a pesar de los cuidados de los agricultores, se han visto afectados por plagas y enfermedades que afectan la calidad de sus productos y generan grandes pérdidas económicas.

Los agricultores han recurrido tradicionalmente al uso de pesticidas y plaguicidas a base de compuestos químicos para el control de las plagas y enfermedades, que a más de los elevados costos que tienen, traen consigo consecuencias negativas como la persistencia en el suelo y generan daños en la salud de los agricultores y de los consumidores.

Actualmente, las plantaciones de ajo (*Allium sativum L.)* y cebolla (*Allium cepa)* están siendo atacadas por *fusarium*. Este hongo provoca retardos en el crecimiento de las mismas y es el responsable del amarillamiento y pudrición de las plantas (Quilambaqui, 2005).

Por otra parte, la demanda de productos orgánicos ha aumentado notablemente en los últimos años, tanto a nivel nacional como internacional, y este hecho ha obligado a los agricultores a alejarse de las prácticas comunes basadas en el uso de químicos. Los pequeños productores están siendo incentivados a convertirse en agro ecologistas, usando en sus cultivos productos naturales inofensivos para la salud.

Frente a esta situación, es necesario encontrar nuevas alternativas biológicas para el manejo de enfermedades, Se requieren productos que estén dentro de los nuevos requerimientos de los mercados, que sean accesibles para los agricultores y cuya efectividad este comprobado. Beneficiando así tanto a los agricultores, que pueden incursionar en nuevos mercados, como a los consumidores que obtienen productos de calidad y libres de químicos.

El uso de aceites esenciales como biocontroladores está siendo ampliamente estudiado y su efectividad se ha probado con diversas investigaciones. Por esta razón, el presente trabajo evalúa la efectividad de los aceites esenciales de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), Romero (*Rosmarinus officinalis L.*), Cedrón (*Lippia citriodora*) y Guarmi Poleo (*Clinopodium spp.*) en el control de *Fusarium*, tanto en aplicaciones individuales como mezclas de los mismos. Se evalúa su capacidad para

inhibir el crecimiento del hongo y cuál es la dosis mínima a la que cada aceite esencial es efectivo.

La obtención de los aceites esenciales se realizó con el método de destilación por arrastre de vapor. Para probar la eficiencia de los mismos se realizaron primero pruebas “In Vitro” con aceites esenciales puros y sus mezclas. Para determinar la dosis mínima inhibitoria se hicieron pruebas utilizando placas ELISA.

Todos estos procedimientos se desarrollaran en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad del Azuay.

Para las pruebas en invernadero, se inoculó *Fusarium* en plantas de cebolla y sobre estas se aplicaron las mezclas que mostraron mejores resultados en las pruebas de laboratorio.

CAPITULO I

ACEITES ESENCIALES

1.1 Generalidades

Los aceites esenciales o esencias vegetales son parte del metabolismo de un vegetal, generalmente están compuestos por terpenos, que están asociados o no a otros componentes; la mayoría de ellos son volátiles. Los componentes de los aceites esenciales desempeñan roles importantes en el metabolismo vegetal, actuando como fitoalexinas, antibióticos y antialimentarios (Bandoni, 2000)

Los aceites esenciales son líquidos volátiles; en su gran mayoría son insolubles en agua y fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales. Por lo general no son oleosos al tacto y pueden tener entre sus componentes químicos tales como alcohol, aldehídos, cetonas, lactonas y óxidos.

Generalmente, estos aceites se encuentran a temperatura ambiente, y por su volatilidad, pueden ser extraídos por destilación por arrastre con vapor, aunque existen otros métodos para su obtención.

La mayoría de los aceites esenciales son incoloros o ligeramente amarillos en su forma pura y recién destilados, cambiando de color cuando son expuestos al aire, por

oxidación. Su densidad es inferior a la del agua y casi siempre tienen un índice de refracción elevado.

Estos aceites se encuentran en forma de pequeñas gotas en el interior de las glándulas secretoras de los tejidos y pueden provenir de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y cortezas de las plantas. En general, son los que dan a las plantas su olor característico.

Estos extractos o esencias vegetales desempeñan varias funciones importantes, entre las que se encuentran las de defensa contra parásitos, brindan ayuda en casos de escasez hídrica, sirven de carnada para atraer insectos y aves; y ahuyentan a insectos perjudiciales.

1.2 Propiedades

Respecto a las propiedades de los aceites esenciales, se han realizados diversas investigaciones, llegándose así a concluir que estos extractos poseen cualidades antibacterianas, antimicóticas, antiespasmódicas, antiparasitarias, antivirales, insecticidas.

Gracias a estas propiedades, pueden ser utilizados para el control de diversas enfermedades en plantas hortofrutícolas, sobre todo por el efecto inhibitorio que estos aceites producen en el desarrollo de microorganismos.

Actualmente, y gracias a la gran cantidad de sustancias químicas que poseen los aceites vegetales, se están realizando múltiples investigaciones que buscan optimizar

el uso de estas sustancias, principalmente como preservantes, antioxidantes y como biocontroladores.

1.3 Métodos de Extracción

Entre los métodos más utilizados para la extracción de aceites esenciales a partir de plantas, se citaran los siguientes:

- Destilación con agua o hidroestilación.
- Destilación por arrastre con vapor.
- Destilación previa maceración.
- Destilación con agua y con vapor.
- Destilación sometida a una degradación térmica.
- Expresión.

1.3.1 Destilación por arrastre con vapor

Es el método más utilizado, especialmente en la industria, para la obtención de aceites esenciales por las ventajas que este presenta en comparación con otras técnicas. Entre las bondades de este método, podemos resaltar el hecho de que no requiere el uso de equipos sofisticados ni implique grandes gastos en cuanto a materiales, por otra parte es un método que garantiza que el aceite esencial no se recaliente y no pierda así sus propiedades.

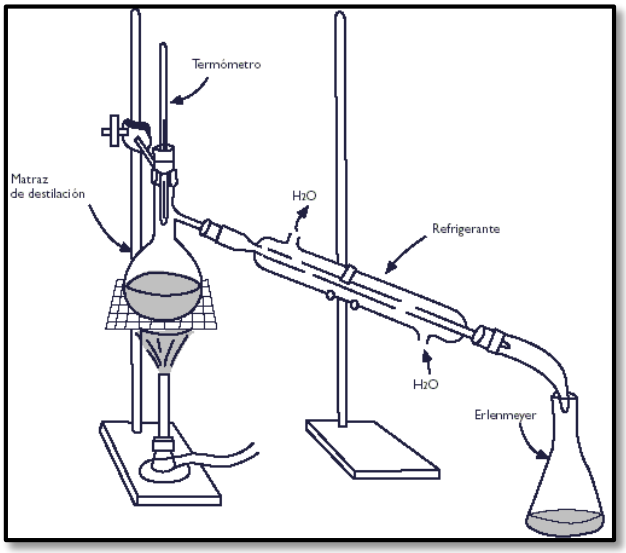
A través de la destilación por arrastre con vapor se separa las sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles. Para la extracción de

aceites esenciales con este método se puede emplear tanto plantas frescas como secas.

Esta técnica consiste en una vaporización a temperaturas menores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua. El vapor tiene dos funciones, la de calentar la mezcla hasta el punto de ebullición y la de disminuir la temperatura por adicionar la tensión de vapor que se inyecta a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales (Bandoni, 2000).

La destilación por arrastre de vapor consiste en colocar el material vegetal en un estanque, por donde se pasa el vapor de agua desde abajo hacia arriba. El vapor que sube por el estanque arrastra los aceites esenciales. Esta mezcla gaseosa producida debe ser condensada para volver a su fase liquida y posteriormente, las dos sustancias inmiscibles, agua y aceite, se deben separar en un decantador.

Figura 1: Destilación por arrastre de vapor



1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS PARA LA OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES

1.4.1 HIERBA LUISA

Figura 2: Hierba Luisa *(Cymbopogon citratus)*

Nombre Científico: *Cymbopogon citratus*

Sinónimo: *Andropogon Schoenanthus*

Nombre Vulgar: Hierba Luisa, caña santa, cañita de limón.

Familia Botánica: Poaceae (Graminae)

Origen: Sureste Asiático

1.4.1.1 Características Botánicas

Hojas: Agrupadas cerca de la base, hasta un metro de longitud, con bordes cortantes, con aroma alimonado, ramas alargadas y un tanto penduladas.

Flores: Se reúnen en espigulas sésiles y pediceladas.

Tallos: Muy ramificados de uno a dos metros de alto con los nudos ceríferos.

Raíces: Posee un eje central del que se ramifican varios rizomas.

1.4.1.2 Condiciones de Crecimiento y Cultivo

Prefiere el suelo areno-arcilloso, necesita de abundantes lluvias y requiere clima tropical o subtropical, la mejor adaptación se da en zonas en las que la temperatura rodea los 26ºC.

1.4.1.3 Usos

Para la obtención de esencias, para la separación de citral, sirve para mejorar la calidad del suelo y se la utiliza como planta para terraplenar.

1.4.1.4 Propiedades Medicinales

Aromático, carminativo, digestivo, expectorante, estimulante, antiespasmódico, tranquilizante, analgésico, antiinflamatorio, sedante, diurético (Cordero, 1911).

1.4.1.5 Principios Activos

Las hojas contienen aceite esencial (0.5 – 0.7%) citral, geranial y neral. Triterpenoides (cimbopogana, cimbopogonal) y flavonoides (luteolina, isoorientina y derivados).

El aceite esencial contiene: citral (65 – 72%), mirceno (12.7%), acetato de geranillo (3.0%), metil heptenosa (2.6%), gerenial (1.8%), elemol (1.2%). (Agapito & Sung, 2005).

1.4.2 CEDRÓN

Figura 3: Cedrón (*Lippia citriodora)*

Nombre Científico: *Lippia citriodora*

Nombre Vulgar: María Luisa, Cedrón, Cidron

Familia Botánica: Verbenaceae

Origen: Región montañosa de Argentina

1.4.2.1 Características Botánicas

Hojas: Simples, rugosas, reunidas en verticillos de tres, limbo un poco dentado, de color verde pálido, presenta una nervadura mediana de la que se destaca una serie de nervaduras secundarias paralelas.

Flores: Se ubican al extremo de los tallos en espigas agrupadas en panojas, son pequeñas, blancas por fuera y azules violáceo por dentro.

Tallos: Largos, leñosos, angulosos y provistos de finas rayas lineares.

Raíces: De tipo fibrosa, de color blanco, las cuales forman una cabellera alrededor del nudo que se desarrolla.

Fruto: Es una drupa que encierra dos granos que a veces no llegan a la madurez.

1.4.2.2 Condiciones de Crecimiento y Cultivo

Crece en zonas húmedas, a orillas de los ríos y en terrenos desolados, en suelos de mediana consistencia, sueltos, permeables, profundos. Se ve favorecido por una buena iluminación. Puede ser peligrosa por el alto contenido de cetona (Muñoz, 2002).

1.4.2.3 Usos

Se utiliza para hacer esencias, también para remedios caseros.

1.4.2.4 Propiedades Medicinales

Es un estimulante del apetito, mejora las digestiones lentas, sirve como tratamiento para el estrés, es carminativo, antiespasmódico y sedante (Cordero, 1911).

1.4.2.5 Principios Activos

Las hojas y flores contienen ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, flacones y alcaloides.

Su aceite esencial contiene cíñelo, citral (20 – 39%), 1-limoneno (10 – 15%), sesquiterpenos (40 – 45%), linalol (4 – 11%), geranial (Agapito & Sung, 2005).

1.4.3 ROMERO

Figura 4: Romero *(Rosmarinus officinalis)*

Nombre Científico: *Rosmarinus officinalis*

Nombre Vulgar: Romero

Familia Botánica: Lamiaceae (Labiatae)

Origen: Mar Mediterráneo

1.4.3.1 Características Botánicas

Hojas: Finas como agujas y flexibles, de color verde oscuro en la parte superior y grisáceo en la inferior.

Flores: Pequeñas e irregulares de color entre blanco y azul pálido.

Tallos: Leñoso y cilíndrico de color café, de mayor diámetro en la base.

Raíces: Fasciculada, desarrollada de los nudos del tallo en la cual forman una cabellera.

1.4.3.2 Condiciones de Crecimiento y Cultivo

Florece durante todo el año, solo en ocasiones da fruto pero se desconoce si sus semillas son viables. Se da bien en suelos cultivados y es sensible a la humedad

1.4.3.3 Usos

En los campos, actúa como repelente de insectos sobretodo en los cultivos de zanahoria y coles y evita la erosión causada por la lluvia y el viento en los suelos donde se asienta (Cordero, 1911).

1.4.3.4 Propiedades Medicinales

Antiséptico, afrodisiaco, colagogo, estimulante del apetito, astringente, antiespasmódico, narcótico, diurético, hipertensivo, tónico (Agapito & Sung, 2005).

1.4.3.5 Principios Activos

Las hojas contienen aceite esencial (1.5 – 2.5%), alcanfor de romero compuesto de pineno, canfeno, ciñelo, borneol, acetato de benzilo, limoneli, falandreno, mirceno. Además alcaloides deterpénicos, flavonas y taninos (Agapito & Sung, 2005).

1.4.4 GUARMI POLEO

Figura 5: Guarmi Poleo *(Clinopodium spp.)*

Nombre Científico: *Clinopodium spp.*

Nombre Vulgar: Guarmi poleo

Familia Botánica: Lamiaceae

Origen: Sudáfrica, Australia

1.4.4.1 Características Botánicas

Hojas: Ovaladas, de color verde grisáceo que se disponen una en frente de otra y tienen forma lanceolada.

Flores: En espiras características, pueden ser rosas, violetas y blancas.

Tallos: Liso redondeado y aromático.

Raíces: Rastreras.

1.4.4.2 Condiciones de Crecimiento y Cultivo

Se da bien en zonas húmedas, el periodo de floraciones entre junio y octubre. Crece sobre todo a orillas de los ríos y en terrenos desolados. Puede ser peligrosa por su alto contenido de cetona

1.4.4.3 Usos

Se utiliza como repelente y para aplicaciones en heridas, además cuando se quema partes vegetativas de esta especie, su humo provoca la muerte de insectos y parásitos internos. Se ha comprobado además, que el aceite esencial de esta planta, es toxico para los seres humanos (Stengele & Stahl-Biskup, 1993)

1.4.4.4 Propiedades Medicinales

Tiene propiedades digestivas, antiespasmódicas, carminativa, diurética, expectorante y antitusígeno (Cordero, 1911).

1.4.4.5 Principios Activos

Aceite esencial (0.5 – 1%): pulegona (70 – 90%), mentona, isomentona, piperitenona, alfa y beta-pineno, limoneno (Agapito & Sung, 2005).

1.5 Aceites esenciales como biocontroladores

En la actualidad, la población mundial se preocupa mucho más que en el pasado por proteger al medio ambiente, tiende a la conservación de los recursos naturales y se interesa más en las prácticas orgánicas. Evita en la medida de lo posible la utilización de productos que hayan sido tratados con químicos.

Por esta razón, existe un creciente interés por sustituir a los químicos sintéticos por aplicaciones de aceites esenciales como una alternativa más natural para el control de fitopatógenos.

Muchas especies vegetales producen aceites esenciales, los cuales juegan un papel importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra los fitopatógenos (Mihaliak, Gershenzon, & Croteau, 1991).

Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus componentes, a más de sus propiedades fungicidas, son inocuos para el medio ambiente, para los consumidores y para el control de enfermedades postcosecha (Wilson, Solar, & Ghaouth, 1997)

Existen múltiples trabajos de investigación encaminados a evaluar la capacidad de los aceites esenciales como preservantes de alimentos, biocontroladores de microorganismos y virus fitopatógenos, además de determinar la dosis mínima a la que el aceite esencial presenta actividad biológica (Dorman & Deans, 1999).

CAPITULO II

CULTIVOS DE CEBOLLA Y AJO

Figura 6: Cebolla *(Allium cepa)*

2.1 La Cebolla

La cebolla es una hortaliza cuyo bulbo está formado por la base de las hojas. De esta planta se aprovechan sus bulbos y los tallos verdes, los que son utilizados como alimento y para la elaboración de recetas medicinales. Se la considera originaria del secas de Asia, especialmente Palestina y la India; su consumo se remonta a más de 4000 años.

Esta planta pertenece al género *Allium* y en éste se encuentran una gran variedad de plantas hortícolas que se cultivan por sus bulbos o follaje y se emplean como condimento, alimento o medicina.

Debido a la gran variedad genética y a la facilidad con la que se dan los cruzamientos espontáneos entre diversas especies de este género, entre los parientes cercanos de la cebolla *(Allium cepa L)* están: puerro o ajo de cabeza *(A. ampeloprasum L* o *Prrum),* Ajo *(A. sativum L)* y el cebollin *(A. schoenoprasum L).*

2.1.1 Clasificación Taxonómica

Sub Reino:	Embryophyta
División:	Fanerógamas
Sub División:	Angiosperma
Clase:	Monocotiledónea, Liliopsida
Orden:	Liliales
Familia:	Alliaceae
Genero:	Allium
Especie:	Cepa

2.1.2 Descripción botánica

La cebolla es una planta bianual, de polinización cruzada y que se desarrolla a partir de una semilla hasta formar un bulbo maduro. Posteriormente y bajo condiciones propicias de clima, se da la floración y se produce la división de bulbos. Generalmente alcanza una altura promedio de 35 centímetros (CENTA, 2003).

2.1.2.1 Tallo

El verdadero tallo está ubicado en la base del bulbo y de él brotan las yemas, las hojas y las raíces.

2.1.2.2 Hoja

La hoja o falso tallo es tubular, erecta, semicilíndrica y de color verde. Después de que aparece la primera hoja, las demás se desarrollan entre 1 y 10 días de manera sucesiva; llegando en algunos casos, y bajo condiciones favorables, a formarse entre 15 y 18 hojas. Las hojas se van entrelazando unas a otras, formando así el llamado falso tallo.

2.1.2.3 Bulbo

El bulbo es el órgano donde se acumulan las sustancias nutritivas de reserva.

2.1.2.4 Raíz

El sistema radicular es muy superficial ya que su mayor volumen de raíces se encuentra en los primeros 30 centímetros, alcanzando una profundidad máxima de 45 centímetros. La parte basal del bulbo está conformada por una placa de tallos en donde se forman las raíces adventicias, posteriormente y con el desarrollo, se forman raíces a los lados de la placa basal.

2.1.3 Ecología

La cebolla se adapta a diferentes temperaturas, puede así desarrollarse tanto en climas cálidos, templados y fríos, comprendidos entre los 35 y 2000 msnm. Un mejor desarrollo de esta especie se produce en altitudes superiores a los 900 msnm, con una temperatura ambiental entre los 18 y 25 grados centígrados y con un ambiente seco y luminoso.

En cuanto al tipo de suelos, la cebolla puede desarrollarse en varios tipos de suelos, a excepción de los arcillosos que causan problemas en cuanto al manejo de agua, pueden causar lesiones a los bulbos y dificultan el desarrollo de la planta. Las condiciones ideales del suelos serían que este cuente con una buena textura, fértiles y bien drenados, con un pH entre 6.0 y 7.0 (CENTA, 2003).

2.2 El Ajo

Figura 7: Ajo *(Allium sativum)*

El Ajo *(Allium sativum L.)* es una hortaliza de bulbo que posee valiosas propiedades alimenticias, medicinales e incluso industriales. Es una de las plantas más antiguas, de acuerdo a las investigaciones realizadas, se deduce que los egipcios ya la utilizaban hace aproximadamente 4000 años.

2.2.1 Clasificación Taxonómica

Sub Reino:	Embryophyta
División:	Magnoliophyta
Sub División:	Angiosperma
Clase:	Monocotiledónea, Liliopsida
Orden:	Asparagales
Familia:	Aliáceas
Genero:	Allium

Especie: Sativum

2.2.2 Descripción botánica

El ajo es una planta bianual, de bulbo tunicado y con una altura promedio de 40 a 60 centímetros. Su bulbo se compone de 7 a 30 bulbillos o dientes, los mismos que están unidos por una película delgada, formando así lo que se conoce con el nombre de "cabeza de ajos". Cada uno de los dientes se encuentra envuelto por una delgada película blanca o rojiza y de cada uno puede tener rigen una nueva planta.

Su tallo floral termina en una inflorescencia llamada umbela de color rosado la misma que fructifica para producir semillas. Sus hojas son planas y delgadas con una longitud aproximada de 30 centímetros Su raíz, al igual que la de la cebolla, es superficial, nacen de la base de los dientes y se encuentran a 30 centímetros de profundidad durante el cultivo.

2.2.3 Ecología

El ajo es una planta que, para su correcto crecimiento, requiere de ciertas condiciones climáticas y de luminosidad para la formación del bulbo. La temperatura ideal para su desarrollo está entre los 12 y 24ºC, siendo los 18ºC la temperatura ideal. El ajo se da generalmente en zonas con clima templado.

En cuanto a los suelos más apropiados para su cultivo están los que poseen un alto contenido de materia orgánica y que cuenten con un buen sistema de drenaje, así

como también que cuenten con una buena estructura que retenga la humedad. El pH del suelo debe oscilar entre 6.0 y 7.(Terán, 1997)

2.3 Labores culturales

Las características, tanto de la cebolla como del ajo son muy similares y por ende sus cultivos requieren de los mismos cuidados.

2.3.1 Preparación de Suelos

La preparación de suelos puede realizarse con maquinaria o manualmente. En el primer caso se requiere de una arada y dos rastrilladas, posteriormente se harán los surcos de acuerdo al sistema de siembra escogido.

La preparación manual de los suelos se da sobre todo en terrenos pequeños empleándose el recurso humano disponible y se realiza a través de piqueo y rastrilladas manuales.

2.3.2 Fertilización

La cebolla y el ajo, como todo cultivo, tiene necesidades especificas de nutrientes; los mismos que si no están en el suelo o son deficitarios, deben ser suministrados a través de abonos o fertilizantes, los que podrán ser aplicados directamente sobre el suelo o a través de aspersiones. Además, por su escaso sistema radicular, la cebolla y

el ajo no pueden alcanzar las capas más profundas del suelo y en consecuencia no puede obtener más nutrientes que los que están en la superficie.

Los principales nutrientes que esta especie requiere son el Nitrógeno, Fosforo y Potasio, los cuales contribuyen al buen desarrollo de las hojas, crecimiento y formación de los bulbos.

2.3.3 Control de Malezas

La estructura que presentan estas plantas, hojas alargadas y delgadas, no le permite crear sombra sobre el suelo poniéndola en una situación de desventaja ante las malezas, las mismas que compiten con el cultivo por agua y nutrientes.

Además, estas malezas, pueden ser excelentes hospedantes de plagas y enfermedades, factor que influiría significativamente en la producción y calidad de la planta.

Por estas razones, el control de malezas debe llevarse a cabo desde las primeras etapas de crecimiento de la planta, ya sea con herbicidas o manualmente.

2.3.4 Riegos

Como ya se ha mencionado anteriormente, las raíces de la cebolla y el ajo son cortas y por ende no pueden explorar capas más profundas de la tierra en donde podría acumularse la humedad. Este punto, unido al factor de que se tratan de cultivos de

ciclo corto, convierten al riego en una de las labores culturales más exigentes, ya que cualquier deficiencia en el riego se verá inmediatamente reflejada en la producción final de la planta.

Por esta razón, la capa superficial de la tierra debe mantenerse húmeda permanentemente. Para lograr este objetivo se requerirán como mínimo dos a tres riegos por semana, principalmente en las épocas más secas del año.

El sistema de riego más recomendado es el de aspersión ya que permite obtener una mejor uniformidad. En el caso del riego por gravedad o por surcos, se debe procurar nivelar el suelo lo más posible, para así evitar pérdidas de agua y de plantas por arrastre (AGROTOM, 2002)

2.4 Enfermedades

2.4.1 *Fusarium*

El género *Fusarium* abarca a una gran número de especies de hongos, de los cuales, la mayor parte son patógenos radiculares que ocasionan daño a todo tipo de vegetación alrededor del mundo. Además muchas de estas especies de hongo, están relacionadas con la enfermedad de “Damping-off” o marchitamiento fúngico, que causa grandes pérdidas (Kerstin, Bodker, & Rosendahl, 2002).

Es un hongo que ataca a más de cien especies de plantas Angiospermas y Gimnospermas gracias a diversos mecanismos que este posee para vencer las defensas de las plantas (BOSLAND, 1988).

Los marchitamientos vasculares que produce este patógeno son más comunes y destructivos en las regiones templadas más cálidas y en los trópicos y sub-trópicos, siendo menos dañinos e incluso raros en los climas más fríos, a excepción de los cultivos de invernaderos de estas zonas (Agrios, 1995).

Fusarium sp. es el hongo causante de graves pérdidas económicas en una gran variedad de especies vegetales. Ataca a los cultivos de las aliáceas (ajo, cebolla, puerro), provocando mayores daños en los almácigos de la cebolla con el dumping – off y la pudrición del disco durante el cultivo y la post cosecha (Besano & Ancía, 2011).

Este hongo, se caracteriza además por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria de cerca de un centímetro en un medio de cultivo agar– papa-dextrosa (PDA) a 25ºC (BOOTH, 1970).

Se debe considerar que las plantas de ajo y cebolla son agámicas y que las plantaciones se hacen mediante bulbillos o dientes, por lo tanto, cuando se dan ciclos continuos de cultivos se produce una acumulación de los problemas fitosanitarios (INTA, 1993).

Figura 8 : *Fusarium sp.*

2.4.1.1 Clasificación taxonómica

Según Agrios (1995), la clasificación taxonómica de este patógeno es:

Súper Reino:	Eucariota
Reino:	Micetae
División:	Amastigomycota
Subdivisión:	Deutomycotina
Clase:	Deuteromicete
Orden:	Moniliales
Familia:	Tuberculariaceae
Género:	*Fusarium*

2.4.1.2 Características de la Enfermedad

Este microorganismo se encuentra diseminado por todo el mundo y es el causante de grandes pérdidas en cultivos, tanto hortícolas como frutícolas.

En una investigación sobre el manejo del *Fusarium* en cebolla, se señala que esta enfermedad se transmite por el suelo y se disemina dentro de un mismo lote o de un lote a otro a través del viento, agua de riego, lluvia y de maquinaria (Besano & Ancía, 2011).

Este hongo sobrevive en los residuos de los cultivos y por sus estructuras de resistencia puede llegar a permanecer en el suelo por varios años. El hongo ingresa a la planta a nivel del suelo, ya sea por el tallo o por las raíces superficiales, una vez dentro, se traslada al resto de la planta a través de los haces vasculares (González, 2006)

Esta enfermedad puede presentarse en cualquier etapa de desarrollo de la planta y los principales síntomas que presenta son: amarillamientos, clorosis, marchitez, retardo en el crecimiento y decoloración de la corona, rizoma y raíces; pudiendo llegar a una completa pudrición radicular. Puede presentar también reducción en el numero de tallos y ramas, en donde se presentan lesiones hundidas y necróticas (Quilambaqui, 2005).

Se caracteriza por un marchitamiento continuo de las hojas a partir de la base y un color pardo en los vasos conductores. Las hojas más jóvenes se marchitan y mueren,

seguida por la epinastia o inclinación de las hojas más viejas. En las plantas más viejas los síntomas se vuelven más notorios en el periodo de floración y maduración de la fruta (González, 2006).

Por otra parte, Garcés et al. (1999) encontró que en plantas infectadas con *Fusarium* se observó un enanismo en los brotes y una disminución del crecimiento de la planta.

Algunos estudios estiman que los daños ocasionados por la pudrición basal por *Fusarium* pueden reducir los rendimientos de un cultivo hasta en un 40% (Schwartz y Mohan, 1995). En el Ecuador no existen datos estadísticos oficiales al respecto pero la importancia de las consecuencias de esta enfermedad son fácilmente detectables considerando la cantidad de cebolla y ajo que semanalmente son desechados por mostrar síntomas de pudrición.

El marchitamiento vascular causado por *Fusarium* es una de las enfermedades que genera grandes pérdidas para el sector agrícola alrededor del mundo, a pesar de las diferentes medidas de control que se aplican y que han ido evolucionando con el paso de los años (Garibaldi y Gullino, 1987). La pudrición provocada por el *Fusarium* se ha tornado en una de las mayores limitantes para el sector agrícola dedicado al cultivo de cebolla y ajo. Esta enfermedad está ocasionando grandes pérdidas en países como México e incluso Argentina, que es el cuarto productor de ajo a nivel mundial (Kiehr y Delhey, 2005).

Por otra parte, la presencia de las enfermedades en los distintos cultivos se han elevado continuamente a causa de la facilidad con la que se diseminan los patógenos y por su alto grado de permanencia en los suelos (Arbeláez, 1989). Si a este hecho, le

sumamos que la utilización de abonos orgánicos frescos es una práctica generalizada entre los agricultores y que podría ser una de las principales causas de los problemas patológicos en los cultivos, considerando que el uso de materia orgánica incrementa la incidencia de *Fusarium* (Calderón et al, 1994). Todo esto nos lleva a una situación compleja en la que el riesgo de sufrir pérdidas en los cultivos es muy elevado, razón por la cual es necesario encontrar métodos eficientes de control de enfermedades, que sumados a buenas prácticas en los manejos de los cultivos, permita minimizar las pérdidas que sufren los agricultores.

Figura 9: Plantas de cebolla con síntomas de marchitez por *fusarium*

2.4.1.3 Condiciones favorables de Proliferación

Es un hongo de temperaturas cálidas, su desarrollo optimo ocurre a los 20ºC, con un rango entre 12 y 28ºC. Si a esta temperatura, se le agrega una humedad relativa alta, días cortos de baja intensidad lumínica, el crecimiento de este hongo se ve aun más

favorecido. Otros factores como son los suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, bajos en nitrógenos y con alto contenido de potasio, también facilitan su proliferación. Las heridas en las raíces, causadas por maquinaria o por nematodos como el caso de *Melodogyine incognita* aumentan la susceptibilidad de las plantas al marchitamiento y por ende al desarrollo del hongo (González, 2006).

2.4.1.4 Medidas de Control

El control químico de este hongo no es recomendable por las consecuencias ecológicas y por la resistencia que este presenta (Olaizola , Parra, Martín, Pajares, & Diez, 2005). Por otra parte, una vez que el hongo ha penetrado al tejido vegetal, no existe control químico efectivo para esta enfermedad.

Por lo tanto, para mantener la sanidad del cultivo, se debe procurar mantener el suelo libre de nematodos y evitar la rotura de raíces, ya que son estas heridas las que facilitan el contagio a las plantas. En cuanto a las plantas enfermas, deben eliminarse lo más pronto posible para reducir el contagio.

Las rotaciones con cultivos no huéspedes como el caso de la lechuga, acelga, entre otros, son importantes para el manejo adecuado de la enfermedad (González, 2006)

Para el control de la fusariosis se han tomado diferentes medidas de control, que van desde la erradicación temprana de las plantas contagiadas, la aplicación de vapor en el suelo, el uso de fumigantes y fungicidas sistémicos, así como la rotación de cultivos con variedades tolerantes al *Fusarium.* Sin embargo, estas medidas pueden

tener costos elevados y repercutir en la rentabilidad final de las cosechas (Arbeláez, 1989).

Para el tratamiento de esta y otras enfermedades que se han vuelto tan comunes, el control biológico se presentan como una estrategia nueva (Heredia y Delgadillo, 2000), basados en la capacidad que tiene un organismo de inhibir el crecimiento o de eliminar un fitopatógeno (Whipps y Lumsden, 2001). En este punto, el uso de aceites esenciales como biocontroladores del *Fusarium* se convierten en una buena opción, que por sus bajos costos puede estar al alcance de los pequeños agricultores sin afectar negativamente a sus presupuestos y además, por su alto grado de efectividad contribuirá a disminuir las pérdidas causadas por la pudrición de los cultivos.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de material vegetal

Las especies vegetales empleadas en este trabajo investigativo fueron adquiridas en diferentes mercados locales de la ciudad. De este material vegetal, se desecharon las hojas y tallos en mal estado, utilizando para la extracción de los aceites esenciales, únicamente las hojas y partes frescas de las plantas.

Con el objetivo de establecer el rendimiento de cada especie, se procedió a obtener el peso en kilos antes de la extracción.

3.2 Extracción de aceites esenciales

La extracción de los aceites esenciales se realizó en el equipo de destilación de arrastre de vapor del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay.

El material previamente seleccionado y pesado (1 kg. aproximadamente) fue sometido al proceso de extracción.

El equipo empleado para la obtención de los aceites esenciales es de marca Albrigi-Luigi, modelo AISI 304. Este equipo emplea un sistema de reflujo para condensar el aceite esencial. Los productos de la destilación se separan por la densidad en una columna de vidrio. Una vez alcanzado el punto de ebullición (92ºC a 2500 msnm) se inicia la extracción del aceite esencial, obteniéndose el volumen total de aceite entre 40 y 50 minutos después.

La cantidad de aceite esencial obtenida luego de todo el proceso de extracción varía dependiendo de las diferentes especies empleadas. Estos aceites fueron almacenados en frascos ámbar para evitar posibles alteraciones por la luz solar (Anexo 1).

3.3 Aislamiento de *Fusarium sp.*

A. Aislamiento a partir de muestras vegetales

1) Se recolectó muestras de cebollas con síntomas de pudrición causada por *Fusarium sp.*
2) Las muestras obtenidas se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante un minuto y luego fueron lavadas con agua destilada para eliminar todos los residuos de la solución aplicada previamente.
3) Se cortaron porciones de tejido enfermo (2 cm aproximadamente) y se colocaron en cajas Petri en el medio de cultivo PDA (Anexo 2).

4) Las cajas fueron selladas con parafilm e incubadas en la estufa a una temperatura entre los 24 y 26ºC, con una humedad entre el 50 y 60%, durante 5 días.

B. Purificación del *Fusarium sp.*

1) Se seleccionó las colonias promisorias y cada una de ellas se repico a cajas Petri con medio de cultivo (Anexo 3).
2) Este proceso se repitió dos veces hasta obtener cultivos puros. La comprobación de la obtención de aislados puros, se realizó por aplicación de los postulados de Koch y a través de observación al microscopio y su respectiva comparación con referencias bibliográficas.

C. Mantenimiento de cultivos puros

El hongo que se aisló previamente se mantuvo en cajas Petri, estas cepas extraídas fueron incubadas a una temperatura entre los 24 y 26º C hasta que el crecimiento miceliar sea visible. Las cajas fueron repicadas cada tres semanas hasta obtener cultivos puros.

D. Extracción de Esporas

1) Entre las diversas placas utilizadas para la obtención de cultivos puros, se seleccionaron aquellos que presentaban un mayor nivel de crecimiento del hongo aislado.

2) A estas cajas se les adiciono 5 ml de agua destilada estéril y se removió el micelio con asa flameada.
3) Se tomo 1 ml de la solución y se coloco en los tubos eppendorf.
4) Las suspensiones de las esporas obtenidas se congelaron y el material restante fue descartado (Anexo 4).

E. Identificación del Patógeno

1) Se seleccionó la colonia que presentaba el mejor nivel de crecimiento y pureza.
2) Esta cepa fue llevada para su identificación al Laboratorio de Biotecnología del INIAP, Estación Experimental Chuquipata.
3) Aquí, se procedió a la identificación de género y especie para garantizar una correcta identificación del hongo.

3.4 Bioensayos in Vitro

3.4.1 Bioensayos con Aceites Esenciales Puros

Con el fin de conocer el efecto anti fúngico de los aceites esenciales empleados en este proyecto y la dosis mínima a la que actúan como biocontroladores; se utilizaron placas ELISA.

1) Se preparó una solución 1:1 compuesta por 50 µl de medio y 50 µl de aceite esencial.

2) En la columna número 1 de las placas se colocó 100 µl de la solución previamente elaborada.
3) En la columna número 12 que es la del control de crecimiento, se colocaron 50 µl de medio.
4) En la columna número 11 que corresponde al control de medio se colocaron 100 µl de medio para el control de esterilidad.
5) De la solución depositada en la columna 1, se tomaron 50 µl y con una pipeta multicanal se hizo una dilución seriada hasta la decima columna.
6) En cuanto a las esporas aisladas de *Fusarium sp,* se realizó una dilución 1:10 mezclando 9 ml de agua destilada estéril y 1 ml de esporas.
7) De esta solución, se colocó 50 µl en todas las columnas a excepción de la del control de medio (columna 11).
8) De cada aceite se realizaron dos repeticiones.
9) Las placas fueron llevadas a la estufa por 48 horas y luego de este tiempo se evaluaron visualmente los resultados obtenidos en cuanto a la inhibición del crecimiento del patógeno comparando con la columna de control de crecimiento.

Esquema 1.- Distribución de bioensayo de aceites esenciales puros.

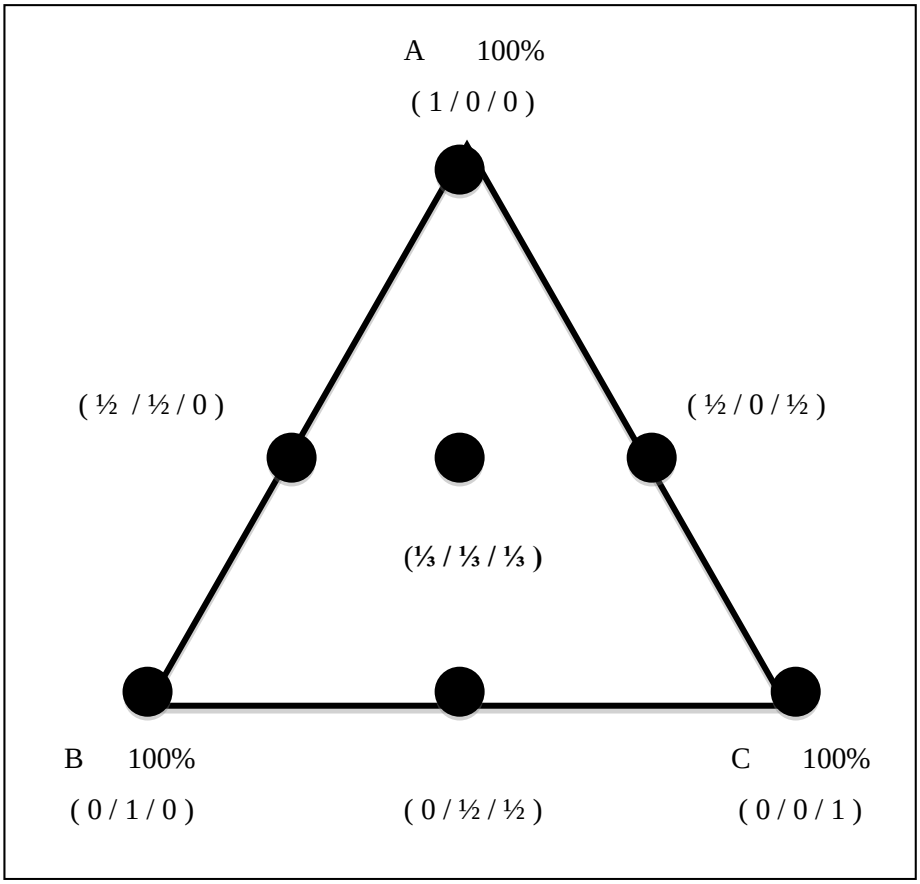
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
HIERBA LUISA	100 µl	50 µl	25 µl	12,5 µl	6,25 µl	3,10 µl	1,56 µl	0,78 µl	0,39 µl	0,20 µl	CONTROL DE MEDIO	CONTROL DE CRECIMIENTO
GUARMI POLEO												
CEDRON												
ROMERO												

3.5 Elaboración de mezclas de aceites esenciales.

De los aceites esenciales empleados en el primer bioensayo, para la realización de las mezclas se seleccionaron los tres que mostraron los mejores resultados (Anexo 5).

Para la elaboración de las mezclas de aceites se utilizó el diseño propuesto por Scheffé (1963), el simplex - centroide; que a diferencia de otros como el simplex látice, incluye mezclas en la que los componentes aparecen en proporciones iguales.

Esquema 2.- Diseño de mezclas de aceites esenciales.



El primer grupo de mezclas corresponde a los ingredientes puros, el segundo grupo es la mezcla del 50% - 50% de dos ingredientes y el tercer grupo está compuesto por el 33,3% de cada uno de los ingredientes. Así, para mezclar tres ingredientes utilizando el diseño simplex – centroide , los resultados serían:

Esquema 3.- Diseño de mezclas de aceites esenciales

Diseño Simplex - Centroide			
	X1	**X2**	**X3**
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	½	½	0
5	½	0	½
6	0	½	½
7	⅓	⅓	⅓

.

3.6 Ensayo en Invernadero

A partir de los resultados obtenidos en los bioensayos se pudo establecer el ensayo en invernadero. Los aceites fueron diluidos en un dispersante Sodio Dodecil Sulfato (SDS) al 2% para su correcta aplicación.

Para este ensayo se utilizaron plantas de cebolla sembradas en macetas de 2 litros de capacidad y el número de unidades experimentales por tratamiento fueron cuatro.

Previo a la siembra de los bulbos de cebolla, la tierra fue esterilizada en autoclave y posteriormente se le aplicó una solución de esporas de *Fusarium sp*.

Transcurridos ocho días después de realizada la siembra de la cebolla se inició con la aplicación de las diferentes mezclas. La frecuencia de repetición de los tratamientos fue cada 48 horas. Los resultados en cuanto a la eficiencia de las distintas mezclas fueron analizados cada 48 horas a partir de la primera aplicación y durante 120 días.

Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

Esquema 4.- Tratamientos utilizados en el ensayo de invernadero con dispersante Sodio Dodecil Sulfato (SDS) al 2%.

	Componentes	**Formulación**
1	Hierba Luisa	4 ml de aceite en 250 ml de dispersante
2	Guarmi Poleo	4 ml de aceite en 250 ml de dispersante
3	Cedrón	4 ml de aceite en 250 ml de dispersante
4	50% Hierba Luisa y 50% Guarmi Poleo	2ml de aceite de hierba luisa y 2ml de aceite de Guarmi poleo en 250ml de dispersante.
5	50% Hierba Luisa y 50% Cedrón	2ml de aceite de hierba luisa y 2ml de aceite de cedrón en 250ml de dispersante.

6	50% Guarmi Poleo y 50% Cedrón	2ml de aceite de Guarmi poleo y 2ml de aceite de cedrón en 250ml de dispersante.
7	33% Hierba Luisa, 33% Guarmi Poleo y 33% Cedrón	1,33ml de aceite de hierba luisa, 1,33ml de aceite de Guarmi poleo y 1,33ml de aceite de cedrón en 250ml de dispersante
8	Agua destilada (Testigo)	

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Rendimiento de los aceites esenciales

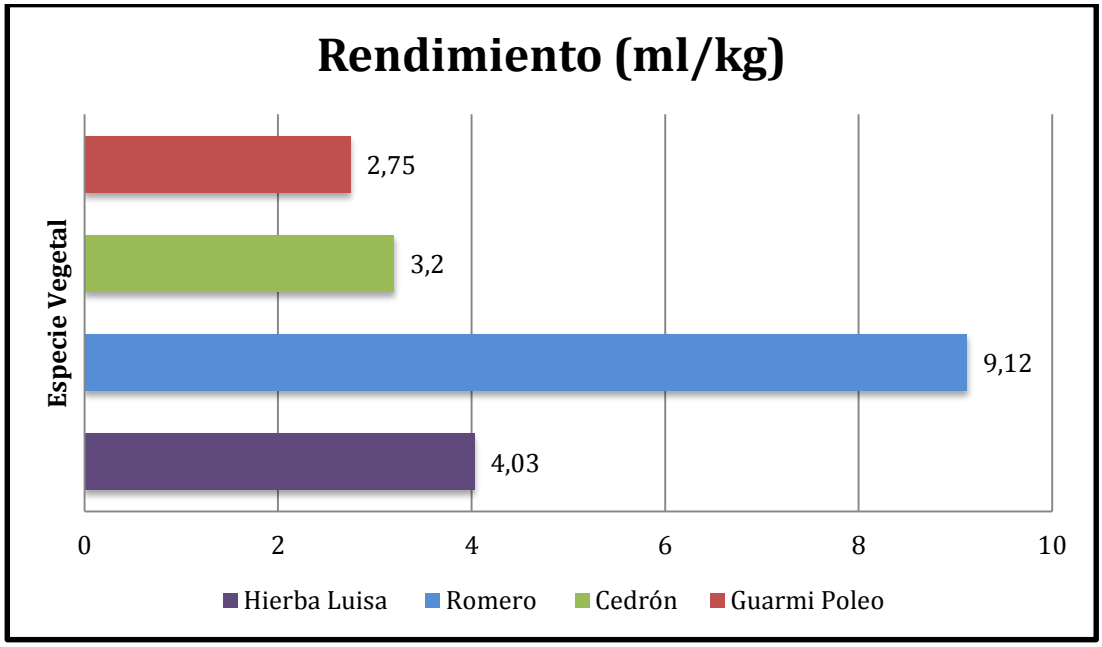
El rendimiento se calcula de acuerdo a la cantidad de mililitros obtenidos por cada kilogramo de material vegetal. Es importante señalar que estos resultados pueden variar de acuerdo a la época del año en la que las plantas fueron recolectadas y a su estado fisiológico al momento de la extracción.

Esquema 5.- Rendimiento de los aceites esenciales por kilogramo de especie vegetal.

Especie Vegetal	Rendimiento (ml / kg)
Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus)*	4,03
Romero *(Rosmarinus officinalis L.)*	9,12
Cedrón *(Lippia citriodora)*	3,20
Guarmi Poleo *(Clinopodium spp.)*	2,75

FUENTE: AUTOR

Gráfico 1.- Rendimiento de los aceites esenciales



FUENTE: AUTOR

4.2 Diámetro del halo de inhibición

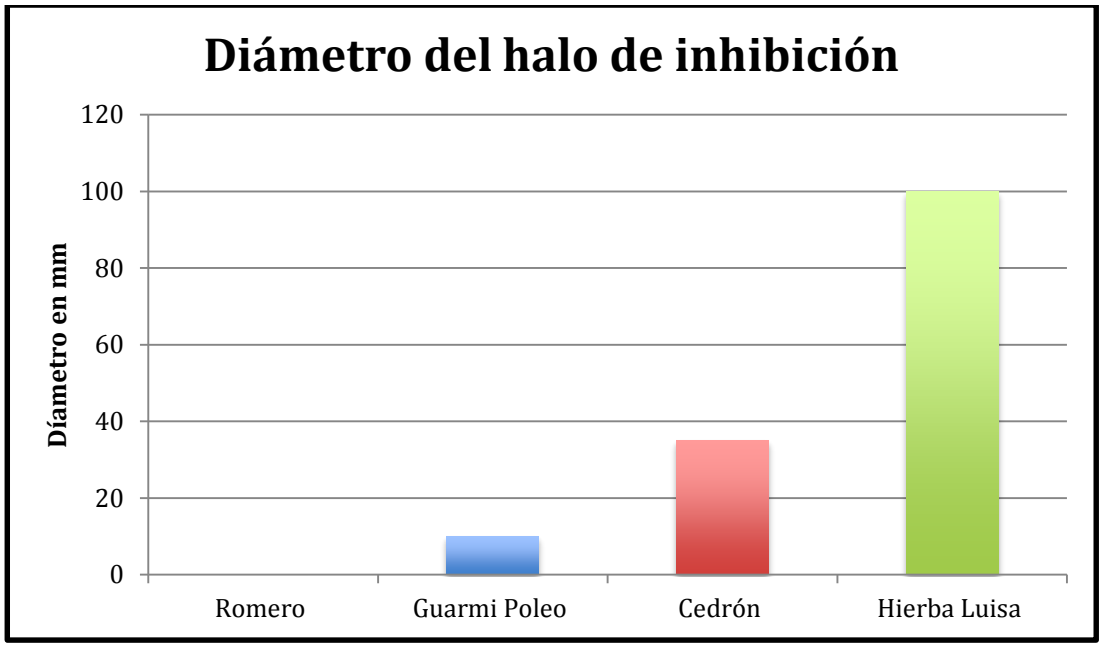
Para conocer el diámetro del halo de inhibición se evalúa el efecto de cada aceite esencial puro sobre el hongo de fusarium. Se realizó la inoculación del hongo en las cajas Petri y quince días después se evaluaron los resultados. El diámetro se mide en milímetros (Anexo 7).

Esquema 6.- Diámetro del halo de inhibición.

Especie Vegetal	**Diámetro de inhibición (en mm)**
Romero *(Rosmarinus officinalis L.)*	0 mm
Guarmi Poleo *(Clinopodium spp)*	10 mm
Cedrón *(Lippia citriodora)*	35 mm
Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus)*	100 mm

FUENTE: AUTOR

Gráfico 2.- Diámetro del halo de inhibición



FUENTE: AUTOR

4.3 Porcentaje de inhibición

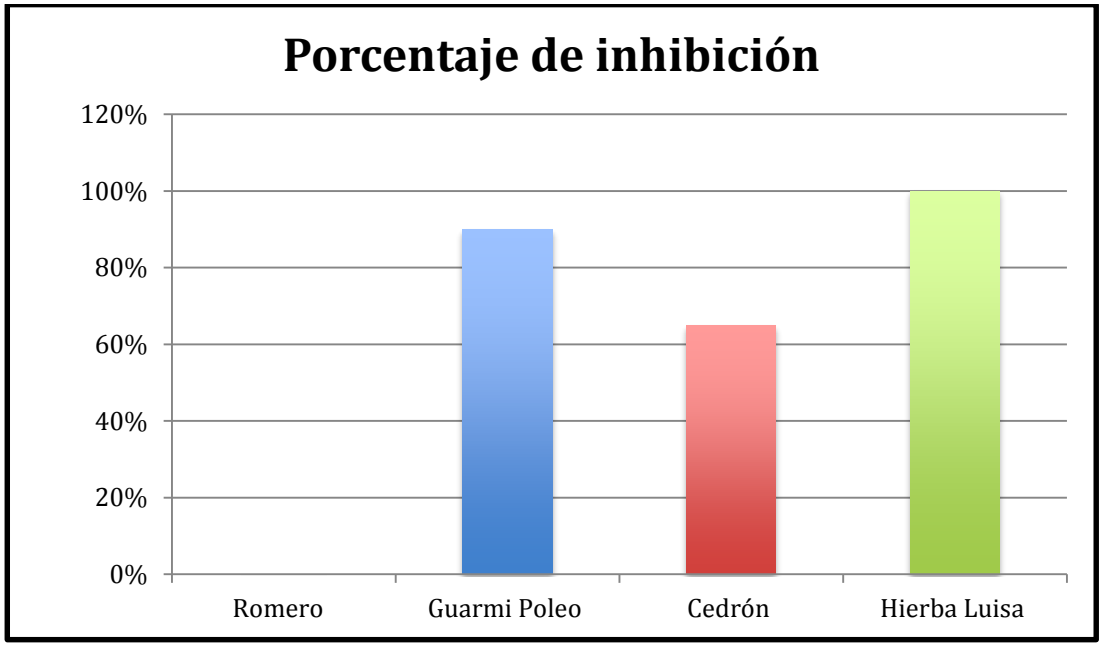
El porcentaje de inhibición de cada aceite esencial puro sobre *fusarium* es el siguiente (Anexo 8):

Esquema 7.- Porcentaje de inhibición.

Especie Vegetal	**Porcentaje de inhibición**
Romero *(Rosmarinus officinalis L.)*	0 %
Guarmi Poleo *(Clinopodium spp)*	90 %
Cedrón *(Lippia citriodora)*	65 %
Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus)*	100 %

FUENTE: AUTOR

Gráfico 3.- Porcentaje de inhibición



FUENTE: AUTOR

4.4 Bioensayos con aceites esenciales puros

Los bioensayos fueron realizadas a través de pruebas in Vitro y permitieron conocer las dosis mínimas a las que los aceites esenciales presentan actividad biocontroladora frente al *Fusarium sp.*

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Esquema 8.- Resultados del bioensayo de aceites esenciales puros

	1 1000 µl	**2** 500 µl	**3** 250 µl	**4** 125 µl	**5** 62,5 µl	**6** 31,0 µl	**7** 15,6 µl	**8** 7,80 µl	**9** 3,90 µl	**10** 2,00 µl	**11**	**12**
HIERBA LUISA	0	0	0	0	0	0	0	X	X	X	CONTROL DE MEDIO	CONTROL DE CRECIMIENTO
	0	0	0	0	0	0	0	X	X	X		
	0	0	0	0	0	0	0	X	X	X		
GUARMI POLEO	0	0	0	0	0	X	X	X	X	X		
	0	0	0	0	0	X	X	X	X	X		
	0	0	0	0	0	X	X	X	X	X		
CEDRÓN	0	0	0	X	X	X	X	X	X	X		
	0	0	0	X	X	X	X	X	X	X		

0 = Actividad anti fúngica del aceite.

X = Crecimiento del hongo.

FUENTE: AUTOR

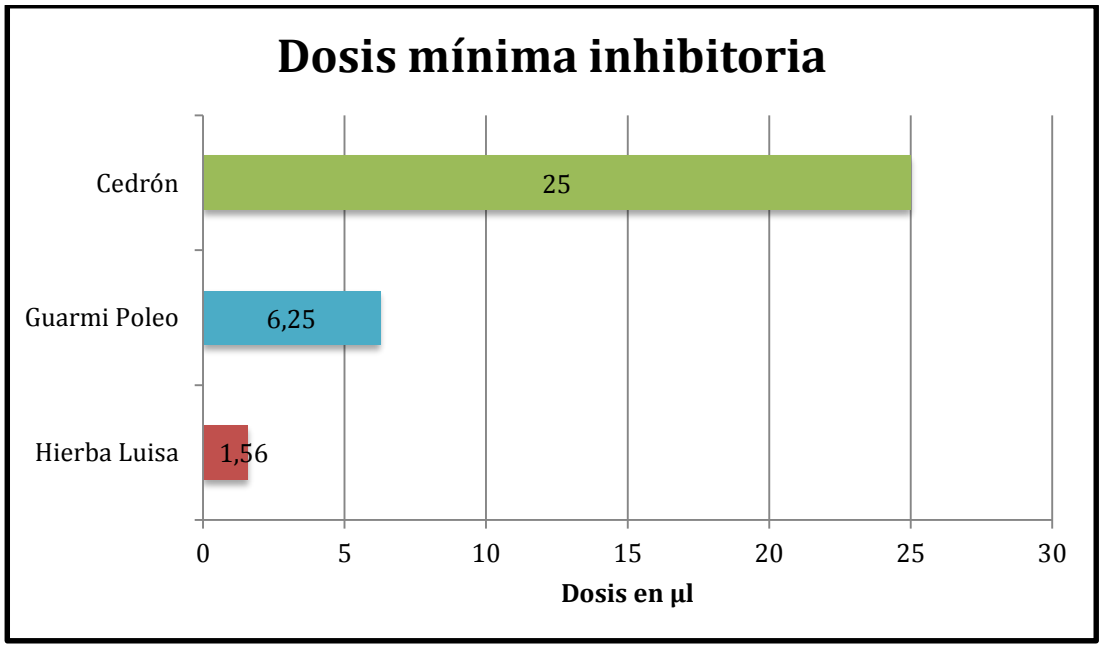
Por lo tanto, la dosis mínima a la que los aceites esenciales presentan efectividad es la siguiente (Anexo 6):

Esquema 9.- Dosis mínimas de efectividad de los aceites esenciales.

Especie Vegetal	Dosis mínima
Hierba Luisa	1,56 µl
Guarmi Poleo	6,25 µl
Cedrón	25 µl

FUENTE: AUTOR

Gráfico 4.- Dosis mínima de efectividad



FUENTE: AUTOR

El aceite esencial de Romero *(Rosmarinus officinalis)* no mostró ninguna efectividad en cuanto a la inhibición del crecimiento del hongo y por lo tanto fue descartada su utilización en los siguientes ensayos. (Anexo 6)

4.5 Elaboración de mezclas de aceites esenciales

Para la elaboración de las mezclas empleadas en este bioensayo se seleccionó los tres aceites esenciales que presentaron efecto inhibitorio en el bioensayo anterior (Hierba Luisa, Guarmi Poleo y Cedrón). Para la formulación de las mezclas se utilizó un diseño simplex – centroide y los resultados fueron los siguientes:

Tratamiento 1: 100% hierba luisa, 0% Guarmi poleo, 0% cedrón

Tratamiento 2: 0% hierba luisa, 100% Guarmi poleo, 0% cedrón

Tratamiento 3.- 0% hierba luisa, 0% Guarmi poleo, 100% cedrón

Tratamiento 4.- 50% hierba luisa, 50% Guarmi poleo, 0% cedrón

Tratamiento 5.- 50% hierba luisa, 0% Guarmi poleo, 50% cedrón

Tratamiento 6.- 0% hierba luisa, 50% Guarmi poleo, 50% cedrón

Tratamiento 7.- 33% hierba luisa, 33% Guarmi poleo, 33% cedrón

4.6 Ensayo en Invernadero

Para este ensayo se utilizaron las mismas mezclas de aceites esenciales previamente elaboradas y la efectividad de cada mezcla fue evaluada de acuerdo al grado de crecimiento de cada planta.

Cada semana se obtenía y registraba el crecimiento promedio de las plantas para poder evaluar la efectividad de las distintas mezclas (Anexo 9):

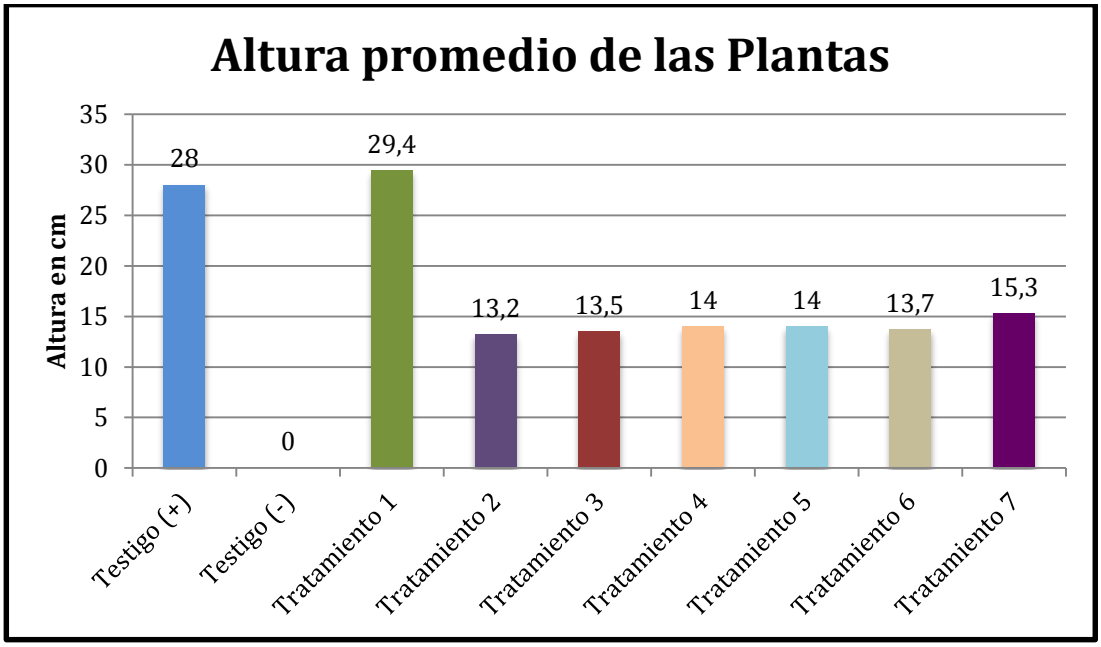
Luego de dieciséis semanas, se obtuvo el crecimiento promedio de las cuatro plantas tratadas con cada mezcla, así como de las plantas utilizadas como testigos positivos, y los resultados fueron los siguientes (Anexo 10):

Esquema 10.- Altura promedio de las plantas.

Mezcla	**Altura en cm.**
Testigo (+)	28,00
Testigo (-)	0
Tratamiento 1	29,40
Tratamiento 2	13,20
Tratamiento 3	13,50
Tratamiento 4	14,00
Tratamiento 5	14,00
Tratamiento 6	13,70
Tratamiento 7	15,30

FUENTE: AUTOR

Gráfico 5.- Altura promedio de las Plantas



FUENTE: AUTOR

4.7 Numero de Plantas Sanas y Atacadas

Luego de realizado el ensayo de invernadero, se contabilizó en número de plantas sanas y enfermas, y los resultados fueron los siguientes:

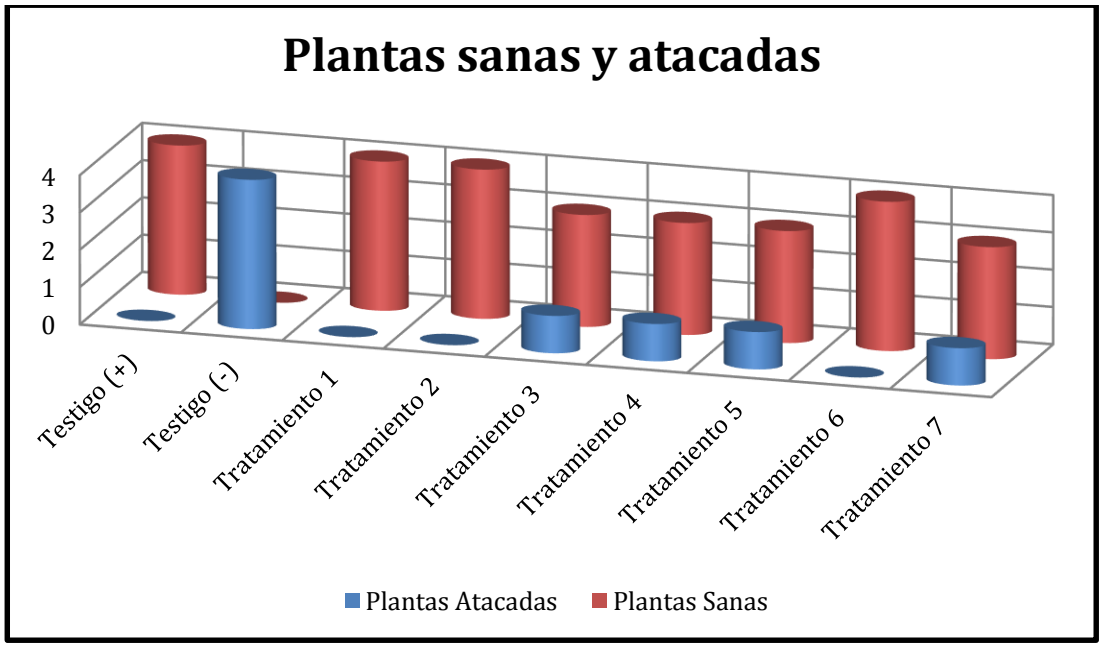
Esquema 11.- Numero de plantas sanas y atacadas

	Plantas Sanas	**Plantas Atacadas**
Testigo (+)	4	0
Testigo (-)	0	4

Tratamiento 1	4	0
Tratamiento 2	4	0
Tratamiento 3	3	1
Tratamiento 4	3	1
Tratamiento 5	3	1
Tratamiento 6	4	0
Tratamiento 7	3	1

FUENTE: AUTOR

Gráfico 6.- Número de plantas sanas y atacadas



FUENTE: AUTOR

4.8 Número de Lesiones

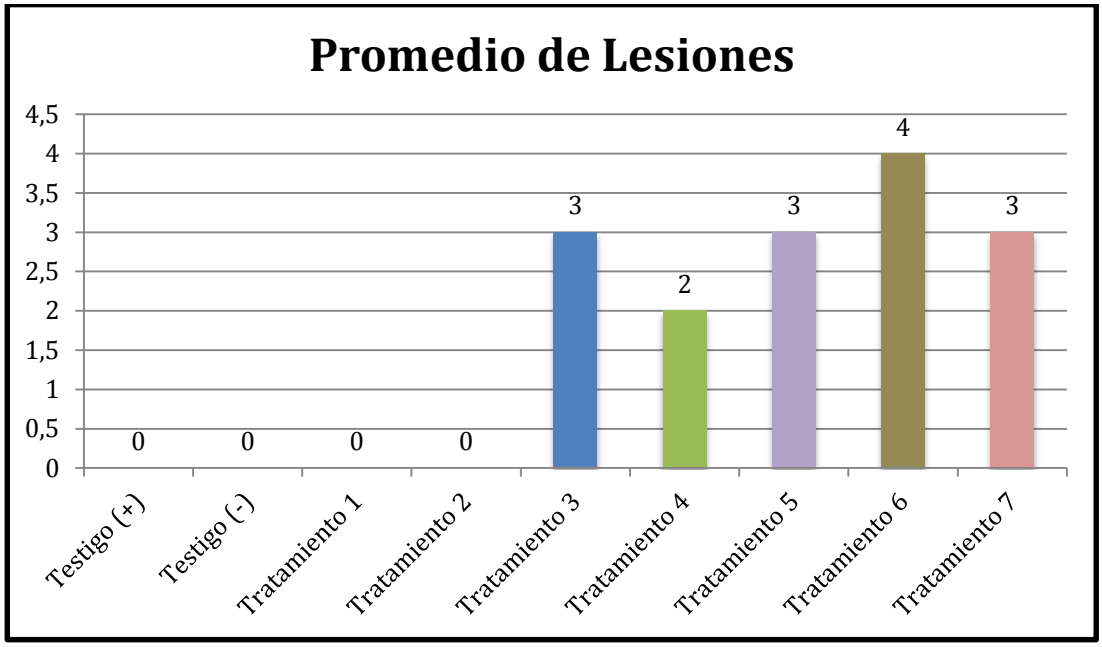
El número de lesiones promedio de las cuatro plantas tratadas con cada mezcla se presenta en el siguiente cuadro (Anexo 11):

Esquema 12.- Numero de lesiones

	Nº de Lesiones
Testigo (+)	0
Testigo (-)	-
Tratamiento 1	0
Tratamiento 2	0
Tratamiento 3	3
Tratamiento 4	2
Tratamiento 5	3
Tratamiento 6	4
Tratamiento 7	3

FUENTE: AUTOR

Gráfico 7.- Promedio de las lesiones



FUENTE: AUTOR

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la eficiencia de las aplicaciones individuales y de las mezclas de los aceites esenciales de Romero *(Rosmarinus officinalis L.)*, Hierba Luisa *(Cymbopogon citratus)*, Cedrón *(Lippia citriodora)* y Guarmi Poleo *(Clinopodium spp.)* en el control de *Fusarium*. A través de las pruebas experimentales in vitro se pudo comprobar que, con excepción del aceite esencial de Romero *(Rosmarinus officinalis L.)*, los aceites de las demás especies vegetales son efectivas inhibiendo el crecimiento del hongo.

Diversos trabajos investigativos han determinado la efectividad total de los aceites esenciales de Hierba Luisa *(Cymbopogon citratus)* en el control de *Fusarium* (Ávila, 2010) así como del Cedrón *(Lippia citriodora)* (Cabrera, 2009). Estos resultados obtenidos con anterioridad, se corroboran con los obtenidos en el presente trabajo investigativo, al haberse encontrado similares efectos sobre el hongo.

Respecto a cuáles serían las dosis mínimas necesarias para obtener un control eficaz sobre el hongo, en estudios previos se había determinado que los aceites esenciales de Hierba Luisa *(Cymbopogon citratus)* y Cedrón *(Lippia citriodora)* mostraban su actividad anti fúngica en concentraciones de 30µl y 15µl (Cárdenas y Zhimnay, 2006). En estudios posteriores, se obtuvo una eficiencia del 100% en concentraciones inferiores como 10µl y 5µl (Cabrera, 2009; Ávila, 2010). En concordancia con estas investigaciones, los resultados obtenidos indican que dichos aceites esenciales tienen la capacidad de controlar el crecimiento del hongo; y al haberse realizado pruebas in vitro de mayor precisión, se pudo determinar que el

aceite esencial de Hierba Luisa *(Cymbopogon citratus)* es efectivo incluso en concentraciones de 1,56µl. El aceite de Guarmi Poleo *(Clinopodium spp)* es efectivo en dosis de 6,25µl y el Cedrón *(Lippia citriodora)* controla el crecimiento del hongo desde 25µl.

Como parte de las pruebas que se realizaron, se midió el diámetro y el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo, dando como resultado que el aceite esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus)* es el que mejores resultados ofrece ya que puede controlar el hongo con una inhibición de 100mm equivalente al 100%. El Cedrón *(Lippia citriodora) controló* el crecimiento del hongo en un diámetro de 35mm equivalente al 65%, Guarmi Poleo *(Clinopodium spp)* tuvo un diámetro de inhibición de 10mm que corresponde al 90%. Finalmente, el Romero *(Rosmarinus officinalis L.)* no tuvo ninguna eficiencia en la inhibición del crecimiento del hongo.

En cuanto a la efectividad de los tratamientos aplicados a las plantas en el ensayo de invernadero, el tratamiento número uno compuesto el 100% de aceite esencial de Hierba Luisa, es el que mejores resultados mostró ya que controló completamente el hongo, las cuatro plantas a las que se aplico el tratamiento se mostraban sanas y libres de *Fusarium*, no había signos de lesiones en las plantas e incluso la altura de la planta era superior comparada con otras a las que se les aplico otros tratamientos.

Los resultados de este ensayo pueden ser un punto importante para poder desarrollar nuevos tratamientos para el control del *Fusarium*, que pudieran estar al alcance de todos los productores agrícolas y que ayuden a la producción de productos libres de

químicos, a los que se les pueda agregar un sello verde y que puedan ser introducidos en nuevos mercados.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

De este trabajo de investigación se pueden establecer las siguientes conclusiones.

- El rendimiento de los aceites esenciales obtenidos a partir de cada especie vegetal varía dependiendo la época del año en la que estos sean recolectados, así como también dependerá del estado fisiológico de las plantas.

- De las especies vegetales utilizadas en esta investigación, el Romero *(Rosmarinus officinalis L.)* es la especie que muestra mejor rendimiento en el proceso de extracción seguido por la Hierba Luisa *(Cymbopogon citratus)* y el Cedrón *(Lippia citriodora).* La especie de menos rendimiento fue la Guarmi Poleo *(Clinopodium spp).*

- Se demuestra la actividad biocontroladora de los aceites esenciales, en nuestro caso particular se consideran efectivos frente *a Fusarium.*

- El aceite esencial de Hierba Luisa *(Cymbopogon citratus)* inhibe el crecimiento del hongo desde 1,56 µl. El aceite esencial de Guarmi Poleo *(Clinopodium spp)* inhibe el crecimiento del hongo desde 6,25µl. El Cedrón

(Lippia citriodora) requiere de dosis más elevadas para controlar el hongo con 25µl.

- El aceite esencial de Hierba Luisa *(Cymbopogon citratus)* puede utilizarse como biocontrolador de *Fusarium*, por su alto grado de eficiencia con dosis muy bajas para alcanzar excelentes resultados.

- El aceite esencial de Hierba Luisa puro (tratamiento 1) es el que presenta mayor eficiencia al inhibir completamente el crecimiento del *Fusarium*.

- Los aceites esenciales de Guarmi poleo y de Cedrón puros (tratamientos 2 y 3) presentan buena actividad biocontroladora del *Fusarium.*
- Las mezclas compuestas en un 50% por hierba luisa (tratamientos 4 y 5) presentan efectos biocontroladores muy similares, aunque menores a los tratamientos de aceites esenciales puros.

- Los tratamientos que contienen mezclas de aceites, en general, son menos efectivos que los elaborados con aceites esenciales puros, sobre todo el de hierba luisa.

- La utilización de alternativas ecológicamente sostenibles constituyen un avance para la producción agrícola. Se obtienen productos de excelente calidad y no altera el medio ambiente. Los residuos de estos biocontroladores no afectaran la tierra ni las futuras plantaciones que ahí se lleven a cabo; no contaminaran fuentes de aguas ni emanaran fuertes olores.

Recomendaciones

- El aceite esencial de Hierba Luisa se presenta como una excelente alternativa para el control biológico del *Fusarium* por sus excelentes resultados en la inhibición del crecimiento del hongo.

- Por su bajo coste y en comparación con otros productos que tienen el mismo propósito, son bastante más accesibles para los pequeños y medianos agricultores.

- Debería fomentarse entre los agricultores el uso de sustancias naturales para el control de plagas y enfermedades, por no ser lesivos con el medio ambiente y permitir el cultivo de productos libres de químicos.

- Sería conveniente brindar capacitaciones a los agricultores con técnicas de prevención, identificación y control del *Fusarium;* para en caso de presentarse la enfermedad sepan cómo actuar y así se puedan reducir las pérdidas que este hongo genera por la pudrición de cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

- AGAPITO, T., & Sung, I. (2005). *Fitomedicina: 1100 plantas medicinales. Tomo I y II.* Lima, Peru: Editorial Isabel.
- AGRIOS, G. (1995). *Fitopatología* (2ª Edición ed.). México D. F.: Editorial Limusa.
- AGROTOM, U. T. (2002). El Cultivo de Cebolla. *Cartilla Didáctica con recomendaciones para el Sur del Atlántico* . Barranquilla, Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 9.
- ALEXOPOULOS, C. (1966). *Introduccion a la micología* (2ª edición ed.). Buenos Aires: Eudeba.
- ARBELÁEZ, G. (1989). *Control de enfermedades vasculares del clavel en Colombia*. Agronomía. Colombiana. Vol. 6. Pág. 3-9. Recuperado 10 de febrero del 2004. http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/viewFile/20965/21879
- ÁVILA, M. (2010). *Situación Fitosanitaria y evaluación de productos alternativos y convencionales para manejar Fusarium oxysporum en Vasconcella sp.* Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Biólogo del Medio Ambiente. Universidad del Azuay. Cuenca
- BANDONI, A. (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica,*. La Plata, Argentina: CYTED.
- BESANO, A., & Ancía, V. (2011). *Alternativas para el manejo del Fusarium en cebolla.* Recuperado el 14 de Mayo de 2013, de Corfo Rio Colorado: http://www.corforiocolorado.gov.ar/archivos/usotrichoenfusarium.pdf

- BOOTH, C. (1970). *Fusarium oxysporum CMI descriptions of plant pathogenic fungi and bacteria*. *Commonwealth Agricultural Bureaux* .
- BOSLAND, P. (1988). *Fusarium oxysporum a pathogen of many plant species. Advances in plant pathology.*
- CABRERA, J. (2009). *Obtención de extractos vegetales con actividad biocontroladora ante hongos fitopatógenos*. Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario. Universidad del Azuay. Cuenca
- CÁRDENAS, D. y Zhimnay, A. (2006). *Selección de aceites esenciales con actividad anti fúngica frente a hongos fitopatógenos*. Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario. Universidad del Azuay. Cuenca
- CALDERÓN, L.; Estrada, A; Morales, J. Thrum, K; Dardón, D.; Salguero, V. (1994). *Evaluación de Bacillus subtilis en el control biológico de F. Oxysporum en arveja china*. Disponible en: http://www.icta.gob.gt/hortalizas/controlBiologicoArvejaChina.pdf
- CENTA. (2003). Cultivo de la Cebolla. *Guía Técnica Nº 15* . El Salvador.
- CORDERO, L. (1911). *Enumeracion botánica de las principales plantas que se dan en las provincias de Azuay y Cañar de la República del Ecuador.* Cuenca, Ecuador: Imprenta de la Universidad de Cuenca.
- DORMAN, H., & Deans, S. (1999). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* (88), 308-316.
- GARCÉS, E.; orozco, M. y Zapata, A. (1999). *Fitopatología en Flores*. Bogotá – Colombia. Volumen 4 Numero 2. Páginas 5-26. Recuperado 10 de febrero de 2014. Disponible en:

http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/viewFile/25871/28529

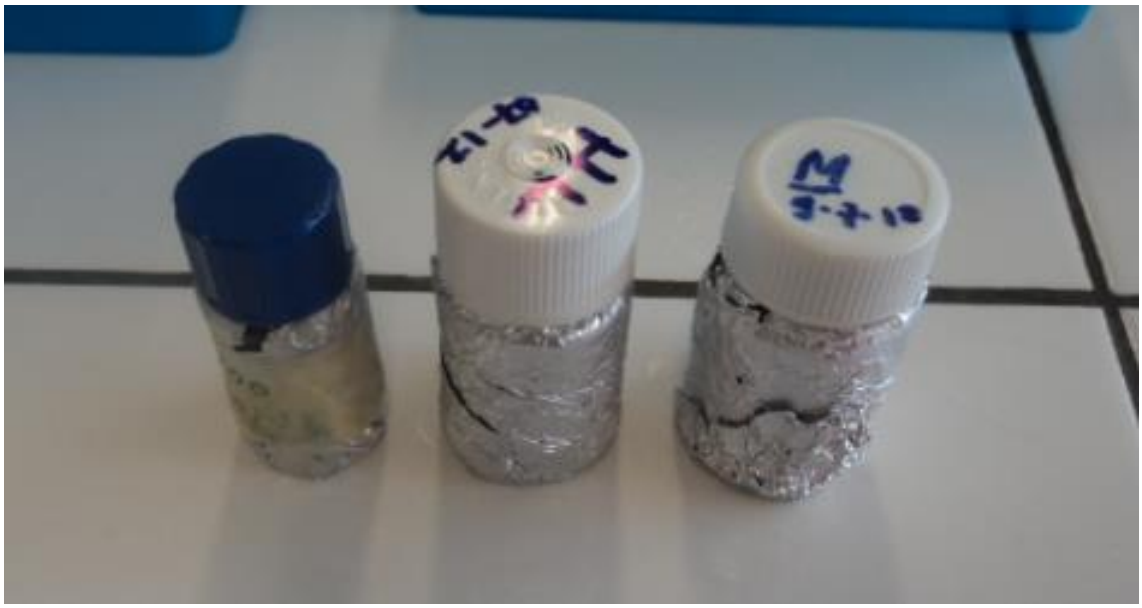
- GARIBALDI, A. and Gullino, M. (1987). *Fusarium wilt of carnation: present situation, problems and perspectives*. Acta Hort. (ISHS) 216:45-54 Disponible en: http://www.actahort.org/books/216/216_6.htm
- GONZÁLEZ, P. (17 de Abril de 2006). *Enfermedades del Tomate*. (F. d. Fitopatología, Productor) Recuperado el 1 de Diciembre de 2012, de Facul: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html
- HEREDIA García, E., F. Delgadillo Sánchez (Comp.). 2000. *El ajo en México: origen, mejoramiento genético y tecnología de producción*. Celaya, Gto. México. SAGAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. 102 páginas Libro técnico Numero 3
- INTA (Instituto Nacional de Estadística y Geografía), 1993. *Manual de producción de semillas hortícolas: ajo*. Fascículo 5
- KERSTIN, S., Bodker, L., & Rosendahl, S. (2002). Population structure and pathogenicity of members of the Fusarium oxysporum complex isolated from soil and root necrosis of pea. *FEMS Microbiology Ecology*, *42* (3), 367-374.
- KIEHR, M. R. Delhey, (2005). *Fusarium oxysporum y F. Proliferatum como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino.* XII Congreso Latinoamericano – XXVIII Congreso Argentino de Horticultura, Argentina.
- MIHALIAK, C., Gershenzon, J., & Croteau, R. (25 de Febrero de 1991). *Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants, implication for theories of plant chemical defense.*Recuperado el 27 de Noviembre de 2012, de Oecologia: http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00634594?LI=true

- MUÑOZ, F. (2002). *Plantas medicinales y aromáticas; estudio, cultivo y procesado* (4ta. edicion ed.). Madrid, España: Editorial Mundi-Prensa.
- OLAIZOLA, J., Parra, B., Martín, P., Pajares, J., & Diez, J. (2005). Utilizacion de hongos ectomicorricicos comestibles para el control biológico de Fusarium en plantulas para reforestacion. En *IV Congreso Forestal Español* (pág. 385). Madrid, España: Entomología y Patología Forestales.
- QUILAMBAQUI, M. (2005). Aislamiento e Identificacion de Especies de Fusarium asociadas al declinamiento del Esparrago . *Revista Tecnológica ESPOL, 18* (1), 135-140.
- SCHEFFÉ, H. (1963). The simplex-centroide design for experiments with mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society*, *25*, 235-263.
- SCHWARTZ, H. F., K. Mohan, (1995). *Compendium of olon and garlic diseases.* Academic Press. San Diego California. 54p.
- STENGELE, M., & Stahl-Biskup, E. (1993). *Seasonal variation of the essential oil of European pennyroyal*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2012, de ISHS Acta Horticulturae: http://www.actahort.org/books/344/344_5.htm
- TERÁN, O. (1997). *EL Cultivo de Ajo.* (C. d. Desarrollo, Ed.) La Paz, Bolivia: Plural editores.
- WHIPPS, J.M., D.R. Lumsden, (2001). *Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: Status and prospects.* In: Butt, T.M., C.W. Jackson, N. Magan (eds.), Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potentials. CABI Publishing. Wallingford. pp. 9–22
- WILSON, C., Solar, J., & Ghaouth, A. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against Brotytis cinerea. *Plant disease*, *81* (2), 204-210.

ANEXOS

ANEXO 1: EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Pesaje de Material Vegetal



ANEXO 2

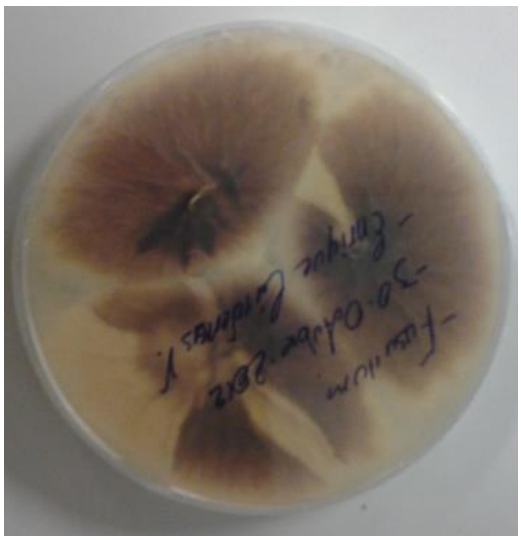
AISLAMIENTO DE *FUSARIUM SP.*

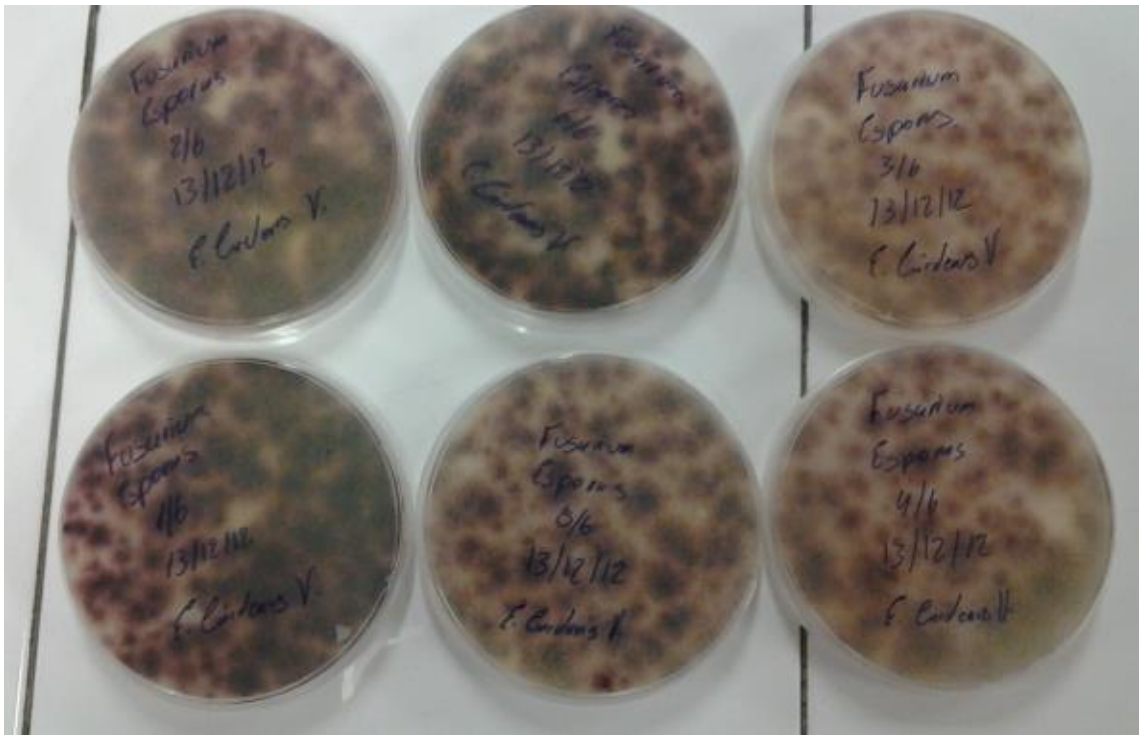
Materiales utilizados

Preparación del medio de cultivo

ANEXO 3

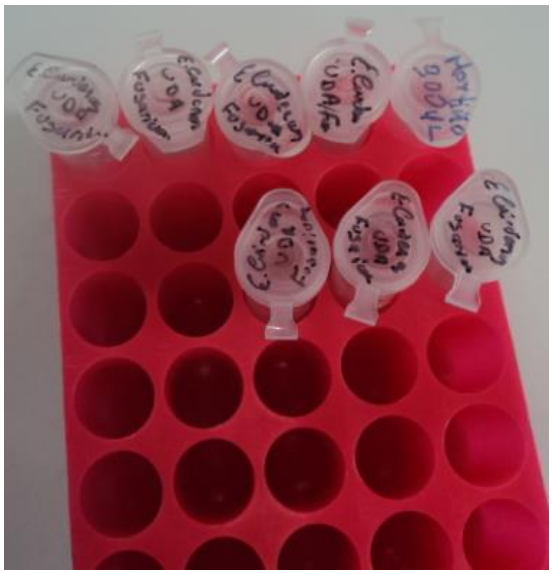
CRECIMIENTO DE *FUSARIUM SP.*

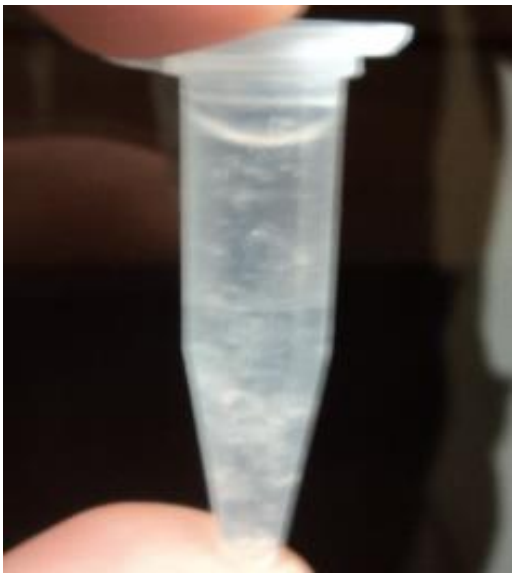




ANEXO 4

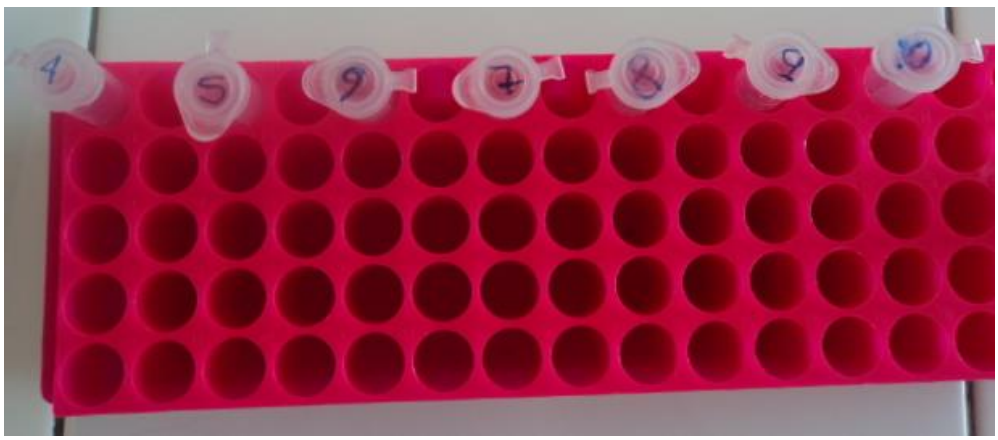
EXTRACCIÓN DE ESPORAS





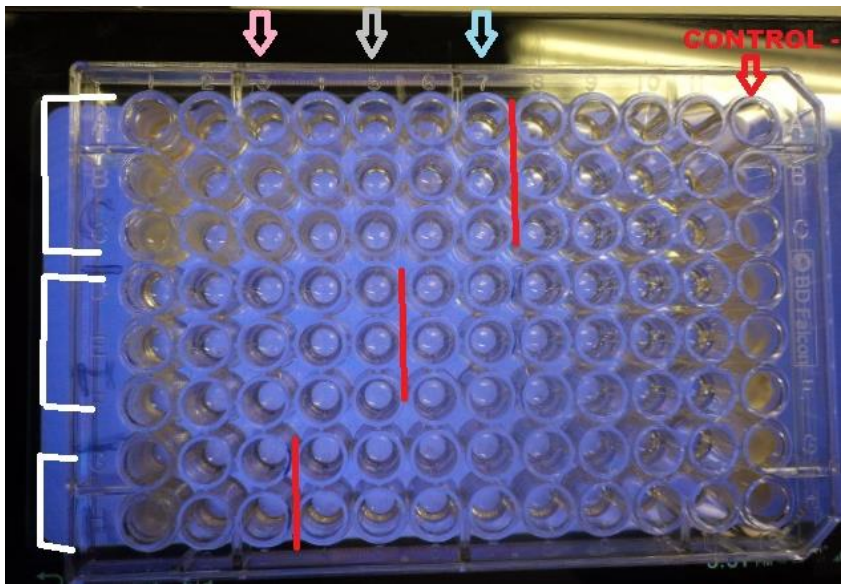
ANEXO 5

ELABORACIÓN DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES

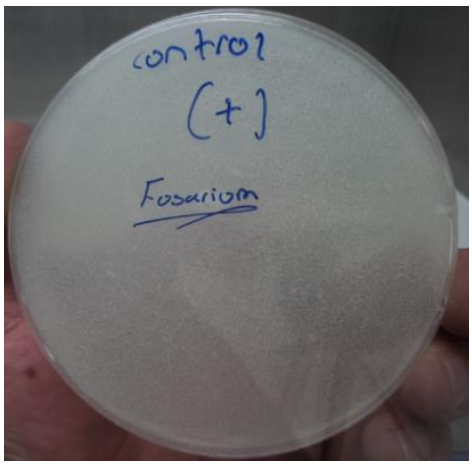


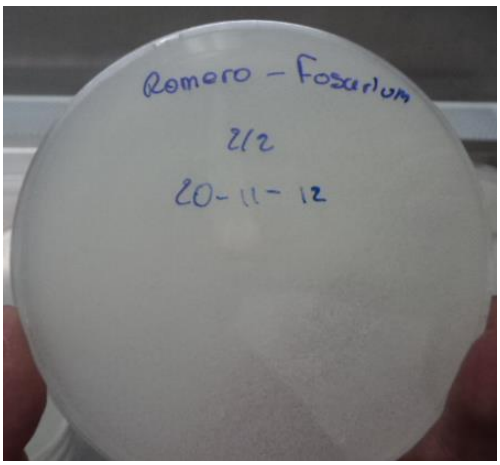
ANEXO 6

BIOENSAYO CON ACEITES ESENCIALES PUROS

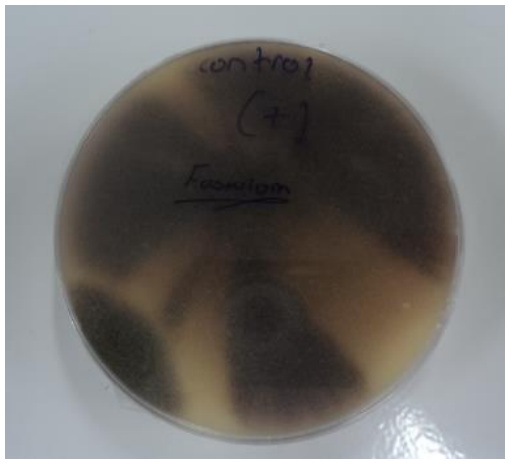


Dosis mínima inhibitoria

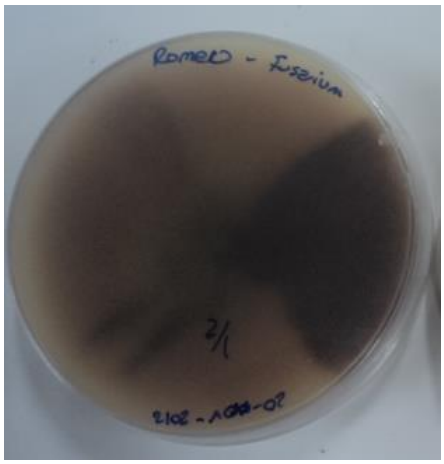




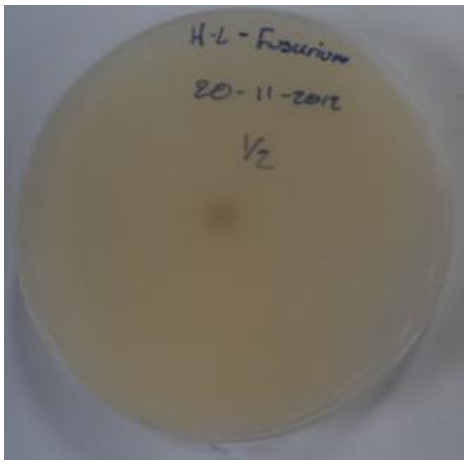
RESULTADOS



Control de crecimiento



Aceite esencial de Romero



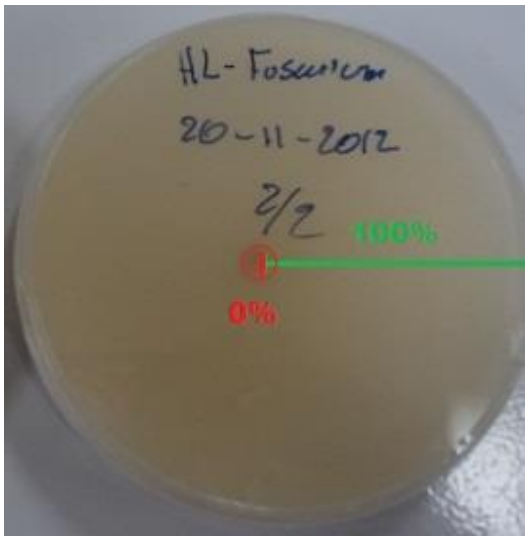
Aceite esencial de Hierba Luisa

Aceite esencial de Cedrón

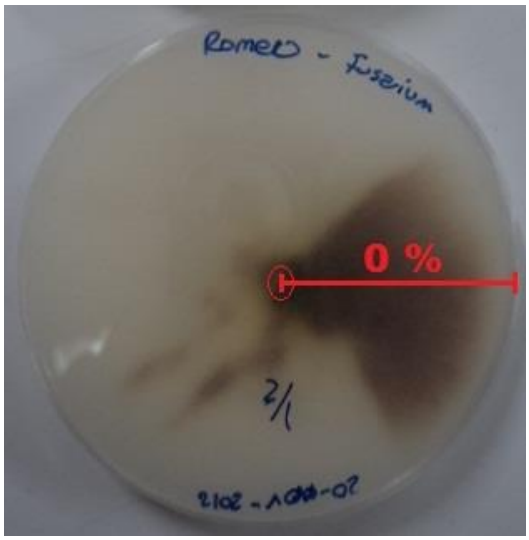
Aceite esencial de Menta

ANEXO 7

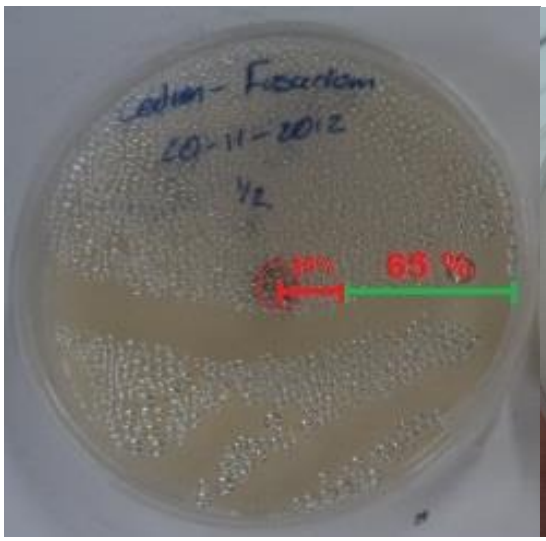
DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN



Aceite esencial de Hierba Luisa



Aceite esencial de Romero

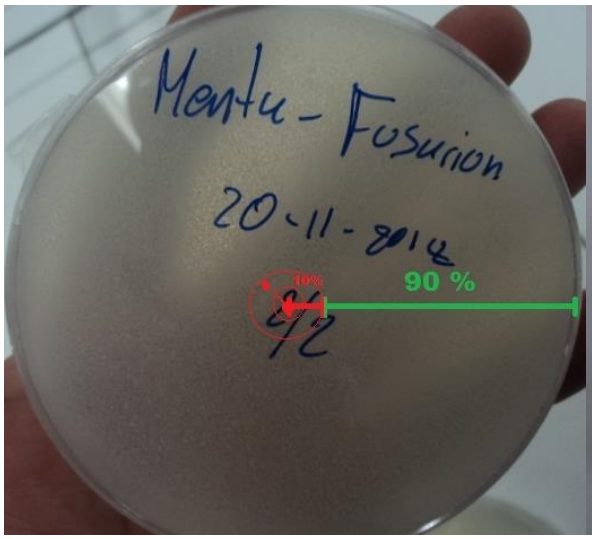


Aceite esencial de Cedrón

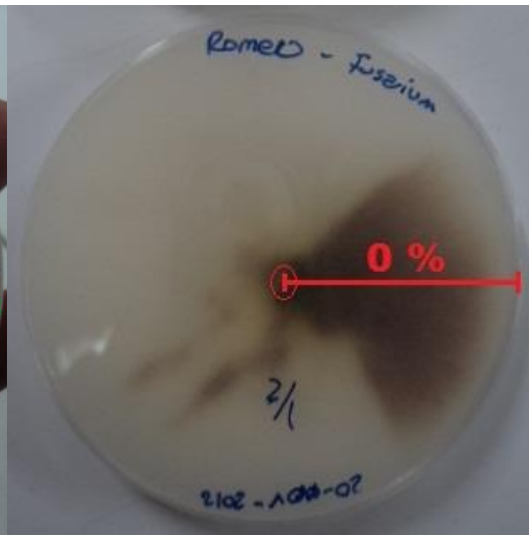
Aceite esencial de Menta

ANEXO 8

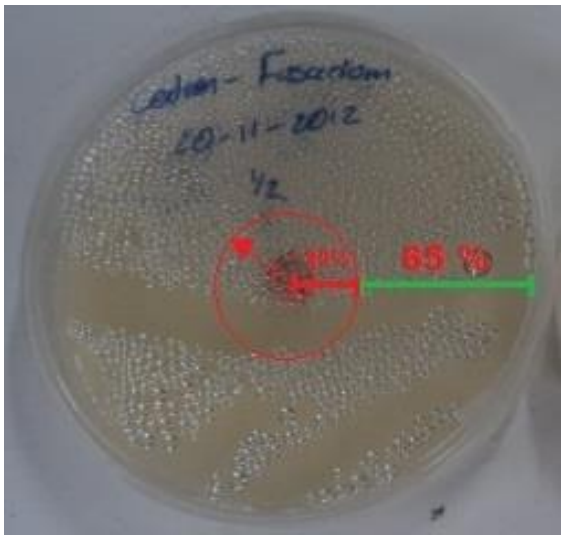
PORCENTAJE DE INHIBICIÓN



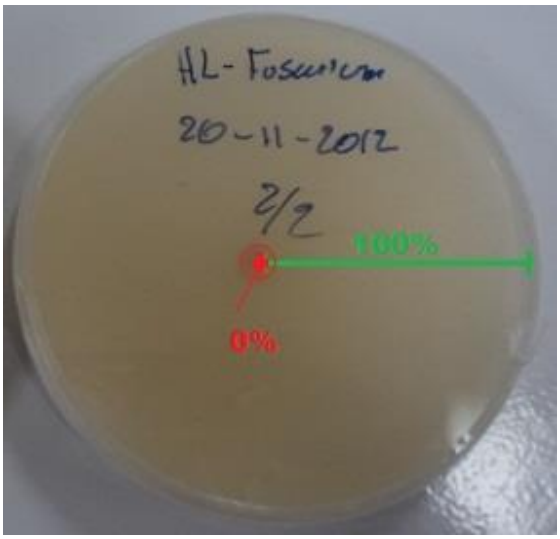
Aceite esencial de Menta



Aceite esencial de Romero



Aceite esencial de Cedrón



Aceite esencial de Hierba Luisa

ANEXO 9

TABLA DE CRECIMIENTO (EN cm)																
Semana	**Mayo**				**Junio**				**Julio**				**Agosto**			
Mezcla	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**
Testigo (+)	**0**	**0**	**0**	**Brote**	**2,50**	**3,75**	**5,50**	**7,00**	**8,60**	**11,00**	**15,00**	**18,70**	**22,40**	**26,00**	**27,15**	**28,00**
Testigo (-)	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Tratamiento 1	**0**	**0**	**0**	**0**	**Brote**	**2,50**	**2,75**	**3,00**	**7,00**	**10,50**	**14,00**	**18,20**	**22,80**	**26,30**	**28,40**	**29,40**
Tratamiento 2	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**Brote**	**1,70**	**2,00**	**2,50**	**3,25**	**5,40**	**7,00**	**8,30**	**11,00**	**13,20**
Tratamiento 3	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**Brote**	**1,50**	**2,00**	**3,00**	**5,00**	**7,50**	**9,00**	**10,50**	**13,50**
Tratamiento 4	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**Brote**	**1,40**	**2,50**	**4,50**	**6,30**	**7,00**	**8,10**	**10,00**	**11,50**	**14,00**
Tratamiento 5	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**Brote**	**1,00**	**2,50**	**3,40**	**4,60**	**6,50**	**8,60**	**10,40**	**11,20**	**14,00**
Tratamiento 6	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**Brote**	**1,00**	**2,30**	**3,50**	**5,10**	**7,20**	**8,60**	**11,30**	**13,70**
Tratamiento 7	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**Brote**	**1,20**	**2,50**	**3,25**	**5,00**	**7,10**	**8,50**	**11,30**	**13,50**	**15,30**

ANEXO 10

ENSAYO EN INVERNADERO (SIEMBRA)

Crecimiento 9 semanas

Crecimiento 10 semanas

ANEXO 11

RESULTADOS

Control (-)

Tratamiento (6) lesiones

Tratamiento (7) lesiones

Tratamiento (4) lesiones

Tratamiento (3)

Tratamiento (5)