



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

ESCUELA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

**Actividad Biocontroladora de Aceites Esenciales ante
Antracnosis (*Colletotrichum Spp.*) de Tomate de Árbol
(*Solanum Betacea*)**

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Ingeniera
Agropecuaria

Autora:

Adriana Elizabeth Bustamante Gavilanes

Directora:

Ing. Aída Cazar R.

Cuenca, Ecuador

2009

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a mis padres, que gracias a su trabajo y apoyo han permitido que hoy pueda culminar uno de mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de este trabajo ha sido conseguida por el apoyo de muchas personas.

Un sincero y profundo agradecimiento a Ing. Aída Cazar por todo su tiempo, paciencia; Dra. María Elena Cazar gracias por compartir sus conocimientos, y dedicar su tiempo en el desarrollo de esta investigación.

Al Instituto Nacional de Investigaciones, Estación Experimental del Austro; en la persona del Ing. Walter Larriva por brindarme su ayuda y facilitarme las herramientas necesarias para la realización de este trabajo.

A mi familia por su confianza y paciencia, a mis padres por el esfuerzo entregado para que este sueño se haga realidad.

GRACIAS.

RESUMEN

La antracnosis (*Colletotrichum spp*) es la enfermedad que causa las mayores pérdidas económicas en el cultivo de tomate de árbol en el Ecuador. Actualmente, el patógeno es tratado con compuestos de síntesis: Mancozeb y Clorotalonil, cuya residualidad impide la exportación del fruto. En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de cinco aceites esenciales a nivel de laboratorio, invernadero y campo como alternativas para el tratamiento de la antracnosis mediante la aplicación en diferentes dosis e intervalos de aplicación. De la comparación realizada entre aceites esenciales y productos químicos se demostró que el aceite de guarmi poleo *Clinopodium sp.* y la mezcla de arrayán *Eugenia hallii* y ruda *Ruta graveolens* tienen el mismo efecto en la prevención y control de la enfermedad.

ABSTRACT

Anthracoosis (*Colletotrichum spp*) is the causal of the major economic losses from tree tomatoes cultures in Ecuador. The pathogen is treated with the synthetic pesticides Mancozeb and Clorotalonil. The residual of these compounds stop the exportations of the fruit. In the present work, five essential oils were tested as biocontrol agents. Bioassays at "in vitro", greenhouse and field conditions were performed, using different doses and application intervals. The data collected were statistically analyzed and compared with chemical controls. Essential oil from *Clinopodium sp* and a mixture from *Eugenia halli* and *Ruta graveolens* showed the same effect as biocontrol agents against illness.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice de contenidos	vi
Índice de cuadros e ilustraciones.....	ix
Índice de anexos	x
INTRODUCCIÓN	1
Capítulo I: CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL	5
1.1 Generalidades.....	5
1.2 Ecología.....	6
1.3 Descripción botánica.....	6
1.4 Propagación.....	8
1.5 Labores culturales.....	8
1.5.1 Podas.....	8
1.5.2 Deshierbes.....	8
1.5.3 Riego.....	8
1.5.4 Fertilización.....	9
1.6 Enfermedades.....	9
1.6.1 Antracnosis.....	9
1.6.2 Síntomas.....	9
1.6.3 Características del patógeno.....	10
1.6.4 Medidas de control.....	12
Capítulo II: ACEITES ESENCIALES	13
2.1 Generalidades.....	13
2.1.1 Métodos de Extracción.....	13
2.1.2 Destilación por arrastre con vapor.....	14
2.2 Descripción de especies vegetales.....	14
2.2.1 Guarmi poleo, <i>Clinopodium sp.</i>	14
A. Descripción botánica.....	15
B. Composición.....	15
C. Propiedades.....	15

2.2.2	Romero, <i>Rosmarinus officinalis</i>	15
A.	Descripción botánica.....	15
B.	Composición.....	15
C.	Propiedades.....	16
2.2.3	Arrayán <i>Eugenia hallii</i>	16
A.	Descripción botánica.....	16
B.	Composición botánica.....	16
C.	Propiedades.....	17
2.2.4	Cedrón, <i>Lippia citriodora</i>	17
A.	Descripción botánica.....	17
B.	Composición.....	17
C.	Propiedades.....	17
2.2.5	Ruda, <i>Ruta graveolens</i>	17
A.	Descripción botánica.....	18
B.	Composición.....	18
C.	Propiedades.....	18
2.3	Actividad biocontroladora de aceites esenciales.....	18
Capítulo III: METODOLOGÍA.....		20
3.1	Preparación de Material vegetal.....	20
3.2	Obtención de aceites esenciales.....	20
3.3	Aislamiento del patógeno <i>Colletotrichum spp.</i>	20
A.	Aislamiento a partir de muestras vegetales.....	20
B.	Purificación de <i>Colletotrichum sp.</i>	21
C.	Mantenimiento de cultivos puros.....	21
D.	Extracción de Esporas.....	21
E.	Conteo de Esporas.....	22
F.	Identificación del Patógeno.....	22
3.4	Bioensayos in Vitro.....	22
A.	Bioensayos con aceites esenciales.....	22
B.	Bioensayos con mezclas de aceites.....	24
3.5	Ensayos en Invernadero y Campo.....	26
3.5.1	Ensayo Invernadero.....	26
3.5.2	Ensayo Campo.....	29
3.6	Análisis Económico.....	32

Capítulo IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1 Número de esporas por ml.....	33
4.2 Rendimiento de Extracción de Aceites Esenciales.....	33
4.3 Bioensayos con Aceites Esenciales.....	33
4.4 Ensayos de Invernadero.....	35
4.5 Ensayos de Campo.....	41
4.6 Análisis Económico.....	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
Conclusiones.....	45
Recomendaciones.....	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	51

ÍNDICE DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro 1. Tratamientos empleados en el ensayo de invernadero.	28
Cuadro 2. Tratamientos empleados en el ensayo de campo.....	31
Cuadro 3. Costos de obtención y aplicación en aceites esenciales por Ha.....	32
Cuadro 4. Rendimiento de aceites esenciales (mL/Kg)	33
Cuadro 5. Dosis de aceites esenciales efectivos en bioensayo.....	34
Cuadro 6. ADEVA Tratamiento control Número de pústulas por hoja (día 4).....	35
Cuadro 7. ADEVA Tratamiento control Número de hojas atacadas por planta (día 4).	36
Cuadro 8. ADEVA Tratamiento control número de plantas sanas (día 6).....	36
Cuadro 9. ADEVA Tratamiento control número de plantas sanas (día 20).....	37
Cuadro 10. ADEVA Tratamiento preventivo número de pústulas por hoja (día 6)..	37
Cuadro 11. ADEVA Tratamiento preventivo número de pústulas por hoja (día 4)..	38
Cuadro 12. ADEVA Tratamiento preventivo número de plantas sanas (día 4).....	38
Cuadro 13. ADEVA Tratamiento preventivo número de plantas sanas (día 14).....	38
Cuadro 14. ADEVA Tratamiento preventivo número de plantas sanas (día 20).....	39
Cuadro 15. Productos efectivos en el ensayo en invernadero.....	41
Cuadro 17. ADEVA número de frutos sanos, primera aplicación	41
Cuadro 16. ADEVA número de frutos sanos, segunda aplicación.....	41
Cuadro 18. ADEVA número de frutos sanos, tercera aplicación	41
Cuadro 19. Análisis económico por producto empleado.....	42
Esquema 1. Esquema de distribución de bioensayo aceites esenciales	22
Esquema 2. Esquema de diseño de mezcla de aceites esenciales.....	23
Esquema 3. Diseño cuadráticos de tres componentes	24
Esquema 4. Esquema de distribución para bioensayo de mezcla de aceites	25

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1:Medios Empleados Para Aislamiento Del Patógeno.....	50
Anexo 2:Obtención De Aceites Esenciales	51
Anexo 3:Aislamiento Del Patógeno <i>Colletotrichum spp.</i>	52
Anexo 4:Estructura Microscópica De <i>Colletotrichum spp.</i> , Comparación Con El Patógeno Aislado	52
Anexo 5:Bioensayos.....	54
Anexo 6:Ensayo Invernadero	55
Anexo 7: Ensayo Invernadero, Analisis de varianza	57
Anexo 8:Gráficos Estadísticos Ensayo de Invernadero	65
Anexo 9:Ensayo Campo.....	71
Anexo 10:Gráficos estadísticos resultados ensayo de campo	75

Bustamante Gavilanes Adriana Elizabeth
Trabajo de Graduación
Ing. Aída Cazar Ramírez, Ms.C
Octubre del 2009

**Actividad Biocontroladora de Aceites Esenciales ante Antracnosis
(*Colletotrichum Spp.*) de Tomate de Árbol (*Solanum Betacea*)**

INTRODUCCIÓN

En nuestro país las tareas agrícolas y ganaderas comenzaron a desarrollarse como actividades económicas necesarias para la supervivencia de los habitantes, pero, actualmente se las realiza con la finalidad de abastecer el mercado local, nacional e internacional. Se ha encontrado un potencial mercado en los frutales por su importancia nutricional. Su comercialización en fresco tanto como materia prima, para la elaboración de conservas y jugos, se ha incrementado notablemente.

El tomate de árbol, *Solanum betacea*, es una planta originaria de los Andes, es cultivada con la finalidad de aprovechar sus frutos comestibles. Al tratarse de una fruta semi ácida, se le considera de alto valor nutricional, buen sabor, apta para la preparación de jugos y mermeladas. Además, tiene un gran potencial de comercialización, productividad durante todo el año, bajo costo de producción y de relativo fácil manejo agronómico. (Idrovo, 2003).

En Ecuador se cultiva desde zonas secas con 400 mm/año o menos, hasta en la selva oriental con más de 1000 mm/año. El cultivo del tomate de árbol es antiguo en el Ecuador en zonas tradicionales como Patate y Baños y con el crecimiento de la demanda interna desde hace unos 15 años se ha extendido comercialmente a otras zonas de producción del callejón interandino y estribaciones de la cordillera: Salinas, Ibarra, Ambuquí, San Gabriel, Bolívar, Pimampiro, Ibarra, Atuntaqui, Tumbaco, Puenbo, Tambillo, Latacunga, Salcedo, Pelileo, Huachi, Biblián, Gualaceo, Paute, Sevilla de Oro, Guachapala, El Pan, Girón, Santa Isabel, Loja., se ha extendido. (Lebn, 1996).

En la última década su cultivo se ha incrementado notablemente; se estima que en el país existen alrededor de 5000 hectáreas, con una producción que oscila entre 60 y 80 toneladas por hectárea/año. El libre comercio en el Pacto Andino y en general a nivel mundial, así como la expectativa en mercados de Europa han abierto algunas perspectivas de crecimiento, desarrollo y exportación de frutos andinos, principalmente de tomate de árbol, mismo que por su alta rentabilidad, en pequeñas áreas constituye el sustento a muchas familias ecuatorianas. (Idrovo, 2003)

Los destinos de exportación del tomate de árbol apuntan actualmente hacia Europa y Estados Unidos, entre otros países. El tamarillo de calidad óptima se reconoce por la apariencia sana de su piel sin manchas, golpes ni picaduras, tiene color intenso y brillante, una forma adecuada, sin achatamientos que señalan ataques de virus. La fruta debe estar firme y lucir fresca; generalmente se la presenta con el pedúnculo.

La falta de plantas certificadas y un deficiente manejo del cultivo han influido para la diseminación de plagas y enfermedades, principalmente la Antracnosis, producida por especies de *Colletotrichum*. Esta patología está causando grandes pérdidas en la producción y una marcada irregularidad en los mercados internacionales que impiden una consolidación en los mismos. Además, el uso de plaguicidas no permitidos unido al excesivo uso de los autorizados para el control de la enfermedad impide la comercialización del producto a nivel mundial. Actualmente la exigencia del mercado se enfoca a la eliminación del uso de agroquímicos y incorporación de tecnología ecológica, nuevos sistemas de control de plagas y enfermedades, nutrición adecuada y en general un manejo con enfoque ecológico o integrado.

Los sistemas de control biológico aseguran la calidad de los alimentos pues representan alternativas seguras tanto para los agricultores, consumidores y medio ambiente. Los plaguicidas naturales más conocidos y utilizados a nivel mundial, son aquellos para el control de insectos, entre los que se encuentran la cebolla (*Allium cepa*), el tabaco, ortiga, piretro. Los extractos de ciertos vegetales como el ajo (*Allium sativum*) y la cola de caballo (*Equisetum arvense*) son efectivos en el control de enfermedades fúngicas y/o bacteriales. (Stauffer et al.; 2000).

En los últimos años, se han desarrollado estudios a la búsqueda de agentes biocontroladores, que incluyen hongos, insectos, extractos vegetales y aceites esenciales que han presentado efectividad en el control de enfermedades agrícolas.

Extractos crudos de las especies vegetales, *Cestrum nocturnum* y *Annona cherimola*, evaluados *in Vitro*, inhibieron la germinación de esporas de *C. gloesporioides*, en porcentajes mayores al 95%. Los extractos de mejorana (*Origanum majorana*), papaya (*Carica papaya*), naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*), bugambilia (*Bougainvillea spectabilis*) muicle (*Justicia spicigera*), perejil (*Petroselinum sativum*), flor de pajarito (*Parthenim hysterophorus*), pirul (*Schinus molle*) e higuera (*Ricinus comunis*) mostraron porcentajes de inhibición menores a 61% por el método de microscopía óptica, y menores a 56% por espectrofotometría. (Hernández, 2004)

Los aceites esenciales son responsables de los mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de microorganismo fitopatógenos. Los compuestos de los aceites esenciales, los terpenoides, actúan en el metabolismo vegetal como antibióticos, y se producen en defensa ante el ataque de microorganismos. Además, estas biomoléculas pueden actuar como fitoalexinas y compuestos anti-alimentarios, que evitan el ataque de herbívoros. (Buchanan, et al., 2000)

Se ha indicado en investigaciones con aceites esenciales que estos son capaces de inhibir el crecimiento de organismos patógenos en plantas. Actualmente son usadas como control alternativo de plagas y enfermedades. En un estudio de evaluación de actividad antifúngica contra la especie *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios, timol y citral. Los resultados demostraron que los compuestos mayoritarios inhiben el crecimiento micelial completamente durante once días de incubación. Las evaluaciones de fitotoxicidad revelan que la aplicación de gotas localizadas sobre la superficie foliar de *Solanum betacea*, no ocasionan ningún daño aparente (Alzate, et al. 2008)

El presente trabajo presenta una alternativa de control de *Colletotrichum spp.* a través de manejos preventivos y control de la enfermedad con aceites esenciales de plantas medicinales seleccionadas por referencias de investigaciones anteriores. Ruilova (2007) en su investigación concluyó que el aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*) puede significar una alternativa para el control de *Pseudomonas syringae* en cultivos de solanáceas, hortalizas y flores. El aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*) e hinojo (*Foeniculum vulgare*) han demostrado una actividad biocontroladora moderada ante *Alternaria sp* (CIM = 6, 25 uL). Los aceites de pamba poleo (*Mentha pulegium*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) presentaron mejor actividad antifúngica de *Botrytis cinerea*.

CAPITULO I

CULTIVO DE TOMATE DE ARBOL

1.1 Generalidades

Solanum betacea pertenece a la familia de las Solanáceas, planta originaria de los Andes Sudamericanos.

Se le conoce popularmente con el nombre de "Tomate de Árbol" aunque recibe otros nombres, tales como "tomate cimarrón, tomate extranjero, granadilla y contragallinazo" en Centroamérica, "berenjena y tomate de palo" en México, "tomate de monte, tomate silvestre, pepino de monte y gallinazo panga" en Colombia y Perú, "chilto, sima, tomate de lima" en Bolivia, "tomate chimango, tomateiro da serra" en Brasil y "Tamarillo" en Nueva Zelanda, país en donde ha sido introducido.

En Ecuador se producen tres variedades reconocidas de tomate de árbol, aunque comercialmente no se las diferencia. Estas son:

- Tomate común: de forma alargada, color morado y anaranjado.
- Tomate redondo: de color anaranjado rojizo.
- Tomate mora: de forma oblonga y de color morado.

A pesar de que en el mercado no se ha establecido una diferenciación clara entre las variedades de esta fruta, se reconocen distintos cultivares; los principales se especifican a continuación, indicándose las características principales relevantes a su comercialización:

- "Ecuadorian orange": fruta de color naranja, tamaño mediano, pulpa color naranja – amarillo, textura cremosa, acidez menor que en otras variedades. Excelente para consumo en fresco y también para uso en cocina gourmet.
- "Goldmine": se trata de un cultivar superior recientemente introducido en Nueva Zelanda. Es una fruta grande de color amarillo – dorado, con pulpa blanda, sabor fuerte pero no ácido. Altamente recomendada para consumo en fresco por su sabor.

- “Inca gold”: fruta amarilla de sabor menos ácido que los tipos rojos. Se la utiliza para consumo y fresco además de cocinada. El sabor de la fruta cocinada ha sido comparado con el del durazno.
- “Oratia Red”: fruta roja de tamaño grande con pronunciado sabor ácido. Se consume fresca y en conservas.
- “Rothamer”: fruta de mayor tamaño que los otros tipos, con cáscara roja brillante y pulpa amarilla – dorada, sabor dulce. Se recomienda su consumo en fresco.
- “Ruby red”: fruta grande, cáscara de color rojo brillante y su pulpa es rojo oscuro. Tiene sabor fuerte y ácido. Se la recomienda para uso en cocina gourmet. En Nueva Zelanda esta variedad es la de cultivo estándar para exportación.
- “Solid gold”: fruta grande con cáscara de color dorado – naranja. Su pulpa es suave con sabor menos ácido que otros tipos. Muy buena para consumo en fresco.
- “Yellow”: fruta de tamaño mediano, con cáscara de color naranja - amarillenta. La pulpa es amarilla con sabor suave. Es el tipo de cultivo más antiguo de tamarillo en Nueva Zelanda. (MAG, 2001)

1.2 Ecología

Es una planta de clima templado seco y sub cálido húmedo. Se le encuentra en altitudes de 1500 a 2600 ms.n.m. y zonas con temperaturas entre 15 y 22°C.

Es muy vulnerable a las bajas temperaturas. No tolera vientos fuertes, ya que se produce la caída de las flores, rotura de las ramas y destrucción de las hojas. Para un buen desarrollo le favorece una Humedad Relativa oscilante entre 70% - 80%. La precipitación varía de 600 – 1500 mm.

Se adapta muy bien a todo tipo de suelo, pero su mejor desarrollo lo alcanza en suelos de textura media con buen drenaje y buen contenido de materia orgánica, pH 5.6 – 7.0. (Manual Agropecuario, 2002)

1.3 Descripción botánica

Es una planta arbustiva con tallos semileñosos, de follaje grande; alcanzando una altura de 2 a 3 m, de ciclo productivo corto (2 a 4 años).

Las hojas son cuoriformes, carnosas, levemente pubescentes y muy grandes.
Las flores son de color rosa y lavanda, agrupadas en racimos terminales; florecen escaladamente.



Figura 1. Características botánicas de tomate de árbol: flores y hojas

El fruto mide de 8-12 cm de largo por 4-6 cm de ancho, de textura firme, piel lisa y brillante, de color variable desde rojo, anaranjado, morado, hasta amarillo, comúnmente de forma elipsoide a ovoide, pulpa anaranjada a roja, jugosa y de sabor agridulce. Contienen muchas semillas pequeñas en cantidades de 120 a 150. Se encuentran solos o agrupados. (Amaya y Julca, 2006)



Figura 2. Características botánicas de tomate de árbol: distribución frutos

1.4 Propagación

El tomate de árbol se puede propagar por semilla botánica, mediante el establecimiento de semilleros; las semillas extraídas de frutos maduros se dejan secar por 10 a 15 días al ambiente y luego se colocan en un almácigo. Demoran 30 días para germinar y cuando las plantas tienen entre 15 y 20 cm de alto (3 ó 4 hojas) se transplantan a terreno definitivo.

Y asexualmente, mediante la obtención de estacas, acodos, ramas o injertos de yema, seleccionadas de plantas vigorosas, sanas, libres de enfermedades (Santillan y Neira, 1988)

1.5 Labores Culturales

1.5.1 Podas

Las podas que requiere el tomate de árbol son muy ligeras.

- Podas de formación: Para lograr una buena arquitectura de la planta, debe someterse a una poda de formación cuando la planta alcanza entre 1,60 y 1,80 m. En el transcurso del crecimiento se deben eliminar brotes o chupones.
- Podas fitosanitarias: Eliminar periódicamente las ramas o ramillas dañadas, enfermas, o afectadas mecánicamente (Amaya y Julca, 2006)

1.5.2 Deshierba

Las deshierbas se realizan en forma manual a lo largo de la corona de cada planta, también se puede realizar en forma mecanizada.

1.5.3 Riegos

Los sistemas de riego más utilizados son mediante surcos paralelos, en zig-zag o serpentín y por coronas individuales. La frecuencia del riego depende de las condiciones climáticas existentes; por lo general, la frecuencia será cada 10 a 15 días.

1.5.4 Fertilización

La fertilización se realiza cada seis meses haciendo uso de 2 0 3 kg. de gallinaza o compuesto, más 80 g de fertilizante químico 8-20-20 o 10-30-10- la aplicación se debe hacer en la corona de cada planta. (MAG, 2001)

1.6 Enfermedades

1.6.1 Antracnosis



La antracnosis del fruto es la enfermedad más importante del cultivo, por su amplia distribución y por las pérdidas económicas que produce al destruir el producto a cosechar.

La enfermedad aumenta su incidencia y severidad cuando factores como lluvias continuas y una humedad relativa alta (76%) se presentan en el cultivo.

Los ataques son más intensos en zonas entre 2000 y 2200 m s.n.m. (Santillán y Neira ,1988)

Figura 3. Cultivo de tomate con síntomas de ataque

1.6.2 Síntomas

Seis días después de la inoculación en los frutos de cualquier edad se producen manchas aceitosas circulares negras, hundidas, de bordes definidos, que aumentan rápidamente de tamaño y se tornan de consistencia seca, para luego cubrir casi todo el fruto y finalmente momificarse en la planta o caer al terreno.



Figura 4. Frutos con síntomas visibles

En condiciones favorables (H.R. alta), se produce en el centro de la mancha una coloración rosada a salmón, que corresponde a las estructuras de reproducción del patógeno (conidios). (Corpoica, 1997)

En cuanto al ataque según el tamaño del fruto, los frutos verde mediano (58%), pequeño (16%) y grande (24%) son los más susceptibles, morado y maduro (7%); de acuerdo al sitio de la lesión, la zona media (38%), ápice (25%), múltiple (20%) y pedúnculo (17%). (Rondón, 2006)

Esta enfermedad se presenta cuando las plantas se encuentran en pleno desarrollo vegetativo, la humedad ambiental alcanza un 95% y la temperatura es superior a 17 °C. Esta enfermedad produce pérdidas de hasta el 90%.

La antracnosis también es diseminada por insectos perforadores de frutos, tales como: *Neoleucinodes elengantalís* y *Leptoglossus zonatus*, y también por algunas larvas de lepidópteros, que facilitan la entrada del hongo y predisponen el fruto a la infección por el patógeno. (Aponete, et al. 2005)

1.6.3 Características Del Patógeno

Los hongos imperfectos, conocidos como Deuteromicetes, constituyen un grupo irregular, ya que sus integrantes solo tienen en común el hecho de que no se conoce la forma sexual de su reproducción. La mayoría de miembros de este grupo son fases conidiales de ascomicetes. Se reproducen por esporas asexuales (conidiospóras) producidas en una estructura llamada conidióforo, que es una simple modificación de la parte apical de la hifa, y de acuerdo a la forma que adopte en cada género, toma cierto nombre. Este grupo presenta un micelio con septos simples, algunas se desarrollan como levaduras y otros presentan alternancia entre la fase de micelio y levadura. Su pared está compuesta de quitina y glucanos. (Deacon, 1990)

Los hongos imperfectos han sido clasificados siguiendo los principios establecidos por Saccardo en *Sylloge fungorum*. Este sistema se basa en la morfología de estructuras de esporulación y en el aspecto y pigmentación de conidias y conidióforos (Cazar, 2006)

- El primer orden pertenece a los Esferopsidales, disponen de un picnidio, formación análoga a la periteca, no contienen ascas, sino conidios.

- El segundo orden de los Melanconiales, desaparece el picnidio pero conservan un estroma diferenciado llamado acérvulo fructífero, formado en gran parte por elementos del huésped y situada debajo de la cutícula, que se rompe al madurar los conidios.
- Orden Hifales o Moniliales, las hifas salen directamente al exterior a producir los conidios.
- El orden de los *micelios estériles*, es la forma más imperfecta de los deuteromicetes, no presenta elementos de clasificación conocidos puesto que, no poseen ninguna clase de esporas, sino simple crecimiento del micelio. (Urquijo, 1971)

Colletotrichum pertenece al orden de los Melanconiales, que se caracterizan porque produce conidios incoloros, de una sola célula, ovoides, cilíndricos y en ocasiones encorvados o en forma de pesas en acérvulos.



Figura 5. Conidios de *Colletotrichum*

Las masas de conidios son de color salmón o rosa. Los acérvulos son subepidérmicos y brotan a través de la superficie de los tejidos de la planta, tienen forma de disco o cojín y son cerosos, son conidióforos simples, cortos y erectos. Los conidios son liberados y se esparcen sólo cuando los acérvulos se encuentran húmedos, y generalmente son diseminados por la lluvia desplazada por el viento o al entrar en contacto con los insectos, otros animales, herramientas, etc. Después de haber germinado, producen un apresorio y un gancho de penetración y se introducen directamente en los tejidos de su hospedero. Al principio, las hifas crecen con gran rapidez tanto intercelular como intracelularmente, pero producen poca o ninguna decoloración visible u otros síntomas.

El hongo adquiere mayor severidad cuando los frutos comienzan a madurar. El hongo puede llegar a las semillas, y es transportado en ellas, sin causar daño aparente. (Agrios, 1985)

El hongo crece con facilidad en papa dextrosa agar (PDA), inicialmente la colonia es cremosa y de color salmón, emitiendo un micelio blanco en sus bordes que con el tiempo se torna grisáceo. Su desarrollo completo se alcanza en 15 días a una temperatura de 25°C. (Bailey y Jeger, 1992).

1.6.4 Medidas de control

Para controlar la enfermedad se debe suspender el riego, realizar podas fitosanitarias y aplicar productos químicos como Ridomil completo (Mancozeb + Metalaxil), a razón de 3 g/L de agua. Otros productos que se pueden utilizar son Polyram Combi (metiram), Antracol (propineb), Bravo 500 (clorotalonil), alternando con fungicidas cúpricos como Cupravit (oxicloruro de cobre), Kocide (hidróxido de cobre), Vitigran (oxicloruro de cobre), a razón de 1 g/L de agua.

CAPITULO II

ACEITES ESENCIALES

2.1 Generalidades

Se estima que únicamente el 2% de las plantas superiores han sido evaluadas por sus propiedades pesticidas, y de hecho, la mayoría de ellas lo han sido por sus propiedades insecticidas. (Loudi, 2007)

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

Las plantas producen compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleadas para controlar diferentes enfermedades en productos hortofrutícolas. Entre los compuestos más importantes están flavonoides, terpenos, aceites esenciales, fenoles, alcaloides, lectinas y polipéptidos. (Hernández, et al. 2007)

Se postula que el mecanismo de acción de los aceites esenciales se manifiesta por el rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. (Hernández, et al. 2007)

Los aceites esenciales tienen efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos. Naturalmente su actividad depende del tipo, composición y concentración del microbio. (Agapito y Sung , 2005)

2.1.1 Métodos de Extracción

Los principales métodos utilizados para obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas son los siguientes:

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

2.1.2 Destilación por arrastre con vapor

La destilación por arrastre con vapor es una técnica para la separación de sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles, basado en que el mayor porcentaje de las partes olorosas que se encuentran en una materia vegetal pueden ser arrastradas con el vapor de agua.

La destilación por arrastres con vapor consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura por adicionar la tensión de vapor que se inyecta a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos líquidos inmiscibles, agua y aceite esencial finalmente se separan en un decantador. (Bandoni, 2000)

La destilación por arrastre con vapor no ha podido ser sustituida por la extracción con solventes orgánicos o con calentamiento directo por la gran cantidad de ventajas que tiene en relación a estos dos últimos sistemas y que pueden resumirse en:

- El vapor de agua es económico en comparación al costo de los solventes orgánicos.
- Asegura que no se recaliente el aceite esencial.
- No requiere el uso de equipos sofisticados.

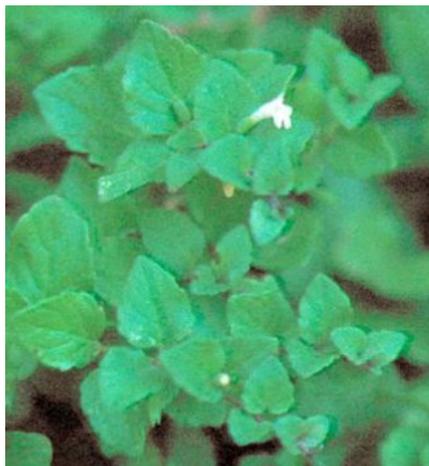
2.2. Descripción de Especies Vegetales

2.2.1. Guarmi poleo, *Clinopodium spp.*

Familia: Lamiaceae

Sinónimos: *Lepechinia schiedeana*

C. Descripción Botánica:



Herbácea andina.

Hábitat: sierra sobre los 2500 m s.n.m.

D. Composición

Diterpenoides abietano en las partes aéreas.

Lepechinia schiedeana: contiene ledol.

E. Propiedades:

Antiespasmódico y carminativo.

Figura 6. Características botánicas *Clinopodium sp.*

2.2.2 Romero, *Rosmarinus officinalis*

Familia: Lamiaceae

A. Descripción Botánica

Arbusto leñoso, siempre verde, llega a los 1m ó 2m. La raíz primaria es leñosa y de ella parten las hojas, dentadas, opuestas, estrechas, de unos 3mm de ancho por 15mm a 40mm de largo. Éstas son lanceoladas, con bordes torcidos hacia fuera, cubiertas internamente por una pelusa, sin pecíolo, dispuestas en el tallo y formando una especie de cruz, de color brillante por el haz y opacas y suaves por el envés.

Los tallos son rígidos, con corteza fisurada; las flores son de color azul pálido, bilabiadas y crecen en pequeños racimos en el encuentro de las hojas con los tallos. (Manual Agropecuario, 2002)



Figura 7. Características botánicas *Rosmarinus officinalis*

B. Composición

Alcanfor, de romero compuesto de pineno, camfeno, ciñelo, borneol, acetato de benzilo, limoneno, falandreno, mirceno.

Contiene alcaloides diterpénicos (isorosmaricina, metilrosmaricina, rosmaricin), flaconas (rebitrina); taninos. (Agapito y Sung, 2005)

C. Propiedades

Antiespasmódico, astringente, emenagogo, estimulante, estomático, tónico. La acción estimulante del romero favorece la función del hígado, la producción de bilis, y la digestión apropiada. También actúa para aumentar la presión sanguínea y mejorar la circulación. Se lo ha utilizado también en jaquecas. Ayuda abrir el apetito y mitiga el gas intestinal. (White, 1976)

2.2.3 Arrayán, *Eugenia hallii*

Familia: Myrtaceae



Figura 8. Características botánicas *Eugenia hallii*

A. Descripción Botánica

Planta arborescente, con altura entre los 5 a 6 m y cobertura de 5m de diámetro. *Tallo*: erguido, leñoso, ramificado desde la base. *Hojas*: opuestas, sin estípulas, pecioladas, limbo ovoide y coriáceo, 0.5 a 2.5 cm de longitud y 0.3 a 1.5 cm de ancho.

Flores: solitarias, axilares, hermafroditas, blancas, actinomorfas y tetrámeras; estambres numerosos, libres, en varios verticilos, filamentos inflexos en el capullo, anteras versátiles introsas; ovario ínfero con placenta axilar, óvulos anátropos, estilo simple y estigma capitado. *Fruto*: drupa, con escasas semillas y escaso endosperma.

B. Composición

De acuerdo a los estudios realizados, contiene los siguientes metabolitos: flavonoides (quercetina, rutina y quercetin-3-metil éter), taninos, triterpenos y

esteroides, aceites esenciales (1,8-cineol, mirtol), leucoantocianidinas y catequinas, fenoles libres, resinas, principio amargo, vitamina C, ácidos (cítrico, tánico y málico), hidrocarburos cafeínico y heterósidos. (Agapito y Sung, 2005)

C. Propiedades

Útil en el tratamiento de desarreglos pulmonares y para contrarrestar el sudor nocturno de la tisis. Es un tónico y se dice que estimula las partes o funciones que estén en decadencia.

Las hojas secas y molidas aplicadas a una herida ayudan a secarla. Utilizadas en el baño, sirven como tónico y para curar el reumatismo. Las hojas verdes pueden ser masticadas por su sabor agridulce, para beneficiar las encías y blanquear los dientes. (White, 1976)

2.2.4 Cedrón, *Lippia citriodora*

Familia: Verbenacea

A. Descripción Botánica

Planta perenne de 1-2 m de altura, tallos erectos y hojas enteras, lanceoladas, verticiladas en grupos de 3-4 y muy aromáticas; flores pequeñas, numerosas, de color violeta, perfumadas y reunidas en largas espigas ramificadas. (White, 1976)



Figura 9. Características botánicas *Lippia citriodora*

B. Composición

Su aceite esencial contiene: cíñelo, citral (20-39%), 1-limoneno (10-15%), sesquiterpenos (40-45%), linalol (4-11%), lipiol, geranial.

Las flores y hojas contienen; ácidos fenolitos, flavonoides, taninos, flacones y alcaloides. (Agapito y Sung, 2005)

C. Propiedades

Es un estimulante del apetito, mejora las digestiones lentas.

Para tratar el estrés. Es carminativo, antiespasmódico. (Agapito y Sung; 2005)

2.2.5 Ruda, *Ruta graveolens L.*

Familia: Rutáceas

A. Descripción botánica

Planta vivaz, provista de raíz leñosa fasciculada; de tallo leñoso así como las ramas inferiores, siendo las superiores cilíndricas y herbáceas, llega a alcanzar una altura de 70 cm. a 1 m.

Las hojas tienen consistencia algo carnosas, son alternas, compuestas por varios segmentos de los cuales los laterales son alargados y el terminal ovalado o blanquecino.



Figura 10. Características botánicas *Ruta graveolens*

Las flores son pequeñas y se agrupan en corimbos apicales, de color amarillo verdoso; el fruto de la ruda es una cápsula que contiene semillas reniformes de color negro. (White A., 1976)

B. Composición

Rutina, alcaloides, glucósidos, flavonoides, taninos. (Agapito y Sung; 2005)

C. Propiedades

Antiespasmódico, estimulante, emenagogo, antihelmíntico, estomático. La ruda es comúnmente usada para tratar los dolores de la gota o reumatismo y para problemas nerviosos del corazón. La infusión se dice es eficaz para eliminar lombrices. También se ha dicho que sirve para calmar dolores de gas y cólicos; para mejorar el apetito y digestión ya para promover el principio de la menstruación. Mascando una-dos hojas de ruda ayuda a calmar dolores de cabeza nervioso y el vértigo. (White A., 1976)

2.3 Actividad Biocontroladora de Aceites Esenciales

Los aceites esenciales de un número importante de especies vegetales, entre los que destacan los géneros Citrus, Thymus, Origanum, Salvia, Mentha, Rosmarinus, Abies, Pinus, Lavandula o Eucaliptus) han sido evaluados por su capacidad fungitóxica y algunos de los compuestos responsables de esta capacidad, mayoritariamente componentes terpénicos, han sido identificados.

Entre ellos subrayan el carvacrol, el p-anisaldehído, L-carvona, eugenol o la D-limonina. (Palou, 2007)

El empleo de aceites esenciales ha resultado útil en el control de pudriciones post cosecha. Por ejemplo los aceites esenciales provenientes de orégano, tomillo, y cilantro se han estudiado para controlar en tomate los hongos de post cosecha. (Hernández, et al. 2007)

El aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*) puede significar una alternativa para el control de *Pseudomonas siringae* en cultivos de solanáceas, hortalizas y flores. El aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*) e hinojo (*Foeniculum vulgare*) han demostrado una actividad biocontroladora moderada ante *Alternaria sp* (CIM = 6, 25 uL). Los aceites de pamba poleo (*Mentha pulegium*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) han presentado mejor actividad antifúngica de *Botrytis cinerea* (Ruilova, 2007).

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 Preparación de material vegetal

Las especies vegetales seleccionadas fueron adquiridas en mercados locales (guarmi poleo, ruda), y de podas a las ramas jóvenes de arbustos de diferentes sectores de la ciudad (romero, cedrón, arrayán).

El material vegetal trabajado se lo obtuvo de las hojas y partes verdes de las plantas. Se eliminó hojas, tallos en mal estado. Para obtener el rendimiento de cada especie se procedió a obtener el peso (Kg.) antes de la extracción.

3.2 Obtención de aceites esenciales

La extracción de aceites esenciales se realizó en el equipo de destilación de arrastre de vapor perteneciente al Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay. (Anexo 2)

El material fresco y pesado (1Kg. aprox.) fue sometido al proceso de extracción.

El equipo cuenta con un sistema de reflujo para condensar el aceite esencial. Los productos de la destilación se separan por la densidad en una columna de vidrio. La extracción del aceite inicia cuando el sistema alcanza el punto de ebullición (92°C a 2500 msnm). El volumen total se obtiene entre 40 – 50 minutos iniciada la extracción. El aceite esencial obtenido se recolectó en frascos ámbar para evitar la degradación por la luz solar. (Anexo 2)

3.3 Aislamiento del patógeno *Colletotrichum spp.*

A. Aislamiento a partir de muestras vegetales

1. Se recolectó muestras de frutos con síntomas visibles de antracnosis.
2. Las muestras obtenidas se trataron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% por un minuto, y fueron lavadas con agua destilada para eliminar residuos de solución.

Se tomó porciones de tejido enfermo y sano (2 cm) que se colocaron en cajas petri en el medio de cultivo (YMG, PDA). (Anexo 1).

3. Las cajas se sellaron con parafilm e incubaron en la estufa a una temperatura de 24-26° C., manteniendo una humedad de 50-60% por un período de 2 a 5 días.

Se eliminaron las colonias de color verde con textura terrosa, típica de *Penicillium*, y las de color negro y textura terrosa, que corresponde a *Aspergillus*. (Anexo 3)

B. Purificación de *Colletotrichum sp*

1. Se seleccionó las colonias promisorias, y cada una de ellas se repicó a cajas petri con medio de cultivo.
2. Este proceso se repitió hasta obtener cultivos puros. La comprobación de la obtención de aislados puros, se realizó por aplicación de los postulados de Koch, y observación al microscopio, y comparación de estructuras reproductivas con referencias bibliográficas (Barnett, 1972) (Anexo 4)

C. Mantenimiento de cultivos puros

La cepa del hongo aislada se mantuvo en cajas petri que se transfirió a cajas frescas mediante asa flameada y se los incubó a una temperatura de 24-26° C., hasta observar un crecimiento miceliar. Las cajas se repicaron cada tres semanas.

D. Extracción de Esporas

1. En las placas que presentaron un buen nivel de crecimiento del patógeno aislado, se adicionó 5 ml agua destilada estéril y se procedió a remover el micelio con un asa flameada.
2. De esta suspensión se tomó 1 ml y se trasvasó a los tubos eppendorf evitando contaminaciones.
3. Las suspensiones de esporas obtenidas se llevaron a congelación. Aquellos que no se congelaron fueron descartados por considerarse esporas no viables.

E. Conteo de Esporas

1. Se seleccionó las placas con mejor crecimiento miceliar
2. Con una pipeta automática se colocó 5 ml de agua destilada estéril en la caja de cultivo.
3. Con un asa flameada se realizó un raspado del micelio.
4. Esta solución se la pasó por gasa y el líquido obtenido se lo recolectó en tubos eppendorf de 1ml.
5. El conteo de esporas/ml se lo hizo en la cámara de Newbawer. Donde, en las rejillas de la cámara se colocó 20 μ L de la solución de esporas. Se observó al microscopio usando un objetivo de 40x. Se escogió la cuadrícula central, y los cuatro cubículos laterales, se procedió a un conteo de las esporas visibles en la cuadrícula, se obtuvo el medio y se multiplica por un factor de 4×10^6 para estimar el promedio de esporas.

F. Identificación del Patógeno

1. Se seleccionó la colonia con las mejores características de crecimiento, que mostraron alta pureza.
2. La cepa se llevó al Laboratorio de Biotecnología del INIAP, Estación Experimental Chuquipata; para su identificación.
3. La cepa fue enviada a un centro de referencia, donde será identificada a nivel de género y especie, en función de claves morfológicas y estudios moleculares. Con estos datos se asegura la correcta identificación del patógeno.

3.4 Bioensayos in Vitro

A. Bioensayos con Aceites Esenciales

Para evaluar el efecto antifúngico de los aceites esenciales de las diferentes especies se empleó placas ELISA, donde:

1. Se preparó una solución 1:1 de 50 μ L medio y 50 μ L aceite y homogenizamos.
2. En la primera columna de las placas se colocó 100 μ L de la solución.

3. En el control de crecimiento microorganismo (columna 12) se colocó 50 μL de medio y en el control de medio 100 μL de medio o esterilidad (columna 11).

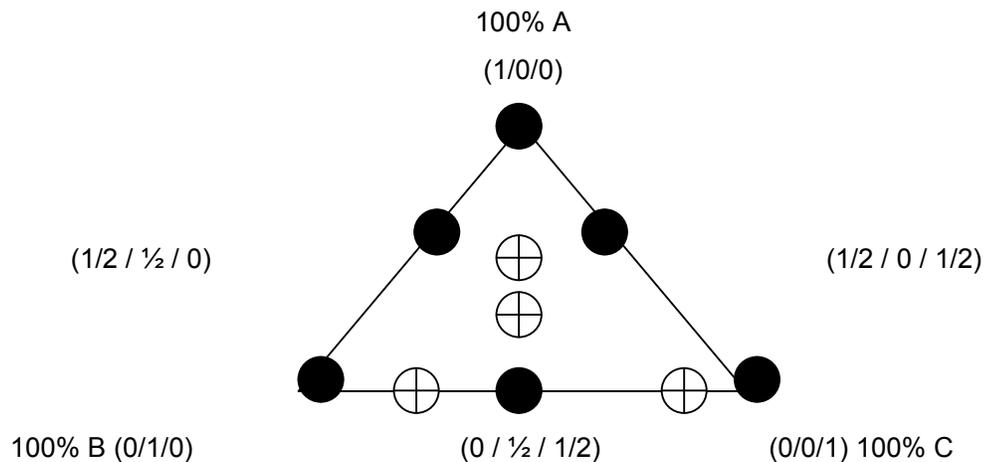
4. Se tomó 50 μL de la mezcla aceite- medio, colocados en la primera columna y con una pipeta multicanal se realizó una dilución seriada hasta la columna correspondiente al control de medio.

5. Se preparó una dilución de esporas 1:10, colocando 9 ml de agua destilada estéril y 1 ml de esporas y homogenizamos.

6. Se colocó 50 μL de esta solución en los pocillos a excepción del control de medio y se los llevó a la estufa de 48 – 72 horas, luego de este tiempo se evaluó visualmente la inhibición de crecimiento del patógeno comparando con la columna de crecimiento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A (Arrayán)	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
B (Romero)												
C (Guarmi poleo)												
D (Cedrón)												
E (Ruda)												
F (Hierba luisa)												
G												
H												

Esquema 1. Esquema de distribución de bioensayo aceites esenciales

B. Bioensayos desarrollados con mezcla de aceites**Esquema 2.** Esquema de diseño de mezcla de aceites esenciales

En un diseño la suma de todos los componentes es el 100%. Los factores de mezcla son expresados como fracciones de la cantidad total. Los rangos experimentales se hallan entre cero y uno, es decir, que no puede ser cambiado total e independientemente uno de otro. En dependencia del tipo de preparación es posible considerarlo como un componente. Los diseños más comunes de mezclas son: simplex lattice, simplex-centroide y simplex aumentado.

El diseño simplex lattice consiste en un grupo de ensayos experimentales espaciados uniformemente en un triángulo. Este grupo de experimentos se obtiene de la combinación de $m + 1$ fracciones de componentes (donde m es el número de niveles); esto es, $x_i = 0, 1/m, 2/m, \dots$; donde $i = 1, 2, 3, \dots$ para $m=1$ el simplex lattice se emplea en modelos lineales para la observación de las características de los componentes puros que corresponden a los vértices de un triángulo. Si se consideran tres parámetros del modelo, este diseño no es capaz de estimar el error experimental o probar la validez del ajuste. Estas limitaciones pueden ser resueltas usando un modelo simplex-centroide que adiciona un punto central de coordenadas $(1/3, 1/3, 1/3)$.

El diseño simplex lattice para modelos cuadráticos ($m=2$) incluye mezclas binarias cuyas coordenadas corresponden a los puntos medios en las líneas que conectan los vértices para estimar efectos no lineales. Un estudio más completo puede realizarse aumentando el modelo simplex centroide con puntos adicionales conocidos axiales.

Estos puntos incluyen los tres componentes y están localizadas a una distancia $d=2/3$ desde el centroide en el radio que lo conecta con estos vértices.

Xp	Simplex-Lattice			Simplex-Centroide			Simplex Aumentado		
	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
2	0	1	0	0	1	0	0	1	0
3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
4	1/2	1/2	0	1/2	1/2	0	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2	1/2	0	1/2	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2	0	1/2	1/2	0	1/2	1/2
7	-	-	-	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3
8	-	-	-	-	-	-	1/6	1/6	2/3
9	-	-	-	-	-	-	1/6	2/3	1/6
10	-	-	-	-	-	-	2/3	1/6	1/6

Esquema 3. Diseño cuadráticos de tres componentes

El protocolo para los bioensayos con las mezclas fue el siguiente:

1. Se preparó una solución 1:1 de 50 μL medio y 50 μL mezcla - aceite y se la homogenizó.
2. Para cada mezcla se tomó 1 columna. Se realizó tres repeticiones por cada mezcla.
3. En el control de crecimiento (columna12) se colocó 50 μL de medio y en el control de medio 100 μL de medio (columna 11).
4. Se tomó μL de la mezcla que se colocó en cada pocillo, de las filas de la placa.
5. Se preparó una dilución de esporas 1:10. Se colocó 9 ml de agua destilada estéril y 1 ml de esporas y se homogenizó.
6. Se colocó 100 μL de esta solución en los pocillos a excepción del control de medio y se llevó a la estufa de 48 – 72 horas, con revisión cada 24 horas para observar inhibición de crecimiento.

	1 (A) 100 μL	2 (B) 100 μL	3 (C) 100 μL	4 (D) 100 μL	5 (E) 100 μL	6 (F) 100 μL	7 (G) 100 μL	8 (H) 100 μL	9 (I) 100 μL	10 (J) 100 μL	11	12
A R I											CONTROL DE MEDIO	CONTROL DE CRECIMIENTO
B R II												
C R III												
D												
E												
F												
G												
H												

Esquema 4. Esquema de distribución para bioensayo de mezcla de aceites

3.5 Ensayo en invernadero y campo

Según los resultados obtenidos en los bioensayos, se establecieron los ensayos en invernadero. Para la aplicación de los productos se partió del volumen de aceite empleado para el bioensayo, y la dosis comercial de los productos químicos.

Para la aplicación de los aceites estos se diluyeron en un dispersante, Sodio Dodecil Sulfato (SDS) al 2%. Previamente se efectuó una prueba de fitotoxicidad en las plantas, los resultados obtenidos determinaron la inocuidad del producto.

3.5.1 Ensayos Invernadero

Para llevar a cabo este ensayo, se emplearon plantas de fréjol, también susceptibles a *Colletotrichum spp.* Se escogió esta especie por sus facilidades de manejo y tiempo de desarrollo de plantas. Dentro del invernadero se proporcionó mayor humedad al ambiente colocando contenedores con agua para facilitar la manifestación de síntomas de la enfermedad. (Anexo 6)

Se realizaron dos tipos de ensayos:

1. Preventivo: En plantas de fréjol de 30 días a la siembra, cultivadas en macetas de 2 litros de capacidad, se aplicaron los diferentes productos a ser evaluados (tratamientos) y 24 horas posteriormente se realizó la aspersión del inoculante de *Colletotrichum spp.* Se evaluó la eficiencia de los diferentes tratamientos cada 48 horas por 21 días; que inició 48 horas luego de la inoculación. (Anexo 6)
2. Control: En plantas de fréjol cultivadas en macetas de 2litros de capacidad, de 30 días a la siembra, se aplicó el inoculante del hongo *Colletotrichum spp.* Ocho (8) días posteriores a la inoculación, se inició la aplicación de los diferentes productos a ser evaluados. La evaluación de la eficiencia de los diferentes tratamientos se realizó cada 48 horas, la misma que se inició a las 48 horas luego de la primera aplicación de los diferentes productos.

Para evaluar la eficiencia de los aceites en invernadero se empleó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, el número de unidades experimentales por tratamiento fueron cuatro en invernadero. (Anexo 6)

Los tratamientos establecidos se presentan en el siguiente cuadro:

Tratamiento	Componentes	Formulación	Dosis
1	Romero	4 mL de aceite en 250 mL de dispersante	16 mL/L
2	Ruda	4 mL de aceite en 250 mL de dispersante	16 mL/L
3	Arrayán	4 mL de aceite en 250 mL de dispersante	16 mL/L
4	Guarmi poleo	4 mL de aceite en 250 mL de dispersante	16 mL/L
5	Cedrón	4 mL de aceite en 250 mL de dispersante	16 mL/L
6	mezcla bioactiva 5: 50% arrayán, 50% guarmi poleo	2 mL de aceite de arrayán y 2 mL de aceite de guarmi poleo en 250 mL de dispersante	16 mL/L
7	mezcla bioactiva 9: 16.67% arrayán, 16.67%ruda, 66.66%guarmi poleo	0.66 mL aceite arrayán, 0.66 mL aceite ruda, 2.66 mL aceite guarmi poleo en 250 mL de dispersante	16 mL/L
8	mezcla bioactiva 10: 16.67% arrayán, 16.67%ruda, 16.66%guarmi poleo	0.66 mL aceite arrayán, 0.66 mL aceite ruda, 0.66 mL aceite guarmi poleo en 250 mL de dispersante	16 mL/L
9	Oxithane: fungicida órgano cúprico de contacto	Mancozeb 500g Oxicloruro de cobre 190g Complejo férrico 50g/ Kg	2.5g/L
10	Excellent: fungicida, bactericida de contacto de acción sistémica	Hidroximetil Alquil-Dimetil N 160 i.a.g/l	0.8-1 cc/L
11	Daconil: fungicida orgánico de contacto	Clorotalonil	1 cc/L
12	Testigo	Agua destilada	

Cuadro 1. Tratamientos empleados en el ensayo de invernadero. Dispersante: Sodio Dodecil Sulfato (SDS) al 2%

Los datos obtenidos se tabularon por separado; los tratamientos de control y preventivo, las evaluaciones se realizaron durante veinte y uno días cada cuarenta y ocho horas.

Para determinar los tratamientos efectivos en este ensayo se realizó el análisis de varianza correspondiente para cada grupo de datos reportados por día. La prueba de significación aplicada fue la de rangos múltiples o Duncan. (Anexo 7)

Las gráficas estadísticas (Anexo 8) se realizaron de cada variable analizada evaluada durante el ensayo.

3.5.2 Ensayo de campo

Para el ensayo en campo, los tratamientos a aplicar seleccionados fueron aquellos que mostraron un buen control en bioensayos (aceites y mezclas) y en invernadero. Los mismos que fueron: aceite de guaraní poleo, mezcla bioactiva 9 (16,67% arrayán, 16,67% ruda, 66,66% poleo). Para comprobar su eficiencia se compararon con los productos químicos usados en el ensayo anterior.

El huerto seleccionado para aplicación de los productos se define por las siguientes características:

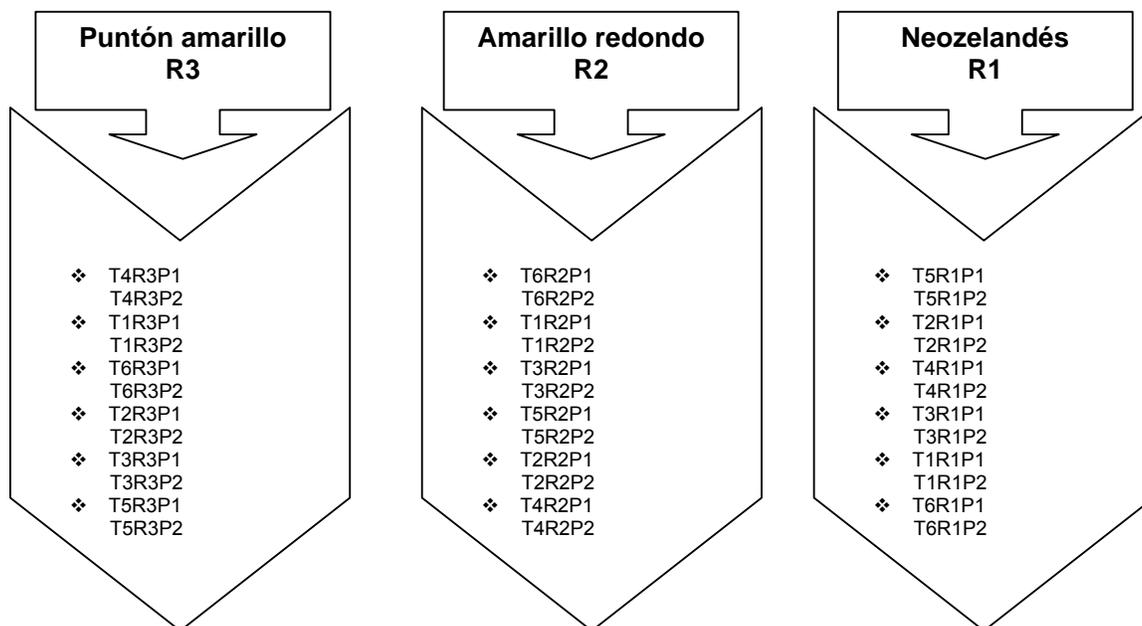
Ubicación: Parroquia Bullcay, Cantón Gualaceo. A 20 km de Cuenca

Condiciones Edafoclimáticas: temperatura oscilante entre 18-25°C, humedad relativa 35-80% en períodos lluviosos. Suelo areno-arcilloso, de rápida absorción de agua.

Características del huerto: huerto experimental, con diversas plantaciones (mora, papaya, tomate). (Anexo 9)

En la plantación encontramos tres ecotipos: puntón amarillo, redondo rojo, neozelandés. (Anexo 9)

El proceso de selección de las plantas fue aleatorio. Los tratamientos (6) y las repeticiones (3), el número de unidades experimentales por tratamiento fueron dos.



Esquema 5. Esquema de distribución ecotipos ensayo campo

Los tratamientos se establecieron de la siguiente manera:

Tratamiento	Componentes	Formulación	Dosis
1	Guarmi poleo	4.8 mL de aceite en 3 L de dispersante	1.6 mL/L
2	mezcla bioactiva 9: 16.67% arrayán, 16.67% ruda, 66.66% guarmi poleo	0.8 mL aceite arrayán, 0.8 mL aceite ruda, 3.2 mL aceite guarmi poleo en 3 L de dispersante	1.6 mL/L
3	Oxithane: fungicida órgano cúprico de contacto	Mancozeb 500g Oxicloruro de cobre 190g Complejo férrico 50g/ Kg	2.5g/L
4	Excellent: fungicida, bactericida de contacto de acción sistémica	Hidroximetil Alquil-Dimetil N 160 i.a.g/l	0.8-1 cc/L
5	Daconil: fungicida orgánico de contacto	Clorotalonil	1 cc/L
6	Testigo		

Cuadro 2. Tratamientos empleados en el ensayo de campo. Dispersante: Sodio Dodecil Sulfato (SDS) al 2%

El ensayo fue desarrollado con el Diseño experimental de Bloques completos al azar. La comparación de la eficiencia de los aceites esenciales se realizó con una rotación de fungicidas químicos.

Las variables que se evaluaron fueron: número de frutos sanos, frutos enfermos de un total de frutos sanos presentes; este análisis se realizó antes y después de cada aplicación. Para mayor efectividad de control se consideró el número de frutos en una rama escogida al azar.

Las aplicaciones de los productos se realizaron cada 15 días, empleando un volumen total para cada aplicación de 3 L., 0.5 L/planta

3.6 Análisis Económico

Para el análisis económico tanto de los aceites como de los productos químicos se empleó la siguiente fórmula:

Relación Beneficio / Costo

$$\text{Relación B/C} = \frac{\text{Suma de todos los beneficios}}{\text{Suma de todos los costos}}$$

Especie	costo unidad (mL)	volumen Ha	costo Ha
Arrayán	0,42	2222 mL	933.24
Ruda	1	1844.26 mL	1844.26
Guarmi Poleo	4,8	4629.16 mL	22219.96
Oxithane	0,33	1,5kg	333
Excellent	0,83	1.5 L	833
Daconil	1	3.3 L	900

Cuadro 3. Costos de obtención y aplicación en aceites esenciales por Ha

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Concentración de inóculo

La metodología empleada para el conteo de esporas nos dio como resultado que la concentración óptima de esporas para *Colletotrichum spp.* fue de $3,5 \cdot 10^8$ esporas/ml.

4.2 Rendimiento de extracción de aceites esenciales

Los rendimientos de extracción de aceites esenciales varían según la especie, la época de recolección del material vegetal y el estado fisiológico de las plantas. En el cuadro 4, se reporta el rendimiento para cada especie.

Especie	Peso material vegetal	Volumen aceite esencial	Rendimiento (mL /kg)
Romero	1 kg	16 ml	16mL/Kg
Ruda	1 kg	1.5 ml	1.5mL/Kg
Arrayán	1 kg	3.1 ml	3.1mL/Kg
Poleo	1 kg	1.5 ml	1.5mL/Kg
Cedrón	1 kg	2 ml	2mL/Kg
Hierba luisa	1 kg	7 ml	7 ml/Kg

Cuadro 4. Rendimiento de aceites esenciales (mL/Kg)

4.3 Bioensayos con aceites esenciales

Los bioensayos fueron desarrollados mediante pruebas in Vitro. Las muestras de ensayo fueron preparadas con los aceites en estudio, según el procedimiento de dilución presentado en el Esquema 1. En base a los resultados del bioensayo se determinaron las dosis mínimas de aceites que demostraron actividad biocontroladora frente a *Colletotrichum*. Los resultados se reportan en el siguiente cuadro

Especie	Dosis
Arrayán	25 µL
Romero	50 µL
Guarmi poleo	25µL
Cedrón	50 µL
Ruda	25 µ

Cuadro 5. Dosis de aceites esenciales efectivos en bioensayo

El aceite de hierba luisa no mostró inhibición del patógeno, siendo descartado para la realización del estudio. (Anexo 5)

En el segundo bioensayos se procedió a la formulación de las mezclas de aceites esenciales; los componentes seleccionados fueron los aceites de las tres especies que demostraron inhibición de crecimiento del patógeno con 50µL y 25µL: arrayán, guarmi poleo, ruda. Las mezclas de prueba fueron formuladas en las proporciones de un diseño Simplex aumentado (ver Materiales y Métodos).

Mezcla bioactiva 1: 100% arrayán, 0% ruda, 0% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 2: 0% arrayán, 100% ruda, 0% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 3: 0% arrayán, 0% ruda, 100% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 4: 0% arrayán, 50% ruda, 50% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 5: 50% arrayán, 0% ruda, 50% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 6: 50% arrayán, 50% ruda, 0% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 7: 66.67% arrayán, 16.67% ruda, 16.67% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 8: 16.67% arrayán, 66.67% ruda, 16.66% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 9: 16.67% arrayán, 16.67% ruda, 66.66% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 10: 16.66% arrayán, 16.67% ruda, 16.67% guarmi poleo

De las diez mezclas formuladas, mostraron efectividad ante el patógeno en el control del patógeno, en las tres repeticiones a las 24 horas y 48 horas fueron:

Mezcla bioactiva 5: 50% arrayán, 0% ruda, 50% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 9: 16.67% arrayán, 16.67% ruda, 66.66% guarmi poleo

Mezcla bioactiva 10: 16.66% arrayán, 16.67% ruda, 16.67% guarmi poleo

(Anexo 5)

4.4 Pruebas de campo

4.4.1 Ensayo en Invernadero

Como se señaló en la metodología del ensayo se establecieron dos grupos de tratamientos: uno de control y otro preventivo. En los cuales los mejores tratamientos se determinaron por presentar una menor incidencia en el ataque del patógeno luego de la inoculación.

En los siguientes cuadros se reportan los resultados obtenidos para el Análisis de Varianza y las pruebas de significación realizadas (Anexo 7). Esta variable permitió establecer las diferencias entre tratamientos y la eficiencia de los mismos.

Tratamiento control

Análisis de Varianza para Número de pústulas por hoja día 4

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _{t 0,05}	F _{t 0,001}
Tratamientos	11	1,507	0.137	1.512	2.64	3.92 ^{N.S.}
Repetición	36	3.262	0.091			
Total	47	4.770				
Error						

Cuadro 6. ADEVA Tratamiento control Número de pústulas por hoja (día 4)

N.S. No existen diferencias significativas entre tratamientos

Tratamiento T4 (aceite de poleo) demuestra ser el más eficiente a partir del día 14 posterior a la única aplicación. Los demás tratamientos demuestran una actividad similar.

Esta tendencia se mantiene para los datos del día 16, 18 y 20. Estos resultados confirman la eficiencia del tratamiento 4, y los restantes tratamientos se reagrupan en dos niveles de eficiencia que podrían discriminarse en función de costos en el caso de los aceites y mezclas y de posibilidades de rotación en el caso de fitofármacos.

Análisis de Varianza para Número de hojas atacadas por planta (día 14)

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _{t 0,05}	F _{t 0,001}
Tratamientos	11	1.287	0.117	1.503	2.64	3.92 ^{N.S.}
Repetición	36	4.003	0.111			
Total	47	5.290				
Error						

Cuadro 7. ADEVA Tratamiento control Número de hojas atacadas por planta (día 4).

N.S. No existen diferencias significativas entre tratamientos

Para la variable número de hojas atacadas se reportan los resultados obtenidos de los datos del día 2 y día 14.

Los resultados para el día 14 señalan al tratamiento 4 (aceite de poleo) como el más eficiente, observándose que los restantes tratamientos mantienen un comportamiento similar sin diferenciarse del testigo.

En base a estos resultados podemos señalar que el tratamiento 4, es eficiente para controlar los síntomas iniciales de la enfermedad (número de pústulas y número de hojas atacadas).

Análisis de Varianza para Número de plantas sanas (día 6)

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _{t 0,05}	F _{t 0,001}
Tratamientos	11	4.877	0.443	3.131*	2.64	3.92
Repetición	36	5.098	0.142			
Total	47					
Error						

Cuadro 8. ADEVA Tratamiento control número de plantas sanas (día 6)

* Existen diferencias significativas entre tratamientos

En esta variable nos ha permitido determinar con claridad cuáles han sido los tratamientos más efectivos en este ensayo por la mayor variabilidad de sus datos como se observa en los cuadros.

Se puede observar como se esperaba que el tratamiento testigo (12) presentara el menor número de plantas sanas. Los tratamientos efectivos no presentan variaciones a partir del día 14.

DIA 6

T4=2.625A

T10=2.625A

T9=2.550A

T6=2.375AB

T8=2.300AB

T7=2.300AB

T1=2.275AB

T5=2.200AB

T11=2.200AB

T3=1.925BC

T2=1.850BC

T12=1.500C

En la prueba de significación para la variable número de plantas sanas en el día 6 nos demuestra que de acuerdo a los rangos establecidos, los agrupados con la letra A, son los tratamientos más eficientes para detener el avance de la enfermedad, los señalados con AB mantienen similitud en su control; en tanto que los que llevan ABC, C son los menos eficientes para controlar la enfermedad.

DIA 14

T4=2.775A

T10=2.700AB

T1=2.550ABC

T9=2.475 ABC

T11=2.450 ABC

T6=2.450 ABC

T7=2.375 ABC

T8=2.300 ABC

T5=2.200 BC

T3=2.200BC

T2=2.025C

T12=1.250D

Esta tendencia se mantiene hasta el día 20 de la evaluación de los tratamientos. Determinando que el Tratamiento 4 (aceite de guarmi poleo) ha sido efectivo en controlar los síntomas de la antracnosis durante el ensayo.

Análisis de Varianza para Número de plantas sanas (día 20)

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _{t 0,05}	F _{t 0,001}
Tratamientos	11	4.622	0.420	4.119	2.64	3.92**
Repetición	36	3.672	0.102			
Total	47	8.295				
Error						

Cuadro 9. ADEVA Tratamiento control número de plantas sanas (día 20)

** Existen diferencias altamente significativas entre tratamientos

Tratamiento Preventivo

Análisis de Varianza para Número de pústulas por hoja (día 6)

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _{t 0,05}	F _{t 0,001}
Tratamientos	11	1.424	0.129	1.381	2.64	3.92 ^{N.S.}
Repetición	36	3.375	0.094			
Total	47	4.799				
Error						

Cuadro 10. ADEVA Tratamiento preventivo número de pústulas por hoja (día 6)

N.S. No existen diferencias significativas entre tratamientos.

Para esta variable, los resultados obtenidos en el ADEVA no demuestran diferencias significativas entre tratamientos. Se puede señalar que los tratamientos tienen un comportamiento similar durante todo el ensayo. El tratamiento 4 mantiene la tendencia de presentar en las plantas tratadas el menor número de pústulas.

Análisis de Varianza para Número de hojas atacadas por planta (día 4)

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _t 0,05	F _t 0,001
Tratamientos	11	0.670	0.061	0.775	2.64	3.92 ^{N.S.}
Repetición	36	2.830	0.079			
Total	47	3.500				
Error						

Cuadro 11. ADEVA Tratamiento preventivo número de pústulas por hoja (día 4)

N.S. No existen diferencias significativas entre tratamientos.

Para el análisis de varianza en la variable número de hojas atacadas no se presenta una diferencia significativa entre tratamientos y la efectividad de los tratamientos biocontroladores 4, 1, 7 (Cuadro 2) mantienen en la evaluación el menor número de hojas atacadas con una marcada diferencia de los demás tratamientos.

Análisis de Varianza para Número de plantas sanas (día 4)

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _t 0,05	F _t 0,001
Tratamientos	11	4.306	0.391	4.594	2.64	3.92**
Repetición	36	3.068	0.085			
Total	47	7.373				
Error						

Cuadro 12. ADEVA Tratamiento preventivo número de plantas sanas (día 4)

** Existen diferencias altamente significativas entre tratamientos

Análisis de Varianza para Número de plantas sanas (día 14)

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _t 0,05	F _t 0,001
Tratamientos	11	6.903	0.628	5.443	2.64	3.92**
Repetición	36	4.150	0.115			
Total	47	11.053				
Error						

Cuadro 13. ADEVA Tratamiento preventivo número de plantas sanas (día 14)

** Existen diferencias altamente significativas entre tratamientos

De acuerdo al análisis para la variable número de plantas sanas, a partir del día 14 se puede observar claramente la efectividad de los productos aplicados. De los tratamientos biocontroladores, el aceite de poleo (T4) demuestra similar control que los fitofármacos 10 y 11 evidenciando que las plantas no vuelven a ser atacadas por el patógeno.

Análisis de Varianza para Número de plantas sanas (día 20)

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _{t 0,05}	F _{t 0,001}
Tratamientos	11	4.622	0.420	4.119	2.64	3.92**
Repetición	36	3.672	0.102			
Total	47	8.295				
Error						

Cuadro 14. ADEVA Tratamiento preventivo número de plantas sanas (día 20)

** Existen diferencias altamente significativas entre tratamientos

DIA 14

T4=2.775A

T10=2.700AB

T1=2.550ABC

T9=2.475ABC

T11=2.450ABC

T6=2.450ABC

T7=2.375ABC

T8=2.300ABC

T5=2.200BC

T3=2.200BC

T2=2.025C

T12=1.250D

DIA 20

T4=2.775A

T10=2.775A

T11=2.550A

T6=2.550A

T1=2.525A

T3=2.475A

T9=2.475A

T7=2.475A

T8=2.450A

T2=2.375A

T5=2.350A

T12= 1.500B

Estos resultados obtenidos se resumen en el cuadro siguiente:

Tratamiento	Variables	Productos eficientes
Control	Nro. pústulas	Guarmi poleo, mezcla bioactiva 9, Daconil, excellent
	Nro. Hojas atacadas por planta	Guarmi poleo; mezcla bioactiva 10; daconil, excellent
	Nro. Plantas sanas	Guarmi poleo; mezcla bioactiva 10, daconil, excellent
Preventivo	Nro. pústulas	Guarmi poleo, mezcla bioactiva 5, mezcla bioactiva 9, mezcla bioactiva 10, oxithane, daconil
	Nro. Hojas atacadas por planta	romero, guarmi poleo, mezcla bioactiva 9, daconil
	Nro. Plantas sanas	Guarmi poleo, mezcla bioactiva 9, daconil

Cuadro 15. Productos efectivos en el ensayo en invernadero.

(Composición de las mezclas de aceites esenciales: mezcla e = 50% arrayán, 0% ruda, 50% guarmi poleo; mezcla bioactiva 9 = 16.67% arrayán, 16.67% ruda, 66.66% guarmi poleo; mezcla bioactiva 10= 16.66% arrayán, 16.67% ruda, 16.67% guarmi poleo)

4.4.2 Resultados ensayo de campo

El ensayo de campo se realizó en la parcela de valoración de ecotipos de tomate de la EE.del Austro (INIAP): las variables evaluadas fueron: número de frutos sanos y número de frutos enfermos.

Análisis de Varianza para variable frutos sanos 1º aplicación

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _t 0,05	F _t 0,001
Tratamientos	5	0.167	0.033	0.887	3.11	5.06 ^{N.S.}
Repetición	12	0.453	0.038			
Total	17	0.620				
Error						

Cuadro 17. ADEVA número de frutos sanos, primera aplicación

N.S. No existen diferencias significativas entre tratamientos.

Análisis de Varianza para variable frutos sanos 2º aplicación

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _t 0,05	F _t 0,001
Tratamientos	5	0.239	0.048	0.923	3.11	5.06 ^{N.S.}
Repetición	12	0.621	0.052			
Total	17	0.860				
Error						

Cuadro 16. ADEVA número de frutos sanos, segunda aplicación

N.S. No existen diferencias significativas entre tratamientos.

Análisis de Varianza para variable frutos sanos 3º aplicación

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F _c	F _t 0,05	F _t 0,001
Tratamientos	5	0.055	0.011	0.960	3.11	5.06 ^{N.S.}
Repetición	12	0.138	0.012			
Total	17	0.194				
Error						

Cuadro 18. ADEVA número de frutos sanos, tercera aplicación

N.S. No existen diferencias significativas entre tratamientos.

Cabe mencionar que las plantas presentaban distintos grados de ataque del patógeno. Los resultados obtenidos en el análisis de varianza determinaron que no existen diferencias significativas entre los biocontroladores y los fitofármacos utilizados en este ensayo. La variable evaluada (frutos sanos) nos permitió establecer diferencias entre los ecotipos, resultados que se atribuyen a la presencia de ciertos niveles de resistencia natural de los ecotipos al patógeno.

En términos generales podemos señalar que los tratamientos cumplieron con el objetivo de controlar el ataque del patógeno mediante mecanismos de disminución del avance del área atacada hasta inhibición de su presencia en los nuevos frutos.

En base a los resultados señalamos que los tratamientos 1 (aceite de guarmi poleo), 2 (mezcla bioactiva 9: 16.67% arrayán, 16.67% ruda, 66.66% guarmi poleo) demuestran el mismo grado de control que los productos químicos. Esta efectividad se puede observar en gráficas estadísticas realizadas. (Anexo 10)

4.4.3 Análisis económico

Tratamiento	costo Ha	Rendimiento Ajustado*kg	Beneficio Bruto**\$	Beneficio Neto\$/ Ha ***
Ruda	933.24	179982	44995,5	44062,26
Arrayán	1844.26	179982	44995,5	43151,24
Guarmi Poleo	22219.96	179982	44995,5	22775,54
Oxithane	333	179982	44995,5	44662,5
Excellent	833	179982	44995,5	44162,5
Daconil	900	179982	44995,5	44095,5

Cuadro 19. Análisis económico por producto empleado

* Rendimiento ajustado: rendimiento promedio (60 frutos sanos por planta * 1333.33 plantas por Ha) -10%= 324

** Beneficio bruto: rendimiento ajustado 179982 x precio mercado 0,25= 44995,5

*** Beneficio neto: beneficio bruto - costo

Para el análisis económico se consideró un promedio de producción de 54 frutos sanos/planta, el valor del fruto en el mercado se estimó en 0.25 centavos.

Con estos datos se obtuvieron los resultados (cuadro 9) en la que se puede observar que los tratamientos en términos de beneficio igualan los costos de los productos químicos, cabe destacar que esta tabla no se valora el valor agregado de obtener un producto orgánico, el mismo que debería tener un mayor precio en el mercado.

En base a los resultados obtenidos podemos señalar que: en el ensayo in Vitro se evaluó aceites esenciales que en estudios anteriores mostraron resultados relevantes. Se consideró para el primer bioensayo las especies de: menta, romero, cedrón, hierba luisa y las especies arrayán, ruda y poleo como alternativas para el control de *Colletotrichum*, puesto que esta fue la primera evaluación de estos aceites frente al patógeno.

Para poder determinar mayor efectividad de los aceites esenciales se planteó como alternativa el sinergismo entre plantas medicinales. El material vegetal seleccionado para este bioensayo se obtuvo de los resultados del primer bioensayo. Los aceites de: Arrayán, guaraní poleo, ruda inhibieron crecimiento micelial del patógeno a 50 y 25 μL , es decir a 50 y 75% de su concentración.

Los resultados de los ensayos inVitro más relevantes fueron escogidos para ser evaluados en invernadero y comparados con productos químicos como se reporta en el cuadro 5.

Con los datos reportados podemos señalar que el tratamiento cuatro (aceite esencial de guaraní poleo) y el tratamiento siete (mezcla bioactiva 9: 16.67% arrayán, 16.67% ruda, 66.66% guaraní poleo) demuestran aptitud para usarlos como productos de control preventivo y curativo, dependiendo de la época de aplicación y presencia del patógeno en las plantas hospederas.

Para el ensayo de campo la solución empleada como dispersante (SDS 2%) demostró no tener efectos fitotóxicos sobre las plantas de tomate.

El ensayo de campo se realizó en una plantación experimental formada por 3 ecotipos: tomate puntón amarillo, amarillo redondo y neozelandés.

Las plantas presentaban síntomas evidentes del ataque del patógeno *Colletotrichum*, debido a las condiciones climáticas altamente favorables para su desarrollo. En términos generales las plantas del ecotipo puntón amarillo tuvieron un grado de ataque entre moderado a alto, en el ecotipo redondo amarillo los frutos presentaron síntomas en un porcentaje bajo a medio y en los frutos del ecotipo neozelandés la presencia de la enfermedad fue bajo. Los tratamientos 1 y 2 formulados a una concentración del 1% (guaráni poleo 1% 1.6 mL/L, mezcla bioactiva 9: 16.67% arrayán 0.03 mL/L, 16.67% ruda 0.03 mL/L, 66.66% guaraní poleo 1.06mL/L) fueron aplicados con una secuencia de cada 15 días.

Previo a la siguiente aplicación se verificó el efecto curativo y preventivo mediante el muestreo de frutos con presencia, ausencia de nuevas lesiones que significaban un avance de la enfermedad.

Al terminar el período de aplicaciones podemos señalar que los dos tratamientos fueron efectivos en el control del patógeno, a pesar de que las condiciones no fueron las ideales para valorar su eficiencia.

Al mismo tiempo se desarrolló una prueba con fungicidas utilizados para el control de Deuteromicetos; comparando los resultados obtenidos si bien pueden tener una mayor eficiencia que nuestras fórmulas naturales, las nuestras ofrecen la ventaja de no contaminar el ambiente, no necesita de protección para su manipulación y aplicación. Con la ventaja adicional de eliminar y/o disminuir los tiempos de carencia, que para los productos químicos pueden variar entre 8 y 15 días después de la última aplicación.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Al finalizar este estudio podemos concluir que:

- Los componentes de los aceites esenciales de diversas especies vegetales son potenciales biocontroladores de hongos fitopatógenos imperfectos (*Colletotrichum spp.*). Este estudio puede consolidar los resultados obtenidos en trabajos anteriores puesto que, se ha demostrado en campo la efectividad de los aceites esenciales obtenidos de especies vegetales.
- Guarmi poleo (*Clinopodium spp.*) demostró control efectivo en las tres fases de estudio.
- La mezcla de aceites esenciales (mezcla bioactiva 9: 16.67% arrayán, 16.67% ruda, 66.66% guarmi poleo) demostró potenciar la actividad biocontroladora en cada especie por un efecto de sinergismo positivo.
- Luego de las tres aplicaciones realizadas en el cultivo de tomate de árbol se concluye que existe diferencias significativas entre tratamientos con los aceites esenciales y los productos químicos que comprobó que nuestros tratamientos (mezcla y aceite) poseen un control efectivo del patógeno en campo.
- Se demostró que los beneficios de establecer alternativas de uso de biocontroladores en plantaciones comerciales genera alternativas válidas a la consolidación de estrategias de manejo integrado de enfermedades.
- Los costos de utilizar aceites esenciales como fungicidas dependerá de la especie a ser empleada como tratamiento debido que, algunas de ellas podrían ser cultivadas con este propósito. Además, los costos pueden ser balanceados al comercializar el producto con certificación de orgánico (sello verde) y asegurar un potencial mercado internacional.

Recomendaciones

- El potencial agrícola que representa para la región la producción de tomate de árbol debería ser aprovechada para fomentar en los agricultores el incremento de plantaciones con un manejo integrado.
- Las prácticas culturales: podas, fertilización, riego sumado al empleo de biocontroladores resultarían efectivos como tratamiento preventivos para evitar pérdidas económicas en los cultivos por el ataque de diversas patologías.
- Los controles fitosanitarios en períodos de lluvia deben realizarse cada semana para mayor efectividad de los productos sean estos químicos o aceites esenciales.
- Se puede continuar con investigaciones identificando otras especies vegetales de las que se tengan referencias de su efecto biocontrolador para desarrollar mezclas, que de acuerdo a los resultados obtenidos pueden potenciar el efecto antifúngico.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPITO, T. y SUNG, I. Fitomedicina, 1100 Plantas Medicinales Tomo 1 y 2. Perú. Editorial Isabel. 2000. Primera Edición.
- AGRIOS, G. Fitopatología. México. Editorial Limusa. 1985. Primera Edición.
- BAILEY, J.A. y JEGER, M.J. *Colletotrichum* biology, pathology and control. Inglaterra: CBA, 1992. p. 1-10
- BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata – Argentina. 2000
- BARNETT H. y HUNTER B. Illustred Genera of Imperfect Fungi. USA. Burgess Publishing Company. 1972. Third Edition. 225p.
- BUCHANAN, B. et al, GRUISSEM, W., JONES, R., Eds. Natural Products, Biochemistry & Molecular Biology of Plants. USA. American Society of Plant Physiologists. 2000.
- CAZAR M. Fungicidas y Bactericidas de Microorganismos de Suelo. Chile. Tesis Doctoral. Universidad de Talca. 2006
- CORPOICA. Enfermedades Del Cultivo De Tomate de Árbol en Antioquia: Guía de Reconocimiento y Control. Boletín Técnico, Corpoica. Colombia. Regional N° 4. Centro de Investigación “La Selva” Río Negro (Antioquia). 1997

- DEACON, J.W., JIMÉNEZ J. (trad.), CIFUENTE, J (rev). 1990. Introducción a la Micología Moderna: Clasificación de Hongos. México. Editorial Limusa. 1990. ISBN: 698-18-2641-8. pp:19-23
- FUNDACIÓN HOGARES JUVENILES. Manual Agropecuario. Colombia. Biblioteca del Campo. 2000. Primera Edición
- RUILOVA, A. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima De Aceites Esenciales Ante Bacterias y Hongos Fitopatógenos. Ecuador. Tesis de Grado. Universidad del Azuay. 2007
- SANTILLAN, F. y NEIRA, E. El Cultivo de Tomate de Árbol (*Cyphomandrea betacea* Cav-Seend): Fertilización y Problemas Fitosanitarios. Ecuador. Universidad de Cuenca. 1988
- URQUIJO P. et al, RODRIGUEZ J., SANTAOLALLA A. Patología Vegetal Agrícola. Enfermedades De Plantas. España. Ediciones Mundi-Prensa. 1971. Segunda Edición.
- WHITE, A. Hierbas del Ecuador, Plantas Medicinales. Ecuador. Imprenta Mariscal. 1976.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS:

- ALZATE D. et al, MIER G., AFANADOR L., DURANGO D., GARCÍA C. Evaluación de la Fitotoxicidad y la Actividad Antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los Aceites Esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*), Limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus Componentes Mayoritarios. Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica. ISSN 0121-4004. Volumen 16 número 1. Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia. 2009. págs. 116-125
[http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php?journal=vitae&page=article&op=view&path\[\]=1433&path\[\]=1097](http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php?journal=vitae&page=article&op=view&path[]=1433&path[]=1097) 10_06_09

- AMAYA J. y JULCA J. Manual De Tomate De Árbol (*Cyphomandra betacea* Send.), Pdf. Trujillo, Perú. 2006
www.regionlalibertad.gob.pe/.../Manual%20de%20Tomate%20de%20árbol.pdf
- APONTE, A. et al; DEBROT, E.; ARNAL, E.; SOLÓRZANO, R. y RAMOS, F. Diagnóstico De Las Enfermedades Del Tomate De Árbol En Los Estados Aragua Y Miranda, Venezuela. Revista Digital CENIAP HOY, Número 9. Maracay, Aragua, Venezuela. 2005. ISSN 1690-4117 Depósito legal 200302AR1449 URL:
www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n9/arti/aponte_a/arti/aponte_a.htm
-
- HERNÁNDEZ A. et al, BAUTISTA S., VELÁSQUEZ M. 2007. Prospectiva De Extractos Vegetales Para Controlar Enfermedades Post cosecha Hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana, abril-junio, año/ vol. 30 número 002. Sociedad Mexicana de Citogenética, A.C.; Chapingo, México 2007. pp. 119-123, PDF
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/610/61030202.pdf>
- HERNÁNDEZ R. Evaluación Del Potencial Antifúngico De Extractos Vegetales Crudos En La Germinación De Esporas de *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.)Sacc. Yautepec, México 2004, PDF 18/05
<http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/1576/1/HERNANDEZALBITER.pdf>
- IDROVO, N. Tecnología Del Cultivo De Tomate De Árbol. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Proyecto SICA-Banco Mundial. Ecuador. 2003 Dirección URL:
http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/frutas/tomate%20arbol/tecnologia_%20cultivo.htm
- LEBN, J. Guía Para El Cultivo De Tomate De Árbol. INIAP-COTESU. Servicio De Información Agropecuaria Del Ministerio De Agricultura Y Ganadería Del Ecuador. 1996.
<http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/frutas/tomate%20arbol/general.htm>

- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA. Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* C.S.), PDF; Convenio MAG- IICA; Quito, Ecuador; 2001. Dirección URL: http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Convenio%20MAG%20II CA/productos/tomate_arbol_mag.pdf

- PALOU L. Evaluación De Alternativas Para El Tratamiento Antifúngico En Poscosecha De Cítricos De Producción Integrada. Revista De Frutas, Hortalizas, Flores, Plantas Ornamentales Y De Viveros. España 2007. ISSN 1132-2950, N° 200, 2007 , pp. 82-93. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2314369>

- RONDÓN J. Estudio Biológico Y Epidemiológico De La Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penz), Del Tomate De Árbol (*Solanum betacea*, (Cav) Sendt), Y Generación De Alternativas Para Su Manejo Integrado En Colombia. Bogotá, Colombia, 2006 http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061127103437_Estudio%20de%20la%20antracnosis%20en%20tomate%20de%20arbol.pdf

- STAUFFER A. et al, ORREGO A., AQUINO A. Selección de Extractos Vegetales con Efecto Fungicida y/o Bactericida. Revista de Ciencia y Tecnología. Dirección de Investigaciones - UNA Vol. 1 N° 2, 2000 29 AÑO 1996. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Protección Vegetal. Div. Fitopatología, Universidad Nacional de Asunción. Paraguay. 2000. <http://newton.cnc.una.py/Resource-1006/2000v1n2-04.pdf> 10-06-09

- UNIVERSIDAD DE CUENCA. Evaluación De Plaguicidas Naturales En El Control De Nemátodo Agallador, Afidos Y Chinchorro En Tomate De Árbol En La Zona Austral Del Ecuador. Proyecto: IG-CV-084. Programa para el Manejo del Agua y del Suelo. Cuenca - Ecuador. 2007 <http://www.mag.gov.ec/promsa/Resumen%20IG-CV-084.htm>

ANEXOS

Anexo 1.

Medios Empleados Para Aislamiento Del Patógeno

Medio Levadura – Malta- Glucosa (YMG)

800 ml

Extracto de malta 8 gr

Glucosa 8 gr

Extracto de levadura 3.2 gr

Agar-agar 12.5 gr

pH 5.5



Agar Papa – Dextrosa (PDA)

Puré de papa deshidratado 20gr

Glucosa 20 gr

Agar-agar 16 gr

pH 5.5

Materiales

Pipetas 10, 100, 1000 μ l, pipeta multicanal

Puntas de pipeta

Tubos eppendorf

Cajas elisa

Balanza



Anexo 2.

Obtención De Aceites Esenciales



MATERIAL VEGETAL SELECCIONADO



EQUIPO DE EXTRACCION



ACEITE ESENCIAL EXTRAIDO



RECOLECCION DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO

Anexo 3.

Aislamiento Del Patógeno *Colletotrichum spp.*



FRUTOS CON SÍNTOMAS



DESINFECCION



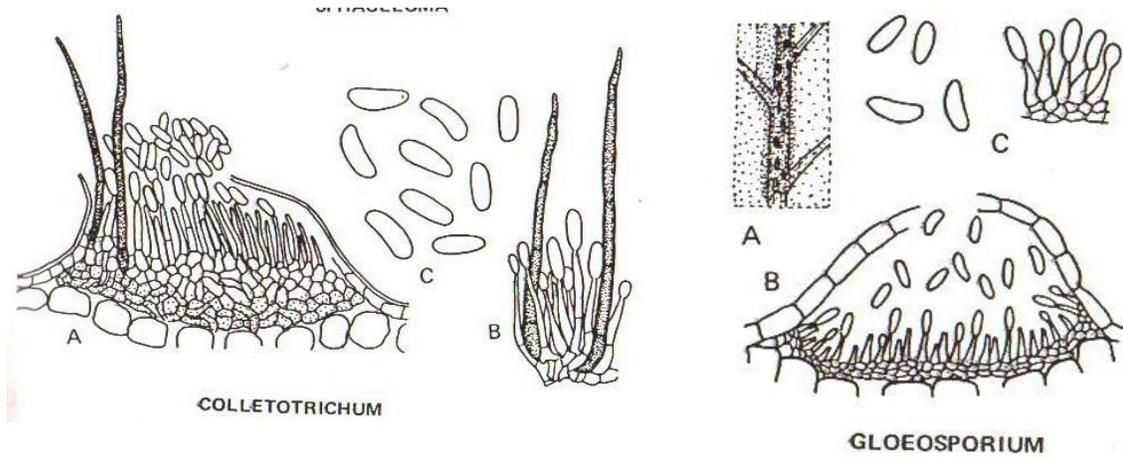
PORCIONES DE AISLAMIENTO



PLACA CON CRECIMIENTO MICELIAR PURIFICADO

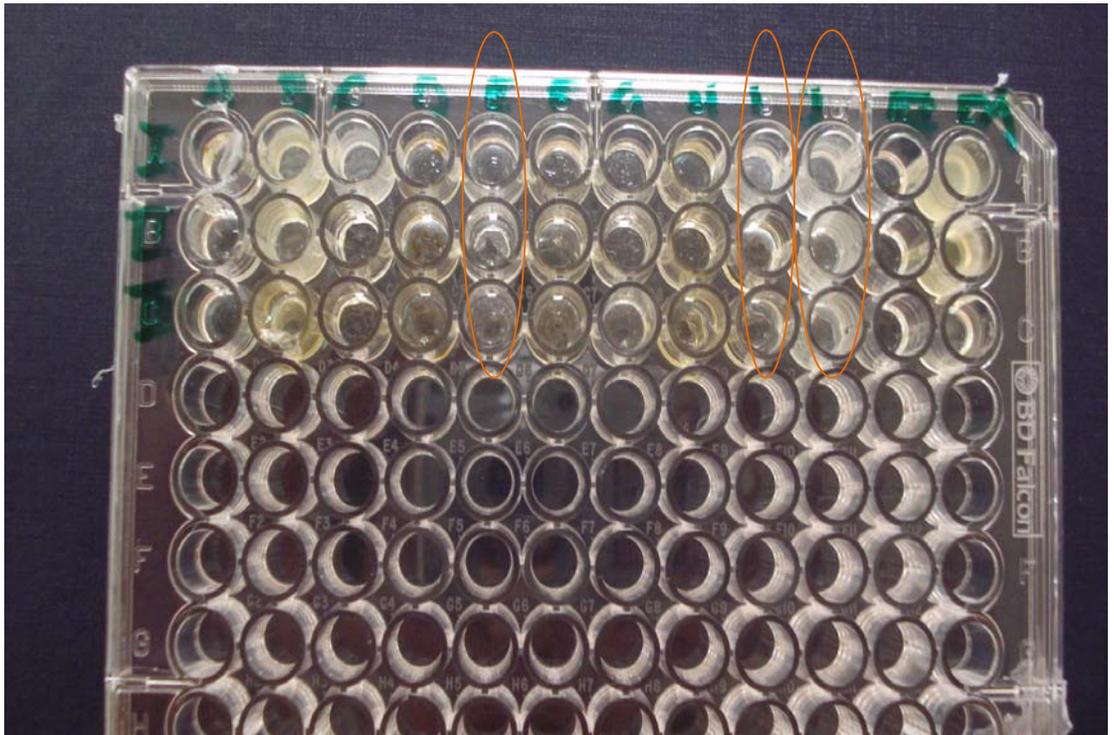
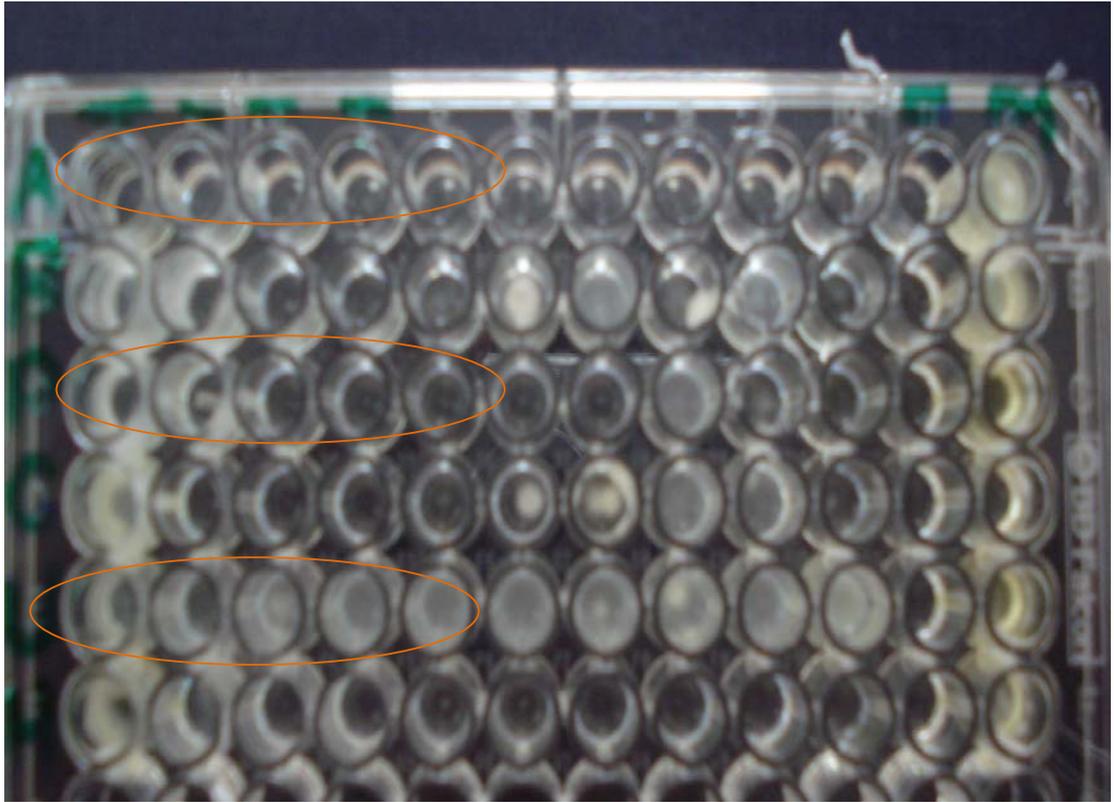
Anexo 4.

Estructura Microscópica De *Colletotrichum* spp., Comparación Con El Patógeno Aislado



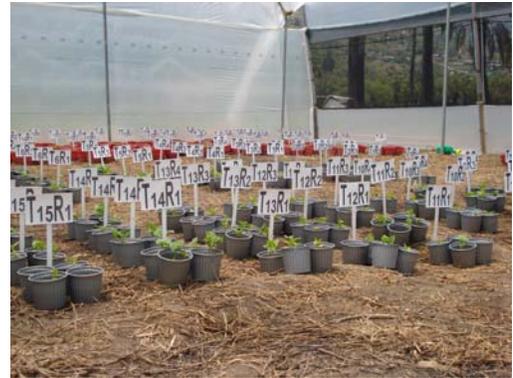
Anexo 5.

Bioensayos



Anexo 6.

Ensayo Invernadero



ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO EN INVERNADERO



UNIDAD EXPERIMENTAL CON PÚSTULAS, SINTOMAS VISIBLES DE ANTRACNOSIS



MUESTREO DE HOJAS CON SÍNTOMAS



VAINA CON SÍNTOMAS DE ANTRACNOSIS



APLICACIÓN DE PRODUCTOS (ACEITES ESENCIALES)

Anexo 7**Ensayo Invernadero Análisis De Varianza****Tratamiento Control**

Número De Plantas Sanas

DIA 2

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_{t 0,05}	F_{t 0,001}
Tratamientos	11	2.432	0.221	1.330	2.64	3.92
Repetición	36	5.985	0.166			
Total	47	8.417				
Error						

DIA 4

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_{t 0,05}	F_{t 0,001}
Tratamientos	11	4.306	0.391	4.594	2.64	3.92
Repetición	36	3.068	0.085			
Total	47	7.373				
Error						

DIA 6

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_{t 0,05}	F_{t 0,001}
Tratamientos	11	4.877	0.443	3.131	2.64	3.92
Repetición	36	5.098	0.142			
Total	47					
Error						

DIA 8

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_{t 0,05}	F_{t 0,001}
Tratamientos	11	4.807	0.437	2.386	2.64	3.92
Repetición	36	6.593	0.183			
Total	47	11.400				
Error						

DIA 10

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_{t 0,05}	F_{t 0,001}
Tratamientos	11	6.042	0.549	2.924	2.64	3.92
Repetición	36	6.763	0.188			
Total	47	12.805				
Error						

DIA 12

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_{t 0,05}	F_{t 0,001}
Tratamientos	11	6.042	0.549	2.924	2.64	3.92
Repetición	36	6.763	0.188			
Total	47	12.805				
Error						

DIA 14

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	6.903	0.628	5.443	2.64	3.92
Repetición	36	4.150	0.115			
Total	47	11.053				
Error						

DIA 16

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	6.637	0.603	6.538	2.64	3.92
Repetición	36	3.323	0.092			
Total	47	9.960				
Error						

DIA 18

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	4.637	0.422	4.025	2.64	3.92
Repetición	36	3.770	0.105			
Total	47	8.407				
Error						

DIA 20

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	4.622	0.420	4.119	2.64	3.92
Repetición	36	3.672	0.102			
Total	47	8.295				
Error						

Prueba Duncan

DIA 2

T8=2.600A
 T11=2.550A
 T1=2.475AB
 T10=2.450AB
 T3=2.300AB
 T5=2.300AB
 T12=2.200AB
 T7=2.200AB
 T4=2.175AB
 T9=2.050AB
 T6=1.950AB
 T2=1850B

DIA 6

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.550A
 T6=2.375AB
 T8=2.300AB
 T7=2.300AB
 T1=2.275AB
 T5=2.200AB
 T11=2.200AB
 T3=1.925BC
 T2=1.850BC
 T12=1.500C

DIA 10

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.375A
 T6=2.375A
 T1=2.375A
 T7=2.375A
 T11=2.300A
 T5=2.200A
 T8=2.050A
 T2=2.025A
 T3=1.950A
 T12= 1.250B

DIA 14

T4=2.775A
 T10=2.700AB
 T1=2.550ABC
 T9=2.475 ABC
 T11=2.450 ABC
 T6=2.450 ABC
 T7=2.375 ABC
 T8=2.300 ABC
 T5=2.200 BC
 T3=2.200BC
 T2=2.025C
 T12=1.250D

DIA 4

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.550A
 T6=2.550A
 T8=2.475A
 T7=2.450A
 T1=2.300A
 T5=2.200A
 T11=2.200A
 T3=2.175A
 T2=2.175A
 T12=1.500B

DIA 8

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.375AB
 T6=2.375AB
 T1=2.375AB
 T7=2.375AB
 T11=2.300AB
 T5=2.200AB
 T8=2.050ABC
 T2=1.925ABC
 T3=1.850BC
 T12= 1.500C

DIA 12

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.375A
 T6=2.375A
 T1=2.375A
 T7=2.375A
 T11=2.300A
 T5=2.200A
 T8=2.050A
 T2=2.025A
 T3=1.950A
 T12= 1.250B

DIA 16

T4=2.775A
 T10=2.700AB
 T1=2.625AB
 T9=2.475AB
 T11=2.450AB
 T6=2.450AB
 T8=2.375AB
 T7=2.375AB
 T2=2.375AB
 T5=2.375AB
 T3=2.200B
 T12=1.250C

DIA 18

T4=2.775A
T10=2.775A
T11=2.550A
T6=2.550A
T1=2.525A
T9=2.475A
T2=2.375A
T8=2.375A
T3=2.375A
T7=2.375A
T5=2.350A
T12=1.500B

DIA 20

T4=2.775A
T10=2.775A
T11=2.550A
T6=2.550A
T1=2.525A
T3=2.475A
T9=2.475A
T7=2.475A
T8=2.450A
T2=2.375A
T5=2.350A
T12=1.500B

Tratamiento Preventivo

Número De Plantas Sanas

DIA 2

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	4.877	0.443	4.778	2.64	3.92
Repetición	36	3.340	0.093			
Total	47	8.217				
Error						

DIA 4

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	4.306	0.391	4.594	2.64	3.92
Repetición	36	3.068	0.085			
Total	47	7.373				
Error						

DIA 6

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	4.877	0.443	3.131	2.64	3.92
Repetición	36	5.098	0.142			
Total	47	9.975				
Error						

DIA 8

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	4.807	0.437	2.386	2.64	3.92
Repetición	36	6.593	0.183			
Total	47	11.400				
Error						

DIA 10

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	6.042	0.549	2.924	2.64	3.92
Repetición	36	6.763	0.188			
Total	47	12.805				
Error						

DIA 12

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	6.042	0.549	2.924	2.64	3.92
Repetición	36	6.763	0.188			
Total	47	12.805				
Error						

DIA 14

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	6.903	0.628	5.443	2.64	3.92
Repetición	36	4.150	0.115			
Total	47	11.053				
Error						

DIA 16

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	6.637	0.603	6.538	2.64	3.92**
Repetición	36	3.323	0.092			
Total	47	9.960				
Error						

DIA 18

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	4.637	0.422	4.025	2.64	3.92**
Repetición	36	3.770	0.105			
Total	47	8.407				
Error						

DIA 20

F.V.	gl	S.C.	C.M.	F_c	F_t 0,05	F_t 0,001
Tratamientos	11	4.622	0.420	4.119	2.64	3.92
Repetición	36	3.672	0.102			
Total	47	8.295				
Error						

DIA 2

T8=2.775A
 T4=2.625AB
 T9=2.625AB
 T10=2.625AB
 T6=2.625AB
 T1=2.475AB
 T7=2.450AB
 T5=2.375AB
 T2=2.350AB
 T3=2.275AB
 T11=2.200B
 T12=1.500C

DIA 6

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.550A
 T6=2.375AB
 T8=2.300AB
 T1=2.300AB
 T7=2.275AB
 T5=2.200AB
 T11=2.200AB
 T2=1.925BC
 T3=1.850BC
 T12=1.500C

DIA 10

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.375A
 T6=2.375A
 T1=2.375A
 T7=2.375A
 T11=2.300A
 T5=2.200A
 T8=2.050A
 T2=2.025A
 T3=1.950A
 T12=1.250B

DIA 14

T4=2.775A
 T10=2.700AB
 T1=2.550ABC
 T9=2.475ABC
 T11=2.450ABC
 T6=2.450ABC
 T7=2.375ABC
 T8=2.300ABC
 T5=2.200BC
 T3=2.200BC
 T2=2.025C
 T12=1.250D

DIA 4

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.550A
 T6=2.550A
 T8=2.475A
 T7=2.450A
 T1=2.300A
 T5=2.200A
 T11=2.200A
 T3=2.175A
 T2=2.175A
 T12=1.500B

DIA 8

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.375AB
 T6=2.375AB
 T1=2.375AB
 T7=2.375AB
 T11=2.300AB
 T5=2.200AB
 T8=2.050ABC
 T2=1.925ABC
 T3=1.850BC
 T12= 1.500C

DIA 12

T4=2.625A
 T10=2.625A
 T9=2.375A
 T6=2.375A
 T1=2.375A
 T7=2.375A
 T11=2.300A
 T5=2.200A
 T8=2.050A
 T2=2.025A
 T3=1.950A
 T12=1.250B

DIA 16

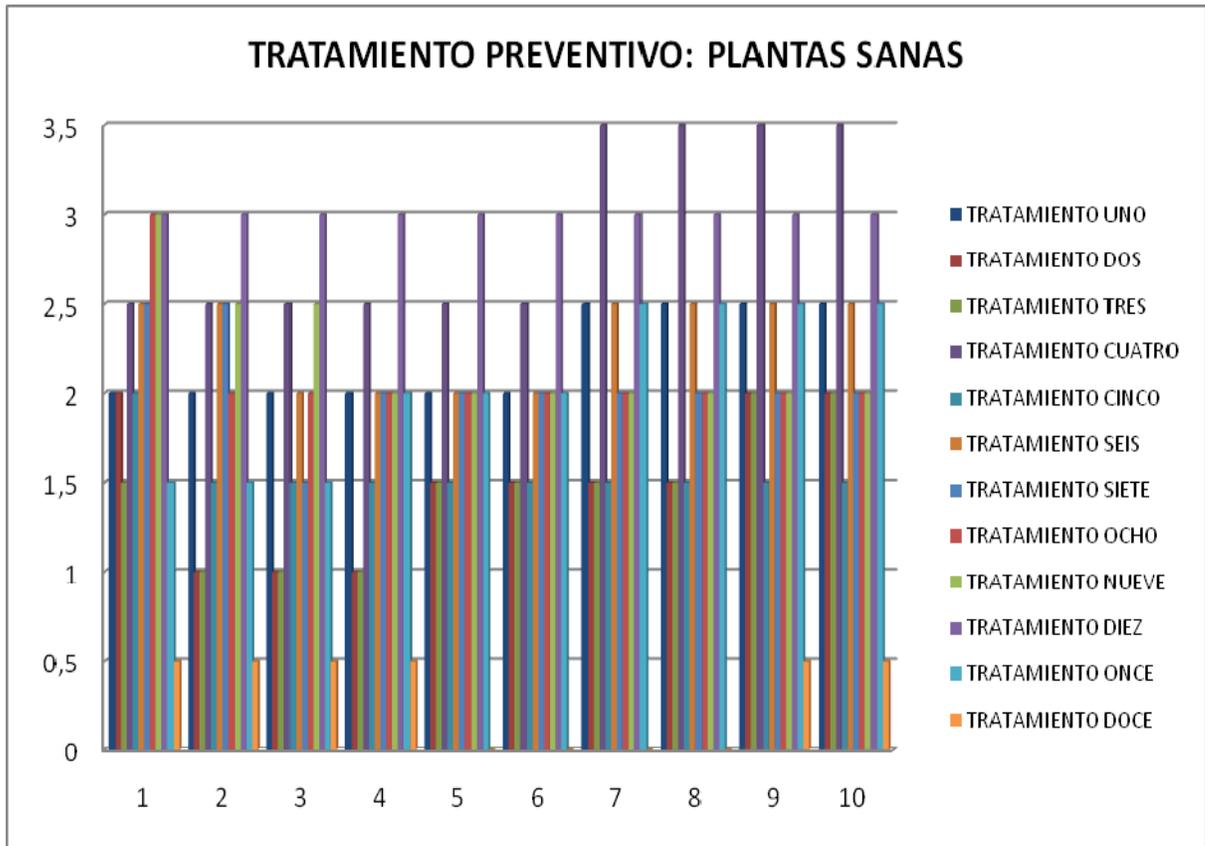
T4=2.775A
 T10=2.700B
 T1=2.625AB
 T9=2.475AB
 T11=2.450AB
 T6=2.450AB
 T8=2.375AB
 T7=2.375AB
 T2=2.275AB
 T5=2.275AB
 T3=2.200B
 T12= 1.250C

DIA 18

T4=2.775A
T10=2.775A
T11=2.550A
T6=2.550A
T1=2.525A
T9=2.475A
T2=2.375A
T8=2.375A
T3=2.375A
T7=2.375A
T5=2.350A
T12=1.500B

DIA 20

T4=2.775A
T10=2.775A
T11=2.550A
T6=2.550A
T1=2.525A
T3=2.475A
T9=2.475A
T7=2.475A
T8=2.450A
T2=2.375A
T5=2.350A
T12= 1.500B



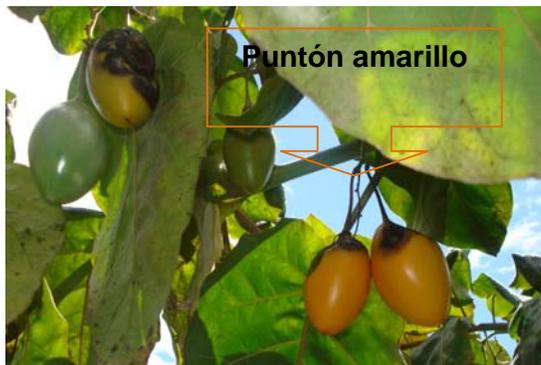
Anexo 9.

Ensayo Campo

HUERTO EXPERIMENTAL



Ecotipos



Tratamiento Uno: aceite esencial de guarani poleo



PRIMERA APLICACIÓN



SEGUNDA APLICACIÓN



TERCERA APLICACIÓN

Tratamiento cinco: Daconil



PRIMERA APLICACIÓN



SEGUNDA APLICACIÓN



TERCERA APLICACIÓN

Anexo 10.

Gráficos Estadísticos Ensayo de Campo

