

AAP 6124

TESIS  
ED 2001  
B7

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO  
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN  
ESCUELA DE EDUCACIÓN  
ESPECIALIDAD: CIENCIAS BIOLÓGICAS



**"EFECTOS DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL DESARROLLO DEL  
HONGO *Mycosphaerella musicola* CAUSANTE DE LA SIGATOKA  
AMARILLA QUE ATACA A CULTIVOS DE MUSÁCEAS"**

Autores: María Graziella Brucato Giampapa

Marvin Yesenia Mora León

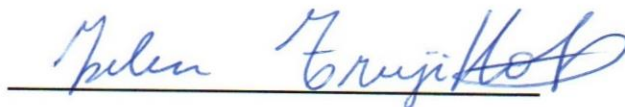
Tutor: Iselen Trujillo

Caracas, Octubre de 2001

### ACEPTACIÓN DEL TUTOR:

Por la presente hago constar que he leído el Proyecto de Trabajo Especial de grado, presentado por las bachilleres: María Graziella Brucato Giampapa y Marvin Yesenia Mora León para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas, cuyo título es: "Efectos de extractos vegetales en el desarrollo del hongo *Mycosphaerella musicola* causante de la Sigatoka Amarilla que ataca a cultivos de Musáceas" y acepto asesorar en calidad de tutor, hasta su presentación y evaluación.

En Caracas, a los 13 días del mes de Octubre de 2001



**Iselen Trujillo**

**C.I. 6.524.760**

## AGRADECIMIENTOS

- ✿ A DIOS por habernos permitido la culminación de este trabajo.
- ✿ A la Dra. Iselen Trujillo, por su apoyo y comprensión , y por la orientación en la realización de este trabajo.
- ✿ Al personal del IDECYT, quienes compartieron con nosotras momentos difíciles y agradables durante la realización de este trabajo.
- ✿ A los profesores Armando , Alpidio e Hilda por su colaboración en la realización de este trabajo.
- ✿ A nuestros padres y hermanos por su apoyo incondicional y cariño siempre presente.
- ✿ A todas aquellas personas que de alguna forma u otra hicieron posible la realización de este trabajo.

## INDICE

Índice de Tablas

Índice de Figuras

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. OBJETIVOS</b>	4
<b>III. MARCO TEÓRICO</b>	
a) Cultivos de musáceas	5
b) Sigatoka Amarilla	
b.1.) Antecedentes	10
b.2.) Características	12
c) Control Biológico	
c.1.) Antecedentes	17
c.2.) Importancia	21
<b>IV MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
a) Material Fitopatológico	
a.1.) Colección del material	22
a.2.) Obtención del hongo	23
a.3.) Aislamiento del hongo	23

b) Material Vegetal con Efecto fungicida	
b.1.) Selección del material Vegetal	24
b.1.1.) Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	25
b.1.2.) Cebolla ( <i>Allium cepa</i> )	26
b.1.3.) Neem ( <i>Azadirachta indica</i> )	28
c) Obtención de Extractos Vegetales	
c.1.) Extractos en forma de polvo	29
c.2.) Extractos con solventes orgánicos	29
c.2.1.) Preparación de extractos con solventes orgánicos a diferentes concentraciones	29
d) Evaluaciones "in vitro" e "in vivo"	
d.1.) Evaluación "in vitro"	
d.1.1.) Obtención del control	30
d.1.1.1) Determinación del área	30
d.1.1.2.) Contaje de esporas	31
d.1.1.3.) Registro en el Microscopio Electrónico	31
d.1.2.) Aplicación de extractos	
d.1.2.1.) Incorporación al medio de cultivo	33
d.1.2.2.) Extracto Agregado sobre el hongo	34
d.1.3.) Evaluación de la eficiencia de cada extracto	
d.1.3.1.) Técnica de la pesada	34
d.1.3.2.) Contaje de esporas	34

d.1.3.3.)Registro en el Microscopio de Barrido	34
d.2.) Evaluación "in vivo"	
d.2.1.)Selección del material Vegetal	35
d.2.2.)Aplicación del Extracto	36
d.2.3.)Evaluación de los Extractos	36
e) Análisis estadísticos	36

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a.1.)Curva de crecimiento	38
a.2.)Evaluaciones "in vitro"	
a.2.1.)Determinación de las concentraciones idóneas	
a.2.1.1.)Extractos obtenidos en base Agua	39
a.2.1.2.)Extractos obtenidos en base Hexano	40
a.2.2.)Extractos agregados al hongo	
a.2.2.1.)Obtenidos en base Agua	41
a.2.2.2.)Obtenido en base Hexano	47
a.2.3.)Extractos agregados al medio de cultivo	
a.2.3.1.)Obtenidos en base Agua	55
a.2.3.1.)Obtenidos en base a Hexano	60
a.2.4.)Evaluaciones estadísticas	66
a.2.5.)Análisis morfológicos del hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> a través del Microscopio Electrónico de Barrido bajo el efecto de diferentes extractos vegetales.	67

a.3.)Evaluaciones "in vivo"	69
<b>TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>73</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>126</b>
<b>VII RECOMENDACIONES</b>	<b>128</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>129</b>
<b>IX . ANEXOS</b>	

## INDICE DE TABLAS

I. Características de los vegetales en experimentación	73
II. Estadios de la enfermedad Sigatoka Amarilla.	74
III. Características de las esporas asexuales y sexuales del hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> .	75
IV. Efecto de extracto de Ajo – Agua agregado sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> a diferentes etapas de su desarrollo.	76
V. Efecto de extracto de Ajo – Hexano agregado sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> a diferentes etapas de su desarrollo.	77
VI. Efecto de extracto de Cebolla – Agua agregado sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> a diferentes etapas de su desarrollo.	78
VII. Efecto de extracto de Cebolla – Hexano agregado sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> a diferentes etapas de su desarrollo.	79
VIII. Efecto de extracto de Neem – Agua agregado sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> a diferentes etapas de su desarrollo.	80
IX. Efecto de extracto de Neem – Hexano agregado sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> a diferentes etapas de su desarrollo.	81
X. Efecto de extracto de Ajo – Agua agregado al medio de cultivo en el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> a diferentes etapas de su desarrollo.	82
XI. Efecto de extracto de Ajo – Hexano agregado al medio de cultivo en el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> a diferentes etapas de su desarrollo.	83



- XII. Efecto de extracto de Cebolla – Agua agregado al medio de cultivo en el hongo *Mycosphaerella musicola* a diferentes etapas de su desarrollo. 84
- XIII. Efecto de extracto de Cebolla – Hexano agregado al medio de cultivo en el hongo *Mycosphaerella musicola* a diferentes etapas de su desarrollo. 85
- XIV. Efecto de extracto de Neem – Agua agregado al medio de cultivo en el hongo *Mycosphaerella musicola* a diferentes etapas de su desarrollo. 86
- XV. Efecto de extracto de Neem – Hexano agregado al medio de cultivo en el hongo *Mycosphaerella musicola* a diferentes etapas de su desarrollo. 87
- XVI. Evaluaciones "in vivo" de diferentes extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella musicola*. 88

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Hoja infectada con Sigatoka Amarilla.	89
2. Curva patrón del crecimiento del hongo.	90
3. Patrón de numeración de las hojas en musáceas.	91
4. Extractos con Agua agregados sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> . 5 gr/l.	92
5. Extractos con Agua agregados sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> . 10 gr/l.	93
6. Extractos con Agua agregados sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> . 20 gr/l.	94
7. Extractos con Hexano agregados sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> . 5 gr/l.	95
8. Extractos con Hexano agregados sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> . 10 gr/l.	96
9. Extractos con Hexano agregados sobre el hongo <i>Mycosphaerella musicola</i> . 20 gr/l.	97
10. Extractos con Agua incluidos en el medio de cultivo. 5 gr/l.	98
11. Extractos con Agua incluidos en el medio de cultivo. 10 gr/l.	99
12. Extractos con Agua incluidos en el medio de cultivo. 20 gr/l.	100
13. Extractos con Hexano incluidos en el medio de cultivo. 5 gr/l.	101

14. Extractos con Hexano incluidos en el medio de cultivo. 10 gr/l. 102
15. Extractos con Hexano incluidos en el medio de cultivo. 20 gr/l. 103
16. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* sin ningún tratamiento. Aumento(10.000x). 104
17. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* sin ningún tratamiento. Aumento (10.000)x 105
18. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Ajo – Agua incluido en el medio de cultivo. Aumento (2.500x). 106
19. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Ajo – Agua incluido en el medio de cultivo. Aumento (7.500x). 107
20. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Neem – Agua incluido en el medio de cultivo. Aumento (1.560x). 108
21. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Neem – Agua incluido en el medio de cultivo. Aumento (7.500x). 109

22. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Cebolla – Agua incluido en el medio de cultivo. Aumento (11.250x). 110
23. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Cebolla – Agua incluido en el medio de cultivo. Aumento (5.000x). 111
24. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Ajo – Agua agregado sobre el hongo. Aumento (3.750x). 112
25. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Cebolla – Agua agregado sobre el hongo. Aumento (5.000x). 113
26. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Cebolla – Agua agregado sobre el hongo. Aumento (2.000x). 114
27. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Neem – Agua agregado sobre el hongo. Aumento (7.500x). 115
28. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Neem – Hexano incluido en el medio de cultivo. Aumento (2.500x). 116

29. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Neem – Hexano incluido en el medio de cultivo. Aumento (3.750x). 117
30. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Cebolla – Hexano incluido en el medio de cultivo. Aumento (3.250x). 118
31. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Cebolla – Hexano incluido en el medio de cultivo. Aumento (5.000x). 119
32. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Ajo – Hexano incluido en el medio de cultivo. Aumento (2.000x). 120
33. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Ajo – Hexano incluido en el medio de cultivo. Aumento (3.750x). 121
34. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Ajo – Hexano agregado sobre el hongo. Aumento (2.500x). 122
35. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Ajo – Hexano agregado sobre el hongo. Aumento (5.000x). 123

36. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Neem – Hexano agregado sobre el hongo. Aumento (8.750x). 124
37. Registro fotográfico realizado en Microscopio Electrónico de Barrido del hongo *Mycosphaerella musicola* tratado con extracto Ajo – Hexano agregado sobre el hongo. Aumento (2.000x). 125

## I. INTRODUCCIÓN

El ambiente es un sistema donde interactúan elementos naturales y sociales. Por tal razón, todos los seres vivos dependemos unos de otros.

El incremento de la actividad agrícola ha traído como consecuencia, un aumento de los agentes patógenos específicos. En respuesta a ello se han ideado numerosos compuestos químicos para atacar a estos flagelos y proteger las cosechas, sin embargo, el uso desmedido y sin control de los mismos, ha hecho que las plagas se vuelvan resistentes, recurriendo así a dosis mayores y más concentradas para solucionar el problema, lo cual ha traído un aumento de los costos de producción, problemas de contaminación ambiental y en definitiva un desequilibrio ecológico del medio circundante.

El control biológico de microorganismos ha recibido una gran y entusiasta acogida durante los últimos 70 años, habiéndose obtenido grandes éxitos y resultados en más de 60 países de todo el mundo.

El control biológico de las plagas en la agricultura se ha desarrollado con la agricultura moderna, y ha sido concomitante con la acelerada adquisición y aplicación de conocimiento en biología en el último siglo.

El presente trabajo de investigación se basa en el uso de extractos vegetales para combatir una enfermedad fungosa denominada *Sigatoka Amarilla*, que ataca a cultivos de musáceas en diversos países de

Latinoamérica y el mundo, por lo cual tienen gran importancia económica en dichos países.

La *Sigatoka Amarilla* causa estragos en las zonas productoras de dicho cultivo, y para obtener una producción de valor comercial aceptable, es necesario su control y erradicación.

Las plantaciones de plátanos y bananos tienen gran importancia en la economía y dieta básica de muchos países del mundo, en especial América Latina y el Caribe, donde gran parte de su producción está destinada al autoconsumo. Para el año de 1996, se estimó una producción de 85,5 millones de toneladas a nivel mundial, de las cuales 30,7 millones corresponden a Latinoamérica y 6,2% de la misma es aportada por Venezuela. Este marco de referencia refleja el significado económico que tiene este cultivo en muchos países, y demuestra lo importante que es erradicar los factores fitopatógenos que puedan poner en peligro la calidad de las cosechas, trayendo consigo un considerable desbalance económico (Martínez, 1998).

La *Sigatoka Amarilla* tiene un fuerte impacto en la producción de musáceas, debido a la violenta reducción del área foliar y por consiguiente, de la capacidad fotosintética de las plantas. Su control basado solo en la aplicación de fungicidas es posible, pero a un costo muy elevado y corriendo el riesgo que el hongo pueda crear resistencia, siendo necesario el establecimiento paralelo de medidas culturales, como un adecuado programa de fertilización y control de malezas. De esta manera, se reducirían los altos índices de contaminación



ambiental generados por el uso indiscriminado de los productos químicos para el control de enfermedades fungosas. El ataque de la Sigatoka Amarilla, genera un sustancial aumento en los costos de la producción, lo que puede constituir en un desastre de consecuencias impredecibles, ya que el alto costo de los sistemas de combate, rebosa la capacidad de los pequeños y medianos productores. Además, como ya se ha mencionado, el uso y la aplicación continua de fungicidas químicos, favorece la selección de cepas más resistentes, que al cabo de cierto tiempo se vuelven insensibles a la aplicación de los mismos, teniendo que recurrir a dosis mayores y más concentradas.

La propuesta de controlar el ataque de hongos fitopatógenos utilizando extractos de plantas, cuyos componentes tengan efectos fungicidas, contribuiría a evitar el uso de compuestos químicos, prevenir las fluctuaciones en el equilibrio del ecosistema y todos los daños que pueda traer consigo el uso de agroquímicos, además de buscar una disminución en los costos de la producción.

Este proyecto de investigación tiene como premisa ser funcional y operativo. De manera, que su transferencia tecnológica sea efectiva a diferentes niveles, es decir, que pueda traer ventajas tanto a productores como a investigadores.

## II. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de diferentes extractos vegetales tales como: **Ajo** (*Allium sativum*), **Cebolla** (*Allium cepa*) y **Neem** (*Azadirachta indica*) en el desarrollo del hongo *Mycosphaerella musicola* causante de la Sigatoka Amarilla que ataca a cultivos de musáceas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-Evaluar diversas metodologías para obtener diferentes extractos de **Ajo** (*Allium sativum*), **Cebolla** (*Allium cepa*) y **Neem** (*Azadirachta indica*) con posibles características fungistáticas, con el objetivo de controlar el desarrollo del hongo *Mycosphaerella musicola*.
- 2.-Aplicar diferentes concentraciones de los extractos de las plantas mencionadas anteriormente en pruebas "in vivo", con el objeto de determinar las concentraciones idóneas para el control biológico de la Sigatoka Amarilla.
- 3.-Comprobar el efecto que ejerce la concentración idónea obtenida a partir de las pruebas "in vitro" en pruebas "in vivo", para el control del hongo.
- 4.- Evaluar el efecto fungistático del **Ajo** (*Allium sativum*), **Cebolla** (*Allium cepa*) y **Neem** (*Azadirachta indica*) sobre el hongo en estudio.

La importancia de las enfermedades de plantas en la agricultura, es un hecho ampliamente documentado y reconocido. En algunos casos tienen el potencial de destruir las cosechas, y aún cuando donde no causen pérdidas totales, por lo general reducen en forma crónica el rendimiento de la mayoría de los cultivos, obligan a tomar medidas de combate que aumentan los costos de

### III. MARCO TEÓRICO

La importancia de las enfermedades de plantas en la agricultura, es un hecho ampliamente documentado y reconocido. En algunos casos tienen el potencial de destruir las cosechas, y aún cuando donde no causen pérdidas totales, por lo general reducen en forma crónica el rendimiento de la mayoría de los cultivos, obligan a tomar medidas de combate que aumentan los costos de producción, y afectan la calidad y la durabilidad de los productos cosechados. De esta manera, constituyen una de las principales causas de inestabilidad en la empresa agrícola y del déficit alimentario mundial. (González, 1976 ).

#### a.) **Cultivos de musáceas:**

La planta de banano es una planta perenne, ya que durante su fructificación, las partes aéreas mueren, pero son reemplazadas por nuevos retoños que se originan desde su base.

El verdadero tallo de la planta es un órgano subterráneo que sólo sobresale del suelo en época de floración. Éste se trata de un importante órgano de almacenamiento, formado por un cilindro central rodeado de una corteza protectora de la que emergen raíces, hojas y retoños (hijos). A este órgano se le ha denominado de diferentes maneras: bulbo (Champión, 1963); cormo (Simmonds, 1966) y rizoma (botánicamente es un cormo).

Las raíces principales son gruesas y carnosas, y se ramifican lateralmente en forma de cabellera. Estas raíces laterales poseen pelos radiculares, los cuales son responsables de la absorción de agua y nutrientes por parte de la planta. La emisión de raíces es continua durante el período vegetativo, cesando en el momento de la floración.

El meristema se encuentra situado en el ápice del tallo (yema apical), así como también en la parte superior de las yemas laterales, determinando de esta manera, la producción de hojas que poseen una parte basal bien desarrollada, como lo es la vaina floral. Sucesivamente aparecen otras hojas siguiendo una disposición helicoidal. El conjunto concéntrico de las vainas, forma el pseudotallo. La parte superior de cada vaina, se afina en un robusto pecíolo prolongado en una nervación central, a cuyos lados se extienden las dos partes del limbo. Las hojas nuevas aparecen enrolladas en la parte inferior del pseudotallo, y se desenrollan posteriormente.

En un momento dado del desarrollo, y después de haberse diferenciado un cierto número de hojas (variables según el cultivar y las condiciones del medio), el meristema experimenta una acción hormonal que detiene la diferenciación de brotes foliares y determina la de la inflorescencia. En forma simultánea, se produce la proliferación del ápice, originándose el tallo verdadero o eje floral, que comienza a crecer en el interior del pseudotallo, mientras que en su extremo apical, la inflorescencia se desarrolla y engrosa hasta aparecer en la parte superior del pseudotallo. Ese es el momento de la emergencia del

racimo, el cual pende en posición invertida para su posterior desarrollo (Simmonds, 1966; Sánchez, 1987).

La inflorescencia del banano es bastante compleja. A lo largo del eje se hallan dispuestas en hélice las brácteas, donde cada una de ellas cubre un grupo de flores desprovistas de bráctea individual y situadas en dos filas pareadas (se le denomina mano, al conjunto de frutos de estas dos hileras).

Según la sistemática botánica, las bananeras productoras de frutos comestibles son plantas del grupo Liliopsida, orden Scitaminales, familia Musaceae, la cual está formada por las subfamilias Heliconioideae, Strelitzioideae y Musoideae. Esta última incluye el género *Ensete*, o género *Musa*, constituido por 4 series o secciones: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys y Eumusa (Simmonds, 1933).

La serie *Eumusa* es una de las más importantes, además de estar formada por un gran número de géneros, presenta una amplia distribución geográfica y contiene especies comestibles ( Filho et al, 2000).

- a) La clasificación propuesta por Cheesman (1948) para el género *Musa*, es aceptada actualmente en el mundo entero, esta basada en el número básico de cromosomas, dividido en dos grupos de la siguiente manera: especies con  $n = 10$  cromosomas pertenece a la sección Australimusa y Callimusa; las especies con un  $n = 11$  cromosomas integran la serie Rhodochlamys y Eumusa. Las especies que componen

estas dos últimas secciones son las que presentan potencialidades como germoplasma útil en el mejoramiento genético de variedades cultivadas.

La mayoría de los cultivos de bananas se originaron en el continente asiático, habiendo tenido evolución a partir de las especies diploides salvajes *M. acuminata* y *M. balbisiana*. Presentan tres niveles cromosómicos distintos; diploides, triploides y tetraploides, los cuales corresponden respectivamente a dos, tres y cuatro múltiplos del número básico del genoma de 11 cromosomas.

El origen de los bananos triploides, a partir de diploides y tetraploides resulta por cruzamientos experimentales ( Filho et al, 2000).

En la evolución de las bananas comestibles tomaron parte principalmente dos especies diploides salvajes: *M. acuminata* y *M. balbisiana*, de modo que cada cultivar debe contener combinaciones variadas de genomas completos de las especies emparentadas. Ese genoma se denomina por la letra A (*M. acuminata*) y B (*M. balbisiana*), de cuyas combinaciones resultan los grupos AA, BB, AB, AAA, AAB, AAAA, AAAB AABB y ABBB ( Filho et al, 2000).

En Venezuela, están representados la mayoría de los grupos de bananos cultivados, que pertenecen a la serie de cultivares de la Sección Eumusa, dentro de los cuales se señala una gran cantidad de cultivares del grupo AAA, un menor número del grupo AAB, pocos del grupo ABB y algunos clones AA ( Haddad y Borges, 1973).

El grupo AA, representado en Venezuela por el "Titiaro", si bien hasta el momento no ha sido de gran importancia económica, es uno de los más aceptados por el gusto del venezolano, debido a su agradable sabor. Dentro del grupo AAA, se encuentra el Subgrupo Cavendish, donde estan representados los cultivares de mayor interés para el comercio bananero mundial. El grupo AAB ( Subgrupo plátanos y afines) también es considerado de gran importancia económica.

El grupo ABB, al cual pertenecen los "Topochos" (Bluggoe), aunque muy populares en el país, aún no han sido utilizado en escala comercial.

El banano para Venezuela constituye un importante renglón para el comercio internacional de frutas, representando por otra parte el sostén en la economía de muchos países tropicales ( Pérez, Haddad y Wagner, 1989).

El cultivo de musáceas se desarrolla en forma general en regiones ubicadas desde el nivel del mar hasta 1.700 metros de altura, dependiendo de la variedad.

Una temperatura promedio adecuada para este cultivo es de 26°C, pero puede desarrollarse también entre los 20 - 28°C. Requiere de una precipitación anual de 1800- 2800 mm. a lo largo del año, alta luminosidad y deben encontrarse en suelos sueltos, profundos y ricos en materia orgánica, con buena capacidad para retener humedad y con pH fluctuante entre 6.0 y 7.0.

En los últimos años ha crecido el interés por el cultivo de las musáceas y se ha hecho más amplia su explotación al igual que las labores extensivas, lo

cual ha mejorado notablemente su producción (Gerth, 1991). No obstante, existen diversos problemas que presenta este cultivo, debido al ataque de insectos- plagas (FUSAGRI, 1977; Sánchez, 1987; Surga, 1998; Fouré, 1989 y Vásquez y col., 1990).

**b.) Sigatoka Amarilla:**

b.1.) **Antecedentes de la Sigatoka Amarilla:** el hongo causante de esta enfermedad se denomina *Cercospora musae* Zimm en su fase imperfecta o asexual, el cual fue reportado por primera vez en 1902; y *Mycosphaerella musicola* en su estado perfecto o sexual, reportado en 1941 (Calpouzoz, 1955).

El estado asexual del hongo causante de la Sigatoka fue descrito por primera vez por Zimmermann en 1902 con material obtenido de Java al cual denominó *Cercospora musae* Zimm. Este hongo no fue reportado como causante de serios problemas en plantaciones de banano sino hasta 1911, debido a que plantaciones de Gros Michel en el Valle de Sigatoka de Fiji, se encontraron severamente afectadas. Fue en este momento cuando la enfermedad se catalogó como de importancia económica, denominándola "enfermedad de la Sigatoka" (Calpouzoz, 1955).

Masee (1914) describió el estado asexual *Cercospora* en una nueva especie, a la que denominó *Cercospora musae*. Sin embargo, esta descripción fue idéntica a la realizada por Zimmermann en 1902, por lo que el nombre que le fue asignado inicialmente es válido.



Posteriormente, en Australia en 1925, Bensen la llamó "Mancha de la Hoja" y la consideró de naturaleza esporádica (Calpouzoz,1955).

Sin embargo, algunos años después Dickson (1928) y Simmonds (1928) reportan que en Australia, la Sigatoka comienza a representar un serio problema para las plantaciones de banano.

En 1933, la enfermedad fue reportada por Simmonds en Malaya. Posteriormente, en período de 1932 – 1934 fue encontrada por primera vez en Surinam y Trinidad (Popenoe, 1939; Wardlaw, 1934)

Alrededor de 1938, la Sigatoka se hace presente en importantes países productores de Banano en la zona caribeña (Dunlap, 1950).

Durante el período comprendido entre 1936 – 1938 se implantó el primer control de esta enfermedad por medio de aerosoles en Centroamérica y algunas plantaciones de la India (Dunlap, 1950). Sin embargo, debido a lo costoso de la metodología sólo pudo ser utilizado por compañías bananeras con grandes recursos financieros. En 1939 Wallace reporta la enfermedad en Uganda y Tanganyika. (Calpouzoz, 1955).

En Brasil fue encontrada inicialmente en el Estado de Amazonas, en 1944, extendiéndose, posteriormente a todos los estados brasileños (Kimati,1997) , y alrededor de 1955, en Ecuador y Perú (Dunlap, 1950; Dieguez, 1953 y Christie,1954).

En la actualidad, la Sigatoka se encuentra presente en las más importantes regiones bananeras de la zona tropical del mundo.

Cambell en 1920 en Fiji, realizó el primer aislamiento en cultivo puro de la fase asexual denominada *C. musae* (Calpouzoz, 1955).

Simmonds 1933, llevó a cabo estudios fisiológicos preliminares sobre el hongo. Stahel (1937) investigó la forma como el hongo infecta la hoja de banano, y Meredith y Butler (1939), los primeros en encontrar conidios de *C. musae* en cultivos puros. Posteriormente, Leach 1941 encontró un estado modificado del desarrollo de *C. musae*, el cual llamó *Mycosphaerella musicola*. Leach 1946, señala los posibles mecanismos de infección por conidias y sugiere la importancia de las ascósporas como causantes de epidemias de esta enfermedad. En 1953, Fernández demostró que el patógeno causante de la Sigatoka requiere de ciertas vitaminas para su crecimiento.

Folgueras y Ramos (1990), realizaron el aislamiento de la toxina implicada en el desarrollo de la enfermedad a partir de cultivos puros de *Mycosphaerella musicola*.

#### b.2.) **Características:**

La industria bananera de los países tropicales se ha visto seriamente afectada por la enfermedad denominada Sigatoka amarilla, la cual es causada por el hongo *Mycosphaerella musicola*.

Esta enfermedad se encuentra muy difundida en todas las zonas bananeras, a la cual son especialmente susceptibles los cultivares del sub-grupo Cavendish, sub-grupo Morado y los clones "Manzano" y "Titiaro",

mientras que los topochos y plátanos presentan mayor resistencia (Trujillo,1994).

Esta enfermedad de las hojas de los bananos, se presenta en todas las regiones del mundo donde crece este cultivo, y es conocida con muchos nombres comunes, tales como "Candelilla de la hoja", "Quemazón del follaje" y "Mancha cercóspora".

La infección por Sigatoka ocurre en hojas jóvenes de la planta, y se caracteriza por una leve decoloración en forma de punto entre las nervaduras secundarias de las hojas jóvenes. Esta decoloración se amplía, formando estrías de color amarillo. Con el tiempo, estas estrías crecen, formando manchas necróticas, elípticas y elongadas, dispuestas paralelamente entre las nervaduras secundarias de las hojas. Desarrollada la lesión se presentan unos centros deprimidos o secos, de coloración parda, rodeada por un aro amarillo. (Figura 1).

Las lesiones a medida que se van desarrollando van pasando por varios estadios (Tabla I):

**Estadio I**, es la fase inicial, se observan unas manchas de aproximadamente 1mm, la decoloración de las hojas es leve.

**Estadio II**, se observan manchas de varios milímetros de longitud, la decoloración en las hojas es más intenso.

**Estadio III**, Se observan manchas nuevas y algunas presentan forma oval y la coloración es levemente parda, presenta contornos muy mal definidos.

**Estadio IV**, se caracteriza por la paralización del crecimiento del micelio del hongo, aparición de un aro amarillo envolviendo la mancha. Se inicia la esporulación del patógeno.

**Estadio V**, fase final en cual la mancha es de forma oval y alargada, con unos 12 a 15 mm de ancho y de 2 a 5 mm de largo. El centro está formado por tejido seco y con una coloración parda.

A partir del estadio de la mancha, se puede observar las fructificaciones del hongo en forma de puntos negros. En estadios avanzados, la enfermedad se caracteriza principalmente porque existen ataques severos, en donde, ocurren una cohesión de lesiones y por tanto una gran cantidad de área foliar es comprometida, teniendo un efecto más drástico sobre las mismas, en la cual existe una muerte prematura de sus hojas (Kimati et al,1997).

El hongo *Mycosphaerella musicola* presenta dos tipos de esporas, una de origen sexual o ascóspora (bicelular e hialino) y otra de origen asexual o conidio (largos, multiseptados, producidos por los conidióforos reunidos en un esporodoquio).

Los peritecios de este hongo pueden permanecer durante períodos no muy prolongados de sequía en las hojas viejas del banano. Al volver las lluvias, los peritecios embeben en agua y se activan; las ascas se levantan una a una hasta el ostíolo y expulsan las ascosporas, que son arrastradas por corrientes de aire en todas direcciones. Las ascosporas que se depositan en hojas jóvenes de banano, se adhieren a la cutícula de la hoja y ahí germinan. El tubo

germinativo se extiende sobre la cutícula y penetra por un estoma hasta alcanzar la cavidad subestomática, en donde se ramifica. En el punto en donde se inició la infección aparece luego una mancha amarillenta, que crece y se torna oscura casi negra. En estas lesiones se producen esporodoquios, que son grupos de conidióforos que emergen por los estomas y corresponden a la fase asexual del hongo. Los conidios que se forman sobre los conidióforos, son hialinos y multicelulares. Se diseminan por el salpique del agua de lluvia, y de esa manera contribuyen a que la enfermedad se extienda a las hojas vecinas. También penetran preferentemente en hojas jóvenes (González, 1976).

En tanto, las lesiones han seguido expandiéndose y empiezan a secarse en el centro y en las áreas de la hoja donde hay muchas lesiones (ápice y borde) se forman grandes parches necróticos. Debido a esto, el vigor de la planta, así como el peso y la calidad de la fruta, se reducen proporcionalmente al área foliar necrosada.

En las lesiones maduras, donde el tejido seco aparece casi blanco, empiezan a desarrollarse los peritecios y los esporangios; ambas son estructuras de forma globosa, inmersas en tejido seco. Los espermogonios producen espermacios, pequeñas esporas no infecciosas que funcionan como gametos masculinos. Cuando llueve, el agua arrastra los espermacios y muchos van a dar a los protoperitecios; entonces ocurre la fertilización, formándose núcleos diploides en las células madres ascales. En los peritecios fertilizados se desarrollan entonces varias ascas, cada una con ocho

ascósporas. Cuando maduran las ascósporas y se mojan los peritecios, las ascósporas son expulsadas una a una. Este ciclo se repite una y otra vez durante la estación lluviosa, simultáneamente con el ciclo asexual de conidióforos y conidios (González, 1976).

Existen diferencias significativas entre los conidios y las ascósporas del agente causal de la Sigatoka Amarilla del banano, las cuales son señaladas en la Tabla III.

En los meses donde la Sigatoka Amarilla ataca con mayor intensidad, el agricultor que no controla la enfermedad se ve obligado a entregar la cosecha a precio más bajo, y en ocasiones, se ve precisado a dar manos dobles por el valor de una, ya que la maduración temprana de los racimos no proporciona el tiempo necesario para el desarrollo adecuado de los mismos, donde pueden adquirir el peso y el tamaño correspondiente.

De acuerdo con lo dicho anteriormente, aunque la Sigatoka Amarilla no necesariamente mata al hospedero, esta enfermedad puede incidir de manera directa en el desarrollo anormal de los frutos, debido a la destrucción de un alto porcentaje de áreas verdes de las hojas de la planta hospedera, afectando drásticamente la economía de los pequeños y grandes productores de musáceas.

### c.) Control biológico de Hongos:

#### c.1.) Antecedentes:

El valor del control biológico como un método para la supresión de plagas fue demostrado en forma conveniente con el control de la *Icerya purchasi* por la vedalia en 1889. Es de interés señalar que después de que Koebele fue a Hawai, en 1897, hizo los primeros trabajos prácticos con una enfermedad que atacaba insectos, controlándola con el hongo *Metarrhizium*, y posiblemente realizó el primer trabajo de control biológico de malas hierbas cuando en 1902, envió insectos que se alimentaban de la Lantana de México a Hawai. Después de este primer período, muchos países iniciaron proyectos de control biológico y obtuvieron resultados tan satisfactorios que alentaron a continuar apoyando este tipo de investigación. Los adelantos mundiales desde 1900 han sido muy extensos y solamente se hace mención a algunos de ellos (De Bach, 1968).

El uso de la expresión "control biológico" es reciente, no aparece en los primeros escritos de autores americanos y británicos. En su lugar, se encuentran expresiones tales como " el uso práctico de insectos" y Smith (1919), citado por De Bach en 1968, escribió sobre ciertas fases de control de insectos por métodos biológicos y usó el término de "control biológico". En el

siguiente año Smith y Armitage (1920), citado por De Bach en 1968, usaron el término en el título de un escrito *Biological Control of Mealybugs in California*. Aún en este reporte no se había adoptado completamente el término porque describían la forma de exterminar las chinches harinosas por el "método biológico" o "parasítico". Aunque parece ser que ésta fue la primera vez que se usó la expresión control biológico, no tuvo una aceptación inmediata. Tres años después, cuando el trabajo dirigido por H. S. Smith fue transferido a la Universidad de California, la recién creada división fue denominada, División de Investigaciones de Insectos Benéficos. El Índice del *American Economic Entomology* no señala a ningún control biológico hasta la edición 1925-29, publicada en 1930. Sin embargo, a pesar de lo que tardó en aparecer, actualmente la expresión "control biológico" es muy usada y comprendida por todo el mundo (De Bach, 1968).

En el caso del control de microorganismos con extractos de plantas, también existen antecedentes remotos, así por ejemplo se sabe que los egipcios empleaban aceites de canela, clavo y cassia dentro del proceso de momificación de sus muertos. (Bullerman et al., 1977).

En Japón y la India, existe un uso tradicional de compuestos naturales de origen vegetal para la preservación de alimentos (Singh et al., 1980).

Del conocimiento empírico han surgido innumerables propiedades de las plantas y su diversidad química ha contribuido en gran parte al desarrollo industrial. La industria de los pesticidas agrícolas tuvo como base en sus inicios



la utilización de plantas como el tabaco, crisantemo, pero posteriormente con el desarrollo de los productos sintéticos se abandonó su uso. A pesar del limitado desarrollo de las investigaciones realizadas en esta área, Grainge y Ahmed (1988) han demostrado que existen alrededor de 2400 especies de plantas con propiedades contra plagas agrícolas, incluyendo desde malezas y roedores, hasta ácaros, pasando por insectos, nematodos, hongos, bacterias y virus. El conocimiento químico de los vegetales ha dilucidado la estructura de aproximadamente 10000 metabolitos secundarios y se calcula que podrían existir alrededor de 400000 de ellos (Swaminathan, 1988).

En México, se tienen antecedentes del uso de polvos vegetales para el control de insectos que son plagas de granos almacenados, como una técnica tradicional transmitida verbalmente de generación en generación (Lagunes y Rodríguez, 1989).

De microorganismos fitopatógenos existe información sobre alrededor de 400 plantas con propiedades contra 147 especies de hongos, y otras plantas contra 23 taxas de bacterias, 19 virus y 43 especies de nemátodos (Grainge y Ahmed, 1988).

Utilizando microorganismos se realiza un biocontrol de *Botrytis cinerea*, la cual causa pérdidas en la producción de violetas de los Alpes, debido a que causa podredumbre a los en los tejidos aéreos (Rivera et al, 2001).

Para el control biológico del *Fusarium oxysporum* se utilizan cepas de *Trichoderma harzianum*, teniendo ésta un efecto inhibitorio en pruebas in vitro, debido a la producción de metabolitos (Falico et al, 2001).

El control de *Penicillium digitatum* en postcosecha de cítricos se logra mediante el curado, el cual consiste en mantener el producto en un período de tiempo determinado (1 – 3 días) a una temperatura elevada (> 30° C) con el objeto de reducir la incidencia de podredumbre (Viñas et al, 2001).

Los aceites constituyen un tipo de metabolito secundario de plantas que tienen gran importancia económica, ya que es utilizada en diversas ramas de la sociedad, destacándose el sector alimenticio, farmacéutico y perfumería. Actualmente, la acción fungicida de esos aceites es bien estudiada para controlar algunos hongos que son fitopatógenos (Salgado et al, 2001).

De igual forma, hay alrededor de 50 familias de plantas en las que se han encontrados especies antifúngicas destacándose entre ellas el Ajo (*Allium sativum*) y la Cebolla (*Allium cepa*), con compuestos azufrados como principios activos. Estas especies destacan con un amplio espectro acción (Montes Belmont, 1997).

### c.2.) **Importancia:**

Son numerosas las investigaciones que se están realizando actualmente basadas en el control biológico de plagas. El mundo ha despertado ante los avisos de la comunidad científica, ante el daño inminente provocado al

ecosistema por el uso de pesticidas, fertilizantes, en fin una amplia gama de productos químicos que son utilizados para mejorar algunas cosechas, ignorando sus efectos secundarios ante la rápida respuesta que estos trae al problema primario. Todos estos productos químicos acabarán no sólo con los individuos a los cuales se quería atacar originalmente, sino también a quienes se alimentaban de ellos, rompiendo luego importantes cadenas alimenticias.

Adicionalmente, estos productos desembocarán en las fuentes de aguas contaminándolas, matando todos los seres vivientes que allí se encuentran, y acelerando de esta manera el proceso de eutroficación de los lagos. Además en los alimentos quedan residuos de estos productos químicos que pasan directamente al consumidor, lo que puede traer consigo intoxicaciones.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación que se plantea a continuación, se realizó en base al hongo *Mycosphaerella musicola*, causante de la Sigatoka Amarilla, el cual es un agente patógeno de las hojas de las plantas de musáceas. Por tanto, se realizó un diagnóstico de la enfermedad en la planta, con el objetivo de identificarla y aislarla para el trabajo en el laboratorio. Este hongo ha sido detectado en cultivos de importancia económica para Venezuela.

##### a) MATERIAL FITOPATOLÓGICO

a.1) **Colección del material:** el hongo se aisló de cultivos de musáceas, específicamente plantas de banano triploides variedad Pineo Gigante (AAA), que presentaban la enfermedad denominada Sigatoka Amarilla en el estadio I y II (Tabla I). Las plantaciones de banano se encontraban en un terreno ubicado en el sector el Cují en Los Altos de la Mariposa, el cual pertenece al Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT) de la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR).

Dicha plantación de banano contaba con aproximadamente 15 individuos que presentaban la sintomatología de la enfermedad mencionada anteriormente, a partir de los cuales se tomaron muestras para el aislamiento del hongo *Mycosphaerella musicola*.

b.1) **Selección del material vegetal:** la selección de una planta que puede ser utilizada en un proceso de control biológico depende de una serie de factores, ya que además de su eficiencia para el combate de una enfermedad, debe determinarse las partes de la planta más adecuadas para este proceso. Este procedimiento se realiza tomando en cuenta una serie de factores tales como: mayores concentraciones del principio activo, dosis óptima; rango de patógenos que son capaces de combatir; cantidad de material vegetal necesario para hacer rentable la utilización de la planta en proceso de control de la naturaleza, respuestas que dan sus principios activos al combinarse con otros extractos; pruebas toxicológicas y producción masiva de metabolitos; los cuales pueden dar respuestas ecológicamente inocuas (Montes Belmont, 1997).

Además, se debe tener conciencia que el uso de extractos vegetales tiene ciertas limitaciones tales como: disponibilidad de la planta y peligro de que existan en el extracto, componentes tóxicos que pudieran alterar el cultivo al cual se le está aplicando el control (Montes Belmont, et al 1997).

No obstante, debido a su naturaleza biodegradable y por el conocimiento cultural que tienen las personas que trabajan la tierra, presentan buenas perspectivas en el momento de su aceptación como agentes fungicidas (Montes Belmont, 1996). Las características de las plantas en estudio se describen en la Tabla I.

b.1.1) **Ajo (*Allium sativum*):** especie monocotiledónea que se ubica dentro de la familia Liliaceae. Es una especie perenne que se cultiva anualmente, a través de propagación agámica, debido a que los clones cultivados no producen semillas. El sistema radical es totalmente adventicio a partir del bulbo o diente. Las raíces son numerosas, finas (0.5 a 2 cm), superficiales, con escasas ramificaciones secundarias y desprovistas de pelos radicales. El sistema caulinar es erecto, bajo (menor de 1 m) y está compuesto de tallo, unas pocas hojas y, eventualmente, de un bulbo y una inflorescencia (Rama, 1994).

El tallo es subterráneo, corto - comprimido y cubierto por la base de las hojas, que se forman a partir de la yema apical. A partir de él se generan numerosos primordios radicales que conforman el sistema radical adventicio de la planta. Las hojas son opuestas, enfundadas o tubulares en la base, con un poro que permite la emergencia de la lámina de las hojas siguientes. A partir del poro, la lámina es lanceolada y de sección angular, con una cutícula cerosa. El conjunto de partes enfundadas de las hojas da origen al bulbo y a lo que se conoce como falso tallo del ajo. El bulbo del ajo está compuesto de varios bulbillos, desde 1 a más de 30, que se encuentran protegidos por las hojas más viejas de la planta (Rama, 1994).

El ajo se destaca por su alto contenido de materia seca, que puede variar entre 30 y 50%. De igual forma, presenta un alto contenido de compuestos

azufrados que le dan un olor y sabor característico que distinguen a la familia a la que pertenece (Rama, 1994).

El olor y sabor característicos del ajo explican su uso como saborizante en las comidas, pero otro uso, quizás más antiguo, ha sido como medicina. Esto debido a sus reconocidos efectos farmacológicos, algunos de los cuales, como su poder bactericida, fungicida, su acción anticoagulante y antiolesterol, y sus efectos benéficos en el tratamiento de asma, cáncer y diabetes y otros. ( Horticom [on line])

b.1.2) **Cebolla (*Allium cepa*):** especie monocotiledónea que se ubica dentro de la familia Liliaceae. Es una especie bienal bajo las condiciones habituales de cultivo, su sistema radical profuso superficial, casi en su totalidad adventicio, de raíces finas (0.5 a 2 mm), y pocas ramificaciones secundarias, desprovistas de pelos radicales. El sistema caulinar es erecto, de poca altura (menor de 1 m, excepto inflorescencias) y está compuesto de un tallo, unas pocas hojas y, eventualmente, de un bulbo y de una o más inflorescencias. El tallo es subterráneo, corto – comprimido, y se encuentra cubierto por las bases de las hojas que se generan a partir de su yema apical, a su vez en él se generan numerosos primordios radicales que dan origen al sistema radical adventicio de la planta. Las hojas, opuestas, son enfundadas en la base, por lo que cubren el ápice, y presentan un poro que permite la emergencia de las hojas más jóvenes. A partir del poro, la lámina es lanceolada y tubular, hueca, y con cutícula altamente cerosa. El conjunto de partes enfundadas de las hojas

dan origen al bulbo y a lo que se conoce como falso tallo de la cebolla. Los bulbos son estructuras de reserva que se forman al final de la primera temporada de crecimiento, en respuesta a condiciones de fotoperíodo creciente, y son el resultado de la acumulación de carbohidratos y otros compuestos de reserva en la base de las hojas (Rama, 1994).

La estructura de los bulbos está conformada por el tallo, una a tres catáfilas externas que se originan de hojas con lámina, las que se secan y sirven de protección, un número variable de catáfilas engrosadas, usualmente cuatro, provenientes también de hojas con lámina, y tres a cuatro catáfilas engrosadas sin lámina, las que a su vez envuelven a entre cuatro a cinco hojas que recién inician su desarrollo (Rama, 1994).

Las cebollas tienen un alto contenido de agua y bajo porcentaje de materia seca ( 8 % a 10%, y hasta más de 20% en cebollas para deshidratación), carbohidratos, proteínas y lípidos. Sin embargo, tiene un olor y sabor característicos, asociados a compuestos azufrados que actúan como precursores de diversos compuestos volátiles. Estos compuestos son S-alcenil sulfóxidos de cisteína, dominando en cebolla el S- (1- propenil), S- propil y S metil sulfóxido de cisteína, los que al dañarse la célula reaccionan, bajo la presencia de alianza (S – alcil- L – sulfóxido de cisteína liasa), para liberar ácido sulfénicos, amoníacos y piruvato. Estos ácidos se degradan para formar un amplio grupo de productos de fuerte olor y sabor. La presencia de estos compuestos característicos hace que las cebollas sean atractivas para muchos



consumidores y da origen a una demanda permanente de producto natural e industrializado (Horticom [on line])

b.1.3) **Neem (*Azadirachta indica*)**: el árbol del Neem es una planta de la familia Meliáceae. Es un árbol mediano que puede alcanzar desde 8 a 15 metros de alto, su tronco es recto y puede medir entre 30 y 80 centímetros de diámetro, tiene una copa redonda y densa. Es un árbol “siempre verde”, o sea, que mantiene sus hojas durante todo el año (OIKOS, 2000). Tanto las hojas, como el tallo o las semillas del Neem están compuestas por triterpenoides, los cuales se dividen en nueve grupos distintos: los grupos azadirone, amoorastatin, vepinin, vilasinin, c-seco meliacin, nimbin, nimbolinin, salannin y azadirachtin.

El Neem tiene innumerables usos entre los cuales se pueden destacar:

- Insecticida natural: debido a que interfiere con la acción de las hormonas juveniles elaboradas por los propios insectos para avanzar de un estado de vida al próximo.
- Actividad antigustativa o supresora de la ingestión: esta actividad es muy importante en la agricultura puesto que protege el cultivo al inhibir su ingestión por las plagas presentes.
- Actividad repelente: olor característico del extracto, debido a la presencia de compuestos triterpenoides, que ahuyenta las plagas del cultivo tratado (OIKOS, 2000).

### c) OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

c.1)**Extractos en forma de polvo:** se seleccionaron partes específicas de las plantas a trabajar, es decir, el bulbo de cebolla, los dientes de ajo y las hojas de neem. Posteriormente se dejaron secar en el horno o estufa por 72 horas a una temperatura menor a 60° C, y luego se pulverizaron en un mortero. (Montes Belmont, 1997)

c.2)**Extractos con solventes orgánicos:** para extraer los compuestos activos que poseen las plantas a utilizar, se emplearon dos solventes de diferentes grado de polaridad, uno altamente polar como el agua, y uno de menor polaridad como el Hexano (Monte Belmont, 1997).

c.2.1)**Preparación de extractos con solventes orgánicos a diferentes concentraciones:** en el caso del agua se agregaron 5, 10 y 20 gr. de polvo respectivamente, por cada litro de agua destilada. Posteriormente, el extracto en polvo se dejó remojando durante 12 horas y se procedió a la filtración de cada una de las concentraciones. En el caso del Hexano, se agregaron por cada litro de Hexano 5, 10 y 20 gr. del polvo respectivamente. Luego se dejó hervir durante 5 minutos y posteriormente se filtró como en el caso del agua (Montes Belmont, 1997).

#### d) **EVALUACIONES "In Vivo" e "In Vitro"**

d.1.) **Evaluación "In Vitro"**: para la realización de las evaluaciones in vitro se utilizó una población de 10 muestras por cada tratamiento, por tal motivo, para obtener un valor fiable se promediaron los resultados obtenidos en los diversos tratamientos.

d.1.1) **Obtención del control**: para comparar el efecto causado por los extractos de Ajo, Cebolla y Neem en los hongos cultivados se realizó una curva patrón del desarrollo del hongo in vitro, en la cual se midió su patrón de crecimiento. Con este objetivo, se cuantificó su área de crecimiento en cápsulas de petri con 25 ml de medio de cultivo PDA, y el número de esporas generadas a las 48, 96, 144 y 192 horas de haber sido sembrado el hongo.

d.1.1.1.) **Determinación del área**: se rotuló el borde que delimitaba el crecimiento del hongo en cápsulas de petri, utilizando hojas de acetatos que, posteriormente se recortaban y pesaban en una balanza analítica (Marca OHAUS). Este peso fue utilizado para calcular el área de crecimiento del hongo, tomando como referencia el peso de 1 cm<sup>2</sup> del mismo material. Las mediciones fueron realizadas a las 48, 96, 144 y 192 horas de haber sido sembrado el hongo en estudio.

d.1.1.2) **Contaje de esporas**: la determinación de las esporas en cada experimento se realizó utilizando una pipeta pasteur esterilizada, cuyo diámetro es de 0.1 cm. Las muestras fueron tomadas luego de 48 horas de la siembra

del hongo, en una cámara de flujo laminar (Marca: Microflow Pathfinder Intermed). Posteriormente, se le agregó a la pipeta pasteur 100 microlitros de agua destilada con la ayuda de una micropipeta. De esta manera, el contenido de la pipeta fue vaciado en un tubo ependorf. Posteriormente, este se agitó en un vortex (Marca: Maximi thermoline), con el objeto de dispersar las esporas por toda la solución. Luego con la ayuda de una micropipeta se tomaron 10 microlitros de la solución y se añadieron en una cámara de Neubauer para su conteo. Es importante destacar que el número de esporas contadas se multiplicó por  $10^4$ , el cual es el factor de conversión de la cámara, lo que permitió determinar el número de esporas que se encontraban en 0,1 ml de solución. Se realizó el contaje de esporas a las 48, 96, 144 y 192 horas de haber sido sembrado el hongo.

d.1.1.3.)**Registro en el Microscopio Electrónico de Barrido:** se realizaron observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido con el fin de determinar la estructura morfológica del hongo *Mycosphaerella musicola*. Para la realización de dichas observaciones se procesó la muestra a través de los siguientes tratamientos:

- **Separación de la muestra a tratar:** se extrajo un área de 3 mm<sup>2</sup> del hongo que se encontraba sembrado en placas de petri con medio de cultivo PDA. Este proceso se realizó en una campana de flujo laminar, para evitar la contaminación de la muestra con otros microorganismos.

- **Colocación de fijadores:** Se introdujo la muestra en una solución de Glutaraldehído al 2,5% por 24 horas. Posteriormente, se procedió a lavar con un Buffer fosfato, cuya concentración es de 0,1 M y pH 7,2 en dos ocasiones durante 10 minutos cada uno. Luego se fijó con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% en el mismo buffer por 3 horas. Pasado ese lapso de tiempo se lavó dos veces la muestra con agua destilada, 10 minutos cada una.
- **Deshidratación de la muestra:** se introdujo la muestra en de diferentes concentraciones de alcohol que aumentaban progresivamente de 70% a 95% . Posteriormente, la muestra se colocó en alcohol al 100% dos veces, para asegurar que no exista agua en la muestra.
- **Determinación de punto crítico:** este proceso permitió la deshidratación total de la muestra y sacar el alcohol al 100% , de tal forma que ésta quedará seca y conservará su estructura tridimensional.
- **Montaje de la muestra:** la muestra fue colocada sobre el porta muestras de barrido, y debajo de ésta se añadió una tira de cinta de carbón, se añadió pintura de plata en la parte lateral de la muestra para que funcionara como contacto. Luego se hizo un cubrimiento metálico con platino. Posteriormente, se realizaron observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido utilizando diferentes aumentos en el siguiente

rango (1560X – 25000X) utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido Marca: Hitachi, Modelo S-4500.

- **Registros fotográficos de la muestra:** se realizaron registros fotográficos de las muestras fijadas, utilizando diferentes aumentos.

d.1.2.)**Aplicación de extractos:** para el estudio de cualquier fitopatógeno es conveniente tener una visión amplia en cuanto a su efecto en germinación de esporas, desarrollo micelial, esporulación e infección. Por tal razón, los extractos se aplicaron de las siguientes maneras:

d.1.2.1.)**Extracto Incorporado al medio de cultivo:** los extractos obtenidos fueron pasados por filtros bacteriológicos antes de ser agregados al medio de cultivo (Kenneth, 1986).

De los extractos procesados con los solventes agua y Hexano, en sus diferentes concentraciones (5, 10 y 20 gr./l.), se agregaron 2 ml del extracto a 25 ml del medio de cultivo. Este se agregó cuando la temperatura del medio de cultivo estaba ubicada en 45 ° C. Posteriormente, el medio con el extracto incorporado se agregó en cápsula de petri. Posteriormente al solidificar el medio se sembró el hongo *Mycosphaerella musicola*.

d.1.2.2.)**Extracto Agregado sobre el hongo:** luego de un período de 96 horas de haber sido sembrado el hongo, se agregaron 2 ml de los extractos señalados anteriormente sobre el hongo en crecimiento.

d.1.3.) **Evaluación de la eficiencia de cada extracto:**

d.1.3.1.) **Técnica de la pesada:** la evaluación se realizó a las 48, 96, 144 y 192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo. Este procedimiento se realizó para las muestras experimentales y los controles.

d.1.3.2) **Contaje de esporas:** se realizó a las 48, 96, 144 y 192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo. Este proceso, se realizó de igual manera, para muestras experimentales y muestras controles.

d.1.3.3) **Registro en el Microscopio Electrónico de Barrido:** se extrajeron diferentes muestras del hongo sometido a los tratamientos con los diferentes extractos utilizados. Las muestras para realizar estos registros se tomaron luego de la primera aplicación de los extractos estudiados. Posteriormente se le realizó el tratamiento necesario para la observación de muestras al Microscopio Electrónico de Barrido explicado anteriormente, y luego se realizaron los registros fotográficos del hongo en aumentos que van desde el siguiente rango (1560X – 25000X). Este proceso se realizó con el objeto de visualizar el efecto de los extractos sobre la morfología del hongo.

d.2.) **Evaluación "In Vivo":** las plantas de musáceas utilizadas para las pruebas "in vivo" fueron plantas de banano triploides variedad "Pineo Gigante" (AAA), que son susceptibles a la Sigatoka Amarilla.

d.2.1.) **Selección del material vegetal:** el conocimiento de la enfermedad y del proceso de la infección es importante tanto para plantaciones

no tratadas con productos químicos, como para aquellas donde se lleva un riguroso régimen de aspersiones. Mediante la relación entre el promedio del número de hojas/ planta y el de la hoja más joven manchada, se puede determinar la situación de la plantación para un momento dado (Cordero, 1989).

Para la realización de las pruebas "in vivo", se enumeraron las hojas jóvenes de 12 plantas de banano, las cuales presentaban la enfermedad en el estadio I y II (Tabla II). En ese momento, las hojas presentaban una leve decoloración en forma de punto entre las nervaduras secundarias desde la segunda y cuarta hoja a partir de la hoja bandera, que también presentaba estrías de tonalidad amarilla.

La numeración se realizó de arriba hacia abajo tal como se señala en la (Figura 3). En el caso de las plantas aún sin florecer se considera hoja número uno a la última hoja emitida que esté al menos dos tercios desplegada, según la metodología propuesta por Cordeiro et al, (2000). Las hojas subsecuentes serán enumeradas en edad creciente. (Figura 14-B). En las plantas recién florecidas se enumeran las hojas a partir de la bellota floral (Figura 14.A) (Cordeiro et al, 2000).

De esta misma plantación, se aisló el hongo para la realización de las pruebas in vitro.

Posteriormente, en cada hoja se circunscribió un área de 144 cm<sup>2</sup>, donde se aplicó el extracto.



d.2.2.)**Aplicación del extracto:** el área delimitada anteriormente, fue asperjada con 10 ml de cada uno de los diferentes extractos procesados con los solventes orgánicos, utilizando la concentración seleccionada como ideal en las pruebas "in vitro" (20 gr/l.). Los extractos para cada tratamiento fueron aplicados en tres ocasiones a las 48, 96, 144 horas, con cuatro repeticiones por cada tratamiento.

d.2.3.)**Evaluación de los extractos:** luego de cada aplicación se realizó una evaluación cualitativa de la acción de cada extracto sobre la evolución de la enfermedad, en la cual se determinó el desarrollo del hongo a través del crecimiento de la mancha producida por éste, grado de toxicidad de los extractos, y el estado general del tejido vegetal.

e.)**Análisis Estadísticos:** se realizaron promedios y desviaciones estándar de cada uno de los tratamientos aplicados y para los controles tanto para el número de esporas como para el área del hongo.

Se realizó una prueba de bondad de ajuste, para ver si los datos se ajustaban a una distribución normal.

Para determinar el extracto que exhibía un mejor efecto sobre el desarrollo del hongo, se estableció un intervalo de confianza para la media de cada una de las poblaciones, utilizando las medias muestrales y las varianzas muestrales. Posteriormente, se comparó la que tenía menor media con las medias que tenían valores cercanos a ésta. Este procedimiento se realizó para determinar si los intervalos de confianza se interceptaban.

De igual forma, para determinar si existieron diferencias significativas entre los extractos se hizo un análisis de varianza simple en base al número de esporas y al área de crecimiento del patógeno, y en donde la hipótesis nula puesta a prueba fue que el efecto de los tratamientos sobre el hongo era igual y la hipótesis alternativa fue que al menos, que un par de estos tratamientos tenían un efecto diferente.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es importante señalar, que la palabra fungicida ha sido utilizada en forma indiscriminada tanto para los agentes que eliminan al hongo, como para los que inhiben el desarrollo del hongo. En este trabajo, se utilizó el término fungistático como aquel que controla al patógeno, inhibiendo su crecimiento, tal como lo señala Costa en (1979) y Bello en (1996), el término fungicida lo utilizaremos como aquel que mata o destruye al hongo.

### a.1) Curva de crecimiento del hongo:

A partir del aislamiento del hongo a través de cámara húmeda, se obtuvieron colonias puras, que permitieron estudiar y cuantificar el desarrollo del hongo, para lo cual se realizaron medidas del área ocupada por el hongo y el número de esporas generadas por el mismo cada 48 horas, por un período de 8 días.

Al realizar la curva en la cual se registró el área de crecimiento (Figura II), se determinó que el hongo tenía un mayor crecimiento en el lapso comprendido entre las 48 y 96 horas. De igual manera, se observó que a partir de las 144 horas, se presentaba una fase estacionaria en el crecimiento del hongo. Se puede inferir, que a partir de este momento, podría estar influyendo sobre el desarrollo del hongo una reducción de nutrientes en el medio, lo que

limita su crecimiento. Sin embargo, sabemos que este patrón puede ser característico del desarrollo del patógeno. Debido a que el crecimiento fue muy lento a partir de este punto, la última medida tomada para la realización de esta investigación, fue a las 192 horas de haber sembrado el hongo.

## **a.2.) Evaluaciones "in vitro":**

### **a.2.1.) Determinación de las concentraciones idóneas**

**a.2.1.1.) Extractos obtenidos en base Agua:** en la obtención de los extractos en base agua, se utilizaron distintas concentraciones del material vegetal proveniente de plantas de Ajo, Cebolla y Neem, los cuales fueron agregados al solvente en forma de polvo, que fueron obtenidos a partir de la deshidratación y pulverización de los mismos. Las concentraciones empleadas fueron 5, 10, y 20 gr/l. A partir de estas concentraciones se realizaron las pruebas para evaluar los efectos del extracto sobre el desarrollo del hongo a nivel de área y número de esporas a través del tiempo. Estas variantes han sido señaladas en investigaciones similares realizadas por Hernández et al., (2001). Los resultados mostraron que en todos los tratamientos hubo una mayor reducción en el área y en el número de esporas a medida que las concentraciones de los extractos de Ajo, Cebolla y Neem eran más altas (Tablas IV, VI, VIII, X, XII, XIV y Figuras 4, 5, 6, 10, 11,12), en relación a los controles, de lo que se infiere que a medida que se incrementa la

concentración del extracto hay una mayor cantidad del principio activo que actúa sobre el control de la enfermedad. Sin embargo, no se realizaron pruebas con concentración mayores a las de 20 gr/l. Por tal razón, en este estudio no se pudo determinar cual era la concentración a partir de la cual se presenta un efecto tóxico sobre el hongo en estudio.

**a.2.1.2) Extractos obtenidos en base Hexano:** el Hexano se utilizó como solvente debido a que con él se pueden de extraer un mayor número compuestos químicos que se encuentran en el Ajo, Cebolla y Neem, que no pueden obtenerse en Agua (Solvente universal), porque existen compuestos químicos que se encuentran en estos vegetales que solo son solubles en solventes orgánicos como el Hexano (Domínguez, 1978).

Las concentraciones empleadas para éstos tratamientos fueron de 5, 10 y 20 gr/l, obteniéndose una reducción en el área y en la esporulación que presentaba el hongo, en todos los tratamientos, destacando que la mayor reducción se obtuvo en la concentración de 20 gr/l, (Tablas III, V, VII, IX, XI, XIII y Figuras 7, 8, 9, 13, 14, 15). Los extractos obtenidos en base Hexano, presentan una alta volatilidad que puede limitar la concentración de los principios activos (Montes Belmont, 1997). Esto podría explicar la alta efectividad en el control de la enfermedad, en una concentración de 20 gr/l, debido a que en esta concentración podría existir una mayor cantidad de compuestos químicos que permiten el control de la enfermedad "in vitro".

### **a.2.2.) Extractos agregados al hongo:**

**a.2.2.1.) Extracto en base Agua:** para realizar la comparación del efecto producido por los distintos extractos, se preparó un grupo control al cual se le agregó Agua estéril a las 96 horas de haber sembrado el hongo. De la misma manera, se agregaron sobre el hongo 2 ml de los extractos vegetales de Ajo, Cebolla y Neem en las concentraciones de 5, 10 y 20 gr/l, a las 96 horas de haberse efectuado la siembra, debido a que es a las 96 horas es cuando el hongo presenta un mayor desarrollo, lo cual facilitaría la observación de la incidencia de los extractos sobre el crecimiento del patógeno

Los resultados obtenidos con los extractos Cebolla - Agua (Tabla V), Ajo - Agua (Tabla III), Neem - Agua (Tabla VII) en concentración de 5 gr/l, dio como resultado que el extracto Neem - Agua es el más eficaz en el control del crecimiento del patógeno en estudio, debido a que fue el que incidió severamente en el crecimiento, pues, el área reportada en el control fue de 3,3866 cm<sup>2</sup> a las 96 horas mientras que a las 144 horas, su área fue de 10,1496 cm<sup>2</sup>, registrando un aumento en este periodo de tiempo de 6,7630 cm<sup>2</sup> de diferencia, mientras que en el extracto Neem - Agua (Tabla VII) a las 96 horas el área es de 6,1538 cm<sup>2</sup> y a las 144 horas de 9,1182 cm<sup>2</sup>, lo que da un crecimiento del hongo en ese período de tiempo de 2,9644 cm<sup>2</sup>, resultando una

reducción significativa del área con respecto al control, por efectos del tratamiento.

Por otro lado, el extracto Ajo - Agua (Tabla III), registra un área de 2,7923 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y de 6,7096 cm<sup>2</sup> a la 144 horas, lo que da una diferencia de 3,9173 cm<sup>2</sup> de crecimiento en ese lapso de tiempo, lo que demuestra una mediana eficacia de este extracto, con respecto a la reducción en el crecimiento ejercida por el extracto Neem - Agua.

Por otro lado, el extracto Cebolla - Agua (Tabla V), no presentó una disminución significativa del crecimiento con respecto al grupo control del patógeno, sometido a dicho tratamiento, el cual fue de 2,8776 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y de 8,4843 cm<sup>2</sup> a las 144 horas, dando como crecimiento en este periodo de tiempo un valor de 5,6067 que es similar al registrado por el control.

En los tratamientos realizados con concentraciones de 10 gr/l, el extracto Cebolla - Agua (Tabla V), Ajo - Agua (Tabla III), Neem - Agua (Tabla VII), cambia en la tendencia registrada en los tratamientos con los mismos extractos en concentración 5 gr/l.

El extracto que obtuvo una disminución significativa de crecimiento del hongo con respecto al control, fue el extracto Cebolla-Agua (Tabla V) cuya área a las 96 horas fue de 3,3939 cm<sup>2</sup>, y a las 144 horas de 5,7935 cm<sup>2</sup>, lo que registra un crecimiento en dicho período de 2,3996 cm<sup>2</sup>, a diferencia del grupo control, el cual registra un crecimiento de 6,7630 cm<sup>2</sup> en el mismo período de tiempo.

En el caso del extracto Ajo-Agua (Tabla III) el tratamiento fue medianamente efectivo ya que el resultado reportado es de 3,7365 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y 8,4721 cm<sup>2</sup> a las 144 horas, registrando una diferencia de 4,7656 cm<sup>2</sup> en ese lapso de tiempo. Por otro lado, el crecimiento de los hongos tratados con Neem - Agua de concentración 10 gr/l, fue de 1,8789 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y de 7,9872 cm<sup>2</sup> a las 144 horas, lo que registra una diferencia de 6,1083 cm<sup>2</sup>, la cual es similar al crecimiento registrado en el control en ese período de tiempo, el cual fue de 6,7630 cm<sup>2</sup>.

De estos resultados, se puede inferir, que después de agregar el extracto, el Agua pudo actuar como agente mecánico, permitiendo una mayor dispersión del hongo, tal como lo indica Bello (1996). La dispersión o diseminación se refiere al movimiento del inóculo desde el sustrato donde se produce hasta zonas infectables de la planta. Esta dispersión es independiente de la escala espacial o temporal que se considere; así, se incluyen desplazamientos desde unos milímetros hasta miles de kilómetros, cuya duración puede variar desde segundos hasta varios años. El viento y el agua son los principales agentes de dispersión de los hongos fitopatógenos.

Los resultados obtenidos con los extractos en concentraciones de 20 gr/l, registraron una similitud bien marcada entre los valores de crecimiento del hongo tratado con el extracto Ajo - Agua (Tabla III) y con extracto Cebolla-Agua (Tabla V) en relación al control.



El extracto Ajo-Agua registro un área de 4,1209 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y de 5,2968 cm<sup>2</sup> a las 144 horas, y la diferencia de estas medidas da como resultado 1,0759 cm<sup>2</sup>, mientras que en el extracto Cebolla - Agua (Tabla V) el área registrada es de 2,7300 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y 4,0491 cm<sup>2</sup> a las 144 horas, lo que implica un crecimiento de 1,3191 cm<sup>2</sup>. Ambos resultados son menores en comparación con el grupo control, el cual es de 6,7630 cm<sup>2</sup>. La reducción en el crecimiento del hongo en los diferentes tratamientos, es significativa. En relación al material utilizado para estos extractos, se ha señalado que los compuestos de Sulfuro, presentes en ambas especies vegetales, tales como cebolla y ajo, (Costa et al,1979). Tienen características fungistáticas, por lo cual, inhiben notablemente el crecimiento del hongo, Montes Belmont (1997), reporta que el extracto de Ajo presenta un efecto inhibitor en el área del hongo *Aspergillus flavus* Link, que afecta cultivos de maíz.

Cabe destacar, que la similitud obtenida entre los promedios en relación al área para los extractos Ajo - Agua y Cebolla - Agua, se deba posiblemente a la similitud de sus compuestos activos (Costa et al, 1979).

Sin embargo, el extracto Neem-Agua presentó un efecto menos evidente ya que las 96 horas su área fue de 3,8686 cm<sup>2</sup> y a las 144 horas fue de 7,2549 cm<sup>2</sup>, generando un área de crecimiento del hongo de 3,3863 cm<sup>2</sup>, resultado que no deja de ser significativo con respecto al control, pero menos eficaz que los extractos Ajo - Agua y Cebolla - Agua.

El efecto de los extractos fue comparado con la curva de crecimiento del hongo (Figura 2). Estos resultados demuestran que al final del período experimental, el área registrada por el control de Agua agregada sobre el hongo, fue mayor que el valor obtenido en la curva de crecimiento del hongo sin aplicación de tratamiento, debido a que el agua puede actuar como un agente mecánico de dispersión de las esporas. Lo anteriormente expuesto, ocurre en la naturaleza con la lluvia como un mecanismo de dispersión de esporas (Bello, 1996).

Es importante destacar, que los resultados obtenidos en los distintos tratamientos en relación a la curva de crecimiento del hongo, fueron significativamente diferentes, lo cual demuestra el efecto fungistático de los extractos utilizados .

Por otro lado, el número de esporas fue similar para la curva de crecimiento en relación al control Agua agregada al hongo, ya que el Agua estéril no surtió ningún efecto sobre el proceso de esporulación del hongo, y solo afectó el desarrollo micelial del mismo.

En cuanto al efecto ejercido por los extractos de concentración 5 gr/l (Figura 4) sobre el número de esporas, se pudo observar que el extracto Cebolla- Agua ejerció un mejor efecto en la reducción del número de esporas, siguiéndole el extracto Neem - Agua. Resultados similares son señalados por Montes Belmont et al (1997) al trabajar con los extractos de cebolla para el control de *Aspergillus flavus* link, en maíz y por Hernández (2001) al trabajar

con *Fusarium oxysporum*, *Cephalosporium sp.* y *Verticillium albo-atrum*. Se debe destacar que el efecto ejercido por el extracto Ajo – Agua, aunque es fungistático, no fue tan representativo como los obtenidos en los extractos Cebolla - Agua y Neem - Agua.

En cuanto a los resultados obtenidos para los extractos de concentración de 10 gr/l, (Figura 5) se puede destacar que el extracto Cebolla - Agua no tuvo un efecto inhibitorio, por el contrario los valores obtenidos en este tratamiento dieron mayores a los obtenidos en el control del hongo para este tratamiento.

El extracto Neem - Agua tuvo un efecto inhibitorio, debido a que en este tratamiento se observó la mayor disminución en relación al número de esporas del hongo, en comparación a los resultados obtenidos para el control Agua agregada al medio. De igual manera, el extracto Ajo - Agua tuvo un efecto fungistático medianamente efectivo, porque los valores obtenidos en este tratamiento, son menores a los del control, pero a la vez mayores a los obtenidos en el extracto Neem - Agua.

Los resultados obtenidos en los extractos de concentración 20 gr/l, (Figura 6) indican que tuvieron un efecto inhibitorio en comparación al obtenido en el control Agua agregada al medio. De igual forma, se puede destacar que el extracto Neem - Agua tuvo el mejor efecto en la reducción del número de esporas. Hernández (2001) señala resultados similares al trabajar con: *Fusarium oxysporum*, *Cephalosporium sp* y *Verticillium alboatrum*.

En relación al extracto Ajo – Agua, se puede decir que este tratamiento tuvo un efecto medianamente inhibitorio, debido a que los valores obtenidos en este tratamiento, son mayores a los registrados en el tratamiento con el extracto Neem- Agua. Resultados similares son obtenidos por Montes Belmont (1997) en investigaciones realizadas con *Aspergillus flavus* link. En el caso del extracto Cebolla – Agua, se puede destacar que su efecto inhibitorio no fue muy bueno, aunque en la última medición se observó una disminución significativa en el número de esporas, de lo cual se puede inferir que su efecto puede ser a largo plazo.

Debido a estos resultados, se puede indicar que la concentración más adecuada de los extractos, en la reducción de esporas fue de 20 gr/l, debido a que las concentraciones de los principios activos son mayores en relación a la concentraciones de 5 y 10 gr/l.

**a.2.2.2.) Extractos en base Hexano:** los extractos vegetales obtenidos en base Hexano, se realizaron con la finalidad de obtener a partir de la materia vegetal seca (polvo) de Ajo, Cebolla y Neem sus compuestos activos con propiedades antifúngicas. Se ha señalado que este tipo de compuestos se disuelven con mayor facilidad en solventes medianamente polares como el Hexano (Morrison et al, 1996).

Para el proceso experimental, se uso un grupo control con el objeto de comparar el efecto causado por cada uno de los extractos. Este se realizó agregando sobre el hongo 2 ml de Hexano puro en el momento en el que el

hongo tenía 96 horas de sembrado. El mismo procedimiento se llevó a cabo para tratar el patógeno con los extractos Ajo- Hexano, Cebolla – Hexano y Neem - Hexano, agregando los extractos a las 96 horas, debido a que en pruebas preliminares, se observó que el mayor crecimiento del hongo “in vitro” sin ningún tratamiento, ocurrió en el período de 96 a 144 horas de haber sido sembrado el hongo (Figura 2). Por tal razón, el Hexano se agrega sobre el hongo para diferenciar si existe una notable reducción del área que acredite a los extractos como buenos controladores en el desarrollo del hongo.

Los resultados obtenidos con los tratamientos Ajo - Hexano y Cebolla - Hexano en concentración de 5 gr/l (Tablas VII, IX y XI respectivamente), en relación al área de crecimiento, demuestran que son similares entre ellos, y significativamente diferentes al grupo control.

En el control, donde el en el cual el Hexano es agregado sobre el hongo se observó un valor de área de 2,5378 cm<sup>2</sup> a las 96 horas a 7,3832 cm<sup>2</sup> a las 144 horas, registrándose un crecimiento de 4,8454 cm<sup>2</sup> en ese lapso de tiempo,

Es importante destacar, que el mejor efecto se registró en el tratamiento con el extracto Ajo – Hexano (Tabla IV) 5 gr/l, pues fue el que obtuvo la mayor disminución en el crecimiento del hongo. El valor registrado a las 96 horas fue de 3,9810 cm<sup>2</sup> y a las 144 horas 6,7293 cm<sup>2</sup>, lo que da un crecimiento de 2,7483 cm<sup>2</sup> en ese lapso de tiempo. El resultado obtenido para las 96 horas en el extracto Cebolla – Hexano (Tabla VI) 5 gr/l, fue de 4,1134 cm<sup>2</sup> y a las 144

horas fue de  $7,0920 \text{ cm}^2$ , originando un crecimiento del hongo en ese lapso de tiempo de  $2,9786 \text{ cm}^2$ .

Por el contrario, el extracto Neem – Hexano (Tabla VIII) en  $5 \text{ gr/l}$ , registra un área de  $4,0160 \text{ cm}^2$  a las 96 horas y una de  $7,8361 \text{ cm}^2$  a las 144 horas, valores de los que resulta un crecimiento de  $3,8201 \text{ cm}^2$  en ese período de tiempo, lo que en comparación con el crecimiento de  $4,0865 \text{ cm}^2$  del grupo control, no representa una diferencia significativa

Los resultados obtenidos por los tratamientos con los extractos Ajo – Hexano (Tabla IV) y Cebolla – Hexano (Tabla VI) en concentración  $10 \text{ gr/l}$  siguen la tendencia registrada con los diferentes extractos de concentración  $5 \text{ gr/l}$ .; ya que el Ajo- Hexano (Tabla IV) registra un área de  $3,8252 \text{ cm}^2$  a las 96 horas y de  $6,2050 \text{ cm}^2$  a las 144 horas, lo que nos reporta un crecimiento  $2,3718 \text{ cm}^2$  en ese período de tiempo, mientras que el extracto Cebolla – Hexano (Tabla VI) reporta un crecimiento de  $4,2057 \text{ cm}^2$  a las 96 horas y de  $6,8053 \text{ cm}^2$  a las 144 horas, que representa un crecimiento neto de  $2,5996 \text{ cm}^2$  durante ese lapso de tiempo. Esto demuestra que ambos extractos tuvieron un efecto similar a nivel cuantitativo.

Por otro lado, los resultados arrojados por el extracto Neem- Hexano (Tabla VIII), en su área de crecimiento, señalan un valor de  $3,9782 \text{ cm}^2$  a las 96 horas y de  $6,5220 \text{ cm}^2$  a las 144 horas, lo que da una diferencia de  $2,5438 \text{ cm}^2$ , valor neto que se asemeja cuantitativamente a los resultados obtenidos con los extractos Ajo- Hexano y Cebolla- Hexano.

De ello se puede inferir, que los compuestos fungistáticas (Triterpenoides) (OIKOS, 2000) presentes en el extracto Neem- Hexano 10 gr/l, pudiesen actuar mejor en dicha concentración, debido a que se encuentran en mayor proporción.

En relación a los resultados obtenidos para los tratamientos hechos con los extractos Ajo - Hexano (Tabla IV), Cebolla- Hexano (Tabla VI) y Neem - Hexano (Tabla VIII) a 20 gr/l, la mayor incidencia en la reducción del área se obtuvo con extracto Neem - Hexano, registrando un área de 3,5039 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y a las 144 horas de 5,2940 cm<sup>2</sup>, lo que da un crecimiento del hongo de 1,7901 cm<sup>2</sup>, lo cual se traduce en una reducción significativa en comparación con el grupo control, cuyos datos fueron 2,5378 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y 7,3832 cm<sup>2</sup> a las 144 horas, lo que nos da un área de crecimiento en este lapso de tiempo de 4,8454 cm<sup>2</sup>. Este resultado demuestra que el extracto Neem - Hexano en concentración 20 gr/l tiene un efecto significativo en la reducción del área del hongo *Mycosphaerella musicola*.

Por otro lado, el resultado obtenido a la concentración de 20 gr/l. con el extracto Ajo - Hexano (Tabla IV) es similar cuantitativamente al extracto Neem - Hexano (Tabla VIII), debido a que se registró un área de 3,6295 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y un área de 5,4523 cm<sup>2</sup> a las 144 horas, lo cual sugiere que hubo un crecimiento de 1,8228 cm<sup>2</sup> en el lapso de tiempo comprendido entre las 96 y 144 horas, cifras que al ser comparadas con las del grupo control permiten decir que el efecto causado por este extracto es significativo en la reducción del

área del patógeno estudiado y que su eficacia en la reducción del área es similar a la presentada por el extracto Neem - Hexano (Tabla VIII), la cual fue de 1,7901 cm<sup>2</sup>.

Los resultados obtenidos en relación extracto Cebolla - Hexano (Tabla VI) son significativos con respecto al control, ya que su área a las 96 horas fue de 4,1468 cm<sup>2</sup> y a las 144 de 6,1830 cm<sup>2</sup> delimitando estas cifras un crecimiento de 2,0362 cm<sup>2</sup>. De éstos resultados se puede inferir que el extracto Cebolla- Hexano tiene un efecto sobre el desarrollo del hongo, aunque no tan efectivo como demostró ser con los extracto Neem - Hexano y Ajo - Hexano.

Cabe destacar que los resultados en relación a la reducción de las áreas para los diferentes tratamientos a 20 gr/l. no fueron significativamente diferentes entre ellos.

En relación a las concentraciones utilizadas se puede decir que la concentración más eficiente fue la de 20 gr/l, debido a que la alta volatilidad del solvente utilizado como base del extracto, limita la concentración de los principios activos, como lo demostró en su investigación Montes Belmont, (1997).

Cabe destacar que el efecto más resaltante en la reducción del área del hongo, se registró en el período comprendido entre las 96 y 144 horas de haberse sembrado el patógeno, por tal razón, los datos empleados en la discusión hacen referencia a este período, ya que en las mediciones registradas a las 48 horas, no tenían la incidencia del extracto. Además, es en este período



de tiempo, donde actúa el extracto, ya que los mismos están realizados en base a Hexano, el cual es un solvente que se volatiliza rápidamente.

Cabe destacar, que comparando el control con Hexano agregado sobre el hongo y la curva de crecimiento, los resultados del control con Hexano fueron de 2,5378 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y a las 144 horas de 7,3832 cm<sup>2</sup>, ocasionando una diferencia entre éstos de 4,8654 cm<sup>2</sup>. Los resultados de la curva patrón fueron de 6,4462 cm<sup>2</sup> a las 96 horas y de 10,5327 cm<sup>2</sup> a las 144 horas, la diferencia resultante fue de 4,0865 cm<sup>2</sup>, lo que demuestra que hubo un crecimiento mayor que en el control Hexano. Esto puede explicarse, porque el Hexano quedaba suspendido en la placa de petri actuando como agente de dispersión del hongo, por lo que logró alcanzar un área mayor a la presentada por en el hongo sin ningún tratamiento.

Además de determinar si existió una reducción en el área de crecimiento del hongo, se determinó el número de esporas que existían por 0,1 ml de solución.

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 7, se puede inferir que todos los extractos de concentración 5 gr/l presentaron un efecto inhibitorio en relación número de esporas en comparación al control de las muestras a las que le fueron agregadas 2 ml de Hexano. Es importante destacar, que la tendencia del extracto Cebolla- Hexano de concentración 5 gr/l es disminuir el número de esporas, por tanto, se puede inferir, que tiene un efecto inhibitorio en la esporulación del hongo. El extracto Ajo- Hexano presenta un efecto similar

al obtenido en el caso de la Cebolla- Hexano, pero en la medición a las 192 horas, se observa una tendencia a incrementar el número de esporas. Esto se puede explicar debido, que su efecto no es prolongado, y por tanto medianamente efectivo. Sin embargo, en el caso del Neem- Hexano, la tendencia es de incrementar el número de esporas, por tanto no se considera al extracto Neem - Hexano, un tratamiento efectivo en esta concentración.

En conclusión, el extracto Cebolla - Hexano presenta una mejor reducción en el número de esporas, al igual que el extracto Ajo - Hexano. Estas similitudes pueden deberse a que la Cebolla y el Ajo presentan composición química similar.

Los resultados mostrados en la Figura 8, indican que los extractos en concentración 10 gr/l presentan un efecto inhibitorio en relación al número de esporas presentes en el control Hexano agregado sobre el hongo *Mycosphaerella musicola*.

En relación al extracto Neem - Hexano se observa una clara tendencia a aumentar el número de esporas, sin embargo, los valores presentados por este tratamiento son menores al control. Por tanto, se considera un inhibidor de baja eficiencia en este caso. En relación al extracto Cebolla - Hexano y Ajo - Hexano, se puede señalar que estos tratamientos presentan un efecto similar en la reducción del número de esporas.

En la Figura 9 se evidencia que todos los extractos con concentración de 20gr/l tuvieron un efecto inhibitorio en relación al número de esporas con

respecto al control de Hexano agregado sobre el hongo. Sin embargo, se debe destacar, que el mejor efecto inhibitorio lo presentó el extracto Cebolla - Hexano, debido a que aquí se observa una mayor reducción en el número de esporas en las últimas mediciones, las cuales son significativamente diferentes al control.

En el caso del Ajo - Hexano (Figura 9) se observan valores inferiores a los del control en la tercera medición. Montes- Belmont et al en el año 1997, señala que extractos de vegetales tales como el Ajo y la Cebolla reducían la germinación de los esporangios del Hongo *Phytophthora melonis*.

Es importante destacar que en la cuarta medición se observa un incremento en el número de esporas, por lo cual podemos decir que en este caso su efecto inhibitorio no es prolongado.

En relación al Neem - Hexano (Figura 9), los valores obtenidos son mayores a los del tratamiento Ajo - Hexano y Cebolla - Hexano y menores a los obtenidos en relación al control. Estos resultados resaltan la necesidad de realizar experiencias futuras, a través de un período de tiempo más largo, con el objetivo de determinar si el efecto de este extracto tiene una acción retardada, ya que es entre 144 y 192 horas donde comienza a observarse un mayor efecto del tratamiento.

Es importante destacar, que aunque todos los extractos vegetales demostraron tener un efecto fungistáticos se observó una mayor disminución en el número de esporas en los extractos cuya concentración es de 20 gr/l, ya

que en los mismos se encuentra una mayor cantidad de los principios activos que pudieran actuar sobre el hongo (Montes Belmont, 1997).

### **a.2.3.) Extractos agregados al medio de cultivo**

**a.2.3.1) Obtenidos en base a Agua:** para realizar las comparaciones del efecto causado por estos tratamientos, se tomó como control la curva de crecimiento del hongo ya que el medio de cultivo fue elaborado con Agua. El grupo control y los experimentales se sometieron a las mismas condiciones ambientales. La incorporación de los extractos Ajo - Agua, Cebolla - Agua y Neem - Agua, surte un efecto inhibitorio significativo en el crecimiento del patógeno *Mycosphaerella musicola*, como lo demuestran los resultados obtenidos en relación al control. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos.

El extracto Cebolla - Agua (Tabla XI) en todas las concentraciones tuvo resultados exitosos en cuanto a la reducción del área de crecimiento del hongo en comparación con el grupo control. Los resultados obtenidos indican que el área de crecimiento del hongo se fue reduciendo en relación al control, a medida que aumentaba la concentración del extracto. Resultados similares fueron obtenidos por Montes Belmont (1997) al trabajar con *Aspergillus flavus* Link en Maíz.

Los mejores resultados se obtuvieron con las concentración de 20 gr/l para el extracto Cebolla- Agua, ya que el crecimiento registrado por el hongo en todas las medidas (Tabla XI) estuvo por debajo de los valores del control. Adicionalmente, dicho extracto presenta un efecto residual significativo, ya que el área del hongo para el extracto Cebolla- Agua fue menor en todas las medidas realizadas, destacando que a las 192 horas fue de 1,2064 cm<sup>2</sup> para el extracto en comparación con 10,3147 cm<sup>2</sup> que fue el valor registrado por el control. Esta diferencia es altamente significativa, por lo cual este extracto demostró ser una excelente alternativa para el control biológico del patógeno en estudio.

Otra alternativa que mostró excelentes resultados fue el extracto Neem - Agua (Tabla XIII), ya que hubo una disminución del área del hongo a través del tiempo. Los resultados obtenidos con dicho extracto, fueron similares a los registrados para el extracto Cebolla - Agua (Tabla XI). Cabe destacar, que en estas muestras se presentó la misma tendencia en relación a la concentración de los extractos. A concentración de 20 gr/l el área del hongo registrada es de 1,4872 cm<sup>2</sup>, lo cual es significativamente bajo en comparación con el control que reportó un área de 10,3147 cm<sup>2</sup> a las 192 horas. Esto permite señalar que el extracto Neem - Agua (Tabla XIII) presenta un efecto residual, al igual que el extracto Cebolla - Agua (Tabla XI).

En relación al extracto Ajo - Agua (Tabla IX), se registra una tendencia similar a los tratamientos anteriores, es decir, a mayores concentraciones

menor área. Sin embargo, aunque el extracto Ajo - Agua, no presenta una disminución tan marcada como en los extractos mencionados anteriormente, presentó un efecto residual puesto que a las 192 horas presentaba un área de 2,1314 cm<sup>2</sup>, valor significativamente menor, en comparación con el control que presentó un área de 10,3147 cm<sup>2</sup>, por tal razón, el extracto Ajo - Agua, también puede ser señalado como un buen agente de control para este patógeno. Montes Belmont (1997) señala que el Ajo actúa como un buen fungistático al trabajar con 106 especies de plantas sobre la germinación y el desarrollo del micelio de *Aspergillus flavus* Link en maíz.

En cuanto al efecto ejercido por los extractos en relación al número de esporas se destaca que todos los extractos en la concentración de 5 gr/l (Figura 10) no mostraron reducción en el número de esporas a las 48 horas de haber sido sembrado el hongo, por el contrario, en todos los tratamientos se observó un aumento en relación al control. A las 96 horas el extracto de Cebolla - Agua presentó una disminución en el número de esporas con respecto al control, seguido por el extracto Ajo- Agua , y el extracto Neem - Agua, que tuvieron efectos similares. Es importante destacar que los extractos Cebolla - Agua y Ajo-Agua tuvieron un efecto inhibitorio hasta las 192 horas de haber sido sembrado el hongo, mientras que el extracto Neem - Agua dejó de ejercer ese efecto a partir de las 144 horas de haber sido sembrado el hongo.

Se puede observar que en los extractos de concentración 10 gr/l (Figura11) durante las primeras 48 horas de haber sido sembrado el hongo, no

se observó una disminución en el número de esporas, para ninguno de los tratamientos. A las 96 horas de haber sido sembrado el hongo, se observa una reducción en el número de esporas para los extractos Neem - Agua y Cebolla - Agua. Por otro lado, se debe destacar que la reducción de esporas registrada al utilizar el extracto Ajo - Agua es mayor a la reducción en el número de esporas señaladas para los extractos Neem - Agua y Cebolla - Agua. Sin embargo, los valores en relación al número de esporas registradas por todos los extractos, son menores al control. Es importante señalar que el extracto Neem - Agua y Cebolla - Agua tienen un efecto similar hasta las 192 horas de haber sido sembrado el hongo.

En cuanto a los resultados obtenidos para los extractos de concentración 20 gr/l (Figura 12), se puede destacar que todos los extractos ejercieron un efecto inhibitorio en relación al número de esporas con respecto al control, destacando que la mayor reducción en el número de esporas, se obtuvo con el extracto de Ajo - Agua, seguida por el de Cebolla - Agua y por último el extracto Neem - Agua.

Es importante señalar, que un tratamiento que disminuya el número de esporas producidas por un hongo, permite una mayor eficacia en el control de la enfermedad, por que, aunque los hongos pueden reproducirse a partir de estructuras asimiladoras vegetativas o de reposo (células individuales, fragmentos de micelio, esclerocios, etc.), la forma más común es mediante la formación de esporas. Éstas son unidades reproductivas especializadas,

compuestas por una o varias células que se producen asexualmente o como resultado de un proceso sexual, y cumplen diversas funciones, multiplicación del hongo, diseminación, resistencia a condiciones adversas, variabilidad genética. (Bello, 1996)

En general, la reproducción sexual de los hongos está asociada con condiciones ambientales adversas, tales como temperaturas desfavorables o agotamiento de Agua y nutrientes (Bello, 1996), esta afirmación podría explicar que en algunos de los tratamientos con los distintos extractos vegetales, éstos resultaban eficaces en el control del área de crecimiento, pero su efecto sobre el número de esporas no era significativo al ser comparado con el número de esporas del grupo control, de ello se puede inferir, que un mecanismo de defensa del hongo es aumentar la producción de esporas como mecanismo de defensa ante la agresión del extracto vegetal, a manera de poder perpetuar su especie.

En definitiva, al estudiar los diferentes resultados, se puede decir que todos los extractos presentaron una mayor eficiencia a la mayor concentración con la que se trabajo (20 gr/l). Sin embargo, no se puede afirmar que son las altas concentraciones las más eficientes al trabajar con control biológico, ya que esto va a depender de la especie con que se este trabajando y las condiciones de la experiencia. Específicamente, en esta investigación no se probaron concentraciones mayores a 20 gr/l, por lo cual no es posible determinar hasta



que punto una concentración por encima de este valor podría ser tóxica para la especie vegetal que es afectada por el patógeno.

**a.2.3.2) Extractos obtenidos en base a Hexano:** este experimento se realizó con la finalidad de evaluar diferentes extractos vegetales, incluidos en el medio de cultivo, sobre el crecimiento y la esporulación del hongo *Mycosphaerella musicola*, agregando los extractos realizados con material vegetal de Cebolla, Ajo y Neem, disueltos en Hexano, en concentraciones de 5, 10 y 20 gr/l al medio de cultivo, donde posteriormente, será sembrado el hongo.

Rodríguez, H., et al, (1997), realizaron investigaciones utilizando este método, evaluando el efecto de extractos vegetales agregados al medio de cultivo PDA sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*,

El control para este ensayo se realizó agregando 2 ml de Hexano puro por cada 25 ml de medio de cultivo PDA.

Los resultados obtenidos, demostraron que hay una disminución progresiva del área de crecimiento del patógeno a medida que aumenta la concentración de los extractos Neem - Hexano (Tabla XIV), Cebolla - Hexano (Tabla XII) y Ajo - Hexano (Tabla X).

La inhibición del crecimiento del hongo en relación al área, con respecto al grupo control, para el extracto Neem - Hexano se puede observar en la Tabla XIV, donde se presenta una disminución progresiva, a medida que aumenta la concentración de este extracto, aunque los resultados obtenidos

para las diferentes concentraciones utilizadas no son significativamente diferentes. Sin embargo, la mejor inhibición se presenta con el tratamiento en concentración de 20 gr/l (Tabla XVI), ya que en comparación con el grupo control fue significativamente menor, en especial el valor registrado a las 144 horas, la cual en el extracto de Neem - Hexano fue de 1,8906 cm<sup>2</sup> mientras que en el control la misma medida es de 10,2542 cm<sup>2</sup>. Estos resultados permiten afirmar que el extracto Neem - Hexano afecta el crecimiento del hongo disminuyendo su área la cual presenta una reducción significativa en las medidas a las 48, 96 y 144 horas. Sin embargo, a las 192 horas, el hongo aumenta de área drásticamente de 1,8906 cm<sup>2</sup> a 7,0897 cm<sup>2</sup> (Tabla XIV), mientras que en el control a las 192 horas se registró un área similar al valor anterior. Sin embargo, el área registrada para el extracto Neem - Hexano, sigue estando por debajo de los valores registrados para el control.

En el crecimiento reportado por el hongo al ser tratado con el extracto Cebolla - Hexano (Tabla XII), se demuestra una vez más, que a una mayor concentración de los extractos hay una mayor incidencia en el crecimiento del hongo. Hernández et al, (2001), señala en los resultados de su investigación, que los extractos de Neem en las dosis más altas, inhibieron de manera más eficaz el crecimiento micelial y la esporulación de 5 géneros de hongos fitopatógenos.

Cabe destacar que no se utilizaron concentraciones mayores a las de 20 gr/l en esta investigación, lo cual sería beneficioso ensayar en futuras

investigaciones. En este caso, la tendencia fue disminuir el área a medida que aumentaba la concentración en las mediciones realizadas a las 48 horas y 96 horas en la concentración de 20 gr/l.

Los resultados obtenidos no es significativamente diferentes a los reportados para el extracto Neem - Hexano, pero si lo son en comparación con los reportado para el control. Sin embargo, a las 144 horas hay una reducción en el área para el extracto Cebolla - Hexano de concentración 20 gr/l (Tabla XII) de  $3,3169 \text{ cm}^2$ , lo cual es significativamente menor al área del control que presenta un valor de  $10,2542 \text{ cm}^2$ .

La tendencia de los resultados al aplicar el extracto Ajo - Hexano (Tabla X), es similar a lo que sucede con los extractos señalados anteriormente, sin embargo, a las 192 horas, aumenta bruscamente su crecimiento, de lo que se puede inferir que para ese momento ha cesado el efecto fungistático de los compuestos activos presentes en la Ajo.

Por otro lado, la tendencia registrada en el crecimiento del hongo con el extracto Ajo- Hexano (Tabla X) fue similar que la registrada por el extracto Neem - Hexano (Tabla XIV) a las 48 y 96 horas. De ello se infiere, que el efecto de ambos extractos en ese período de tiempo, es eficiente en el control del hongo.

Sin embargo, a las 144 horas aumentan un poco los valores registrados llegando a  $4,4751 \text{ cm}^2$  en el extracto Ajo - Hexano (Tabla X) y  $1,8906 \text{ cm}^2$  para el extracto Neem - Hexano (Tabla XIV), que al comparar con el valor

obtenido en el control que es de  $10,2542 \text{ cm}^2$ , presenta una reducción significativa del área la cual no es tan marcada como para el extracto Neem - Hexano (Tabla XIV) para ese momento.

Posteriormente, a las 196 horas los resultados obtenidos para el extracto Ajo - Hexano en la concentración  $20 \text{ gr/l}$  (Tabla X) indican un aumento sustancial en el área del hongo a  $10,2263 \text{ cm}^2$ , alcanzando un valor similar al valor del control en ese mismo período, la cual fue de  $10,8910 \text{ cm}^2$ , lo que puede indicar que la acción fungistática del extracto ya había cesado, debido a que los metabolitos no tienen efecto residual, como lo fue en el caso del tratamiento con extracto Neem - Hexano.

Los compuestos activos presentes en el Neem resultaron ser más eficaces para disminuir el crecimiento del hongo y con un efecto más duradero, en comparación a los extractos de Ajo - Hexano y Cebolla - Hexano, aunque el efecto de éstos extractos fue significativo con respecto al control del crecimiento del a las 48, 96 y 144 horas.

El control realizado con Hexano agregado al medio de cultivo, afectó de manera significativa el crecimiento del hongo en las medidas tomadas a las 48 y 96 horas, con respecto a los datos registrados en la curva patrón del crecimiento del hongo.

Los valores registrados para la curva de crecimiento del patógeno (Figura 2), fueron de  $0,8484 \text{ cm}^2$  a las 48 horas y de  $6,4462 \text{ cm}^2$  a las 96 horas, mientras que para el control Hexano, fue de  $0,2558 \text{ cm}^2$  a las 48 horas y de

2,0417 cm<sup>2</sup> a las 96 horas, lo que representa una diferencia significativa. De ello se puede inferir, que al principio del tratamiento, el Hexano tuvo un efecto tóxico sobre el crecimiento del hongo. Posteriormente, este efecto se disipó hasta el punto en que el área del control Hexano llegó a ser similar a la registrado, en la curva de crecimiento del hongo a las 144 horas, presentando valores de 10,2542 cm<sup>2</sup> y 10,5327 cm<sup>2</sup> respectivamente.

En relación al efecto de los extractos realizados con Hexano agregado al medio de cultivo se pudo determinar que estos afectaron el proceso de esporulación del hongo a las 48 y 96 horas.

De esta manera, en los diferentes extractos a la concentración 5 gr/l (Figura 13) a las 48 horas de la siembra, se observó una disminución en el número de esporas con respecto al control, donde los valores más bajos se presentaron en el extracto Cebolla - Hexano. Para el extracto Neem - Hexano y el extracto Ajo - Hexano, se observaron valores similares en relación al control en esta primera medida. Es importante destacar, que a las 96 horas de haber efectuado la siembra, el patrón de inhibición en los diferentes extractos se modifica, ya que el extracto Ajo - Hexano presenta un mayor efecto inhibitorio en el número de esporas con respecto al control de Hexano agregado al medio de cultivo, mientras que los extractos Cebolla - Hexano y Neem - Hexano ocasionan una menor reducción en el número de esporas, con respecto al control de Hexano agregado al medio de cultivo (Figura 13). A partir de las 144 horas de haber sido sembrado el hongo, los extractos no tuvieron ningún efecto

inhibitorio sobre el número de esporas, por tal razón, se puede inferir que los principios activos no tienen un efecto residual en este caso.

En los extractos de concentración 10 gr/l (Figura 14), se pudo observar una disminución en el número de esporas para todos los extractos vegetales con los que se trabajó a las 48 y 96 horas con respecto al control, donde el menor número de esporas fue registrado para el extracto Ajo - Hexano. Los resultados indican que a partir de las 144 horas de haber sido sembrado el hongo, los extractos pierden su efecto inhibitorio en relación al número de esporas, exceptuando el de Neem - Hexano que aunque Presentó un incremento en el número de esporas, éste no fue significativo con respecto al control. Sin embargo, a las 192 horas, todos los tratamientos con los diferentes extractos presentan valores superiores al control.

Los resultados obtenidos para los diferentes extractos con una concentración de 20 gr/l (Figura 15), indican que a las 48 horas de haber sido sembrado el hongo, el extracto de Cebolla - Hexano presenta un menor número de esporas seguido por los extracto de Neem - Hexano y Ajo - Hexano respectivamente, con respecto al control de Hexano agregado al medio de cultivo. A las 96 horas de haber sido efectuado la siembra del hongo, el extracto de Cebolla - Hexano sigue presentando una disminución en relación al número de esporas, aunque esta reducción no es tan marcada como la reportada a las 48 horas de la siembra, Luego es seguido por los extractos de Ajo - Hexano y Neem - Hexano, con respecto al control de Hexano agregado al medio de

cultivo. Sin embargo, a las 144 y 192 horas de haber efectuado la siembra del hongo, los extractos dejan de presentar un efecto inhibitorio en la esporulación del hongo, lo cual se evidencia en un incremento en el número de esporas, con respecto al control.

**a.2.4) Evaluaciones estadísticas:** Se obtuvieron las desviaciones estándar y medias de todos los valores obtenidos en cada extracto. A través de una prueba de bondad de ajuste se determinó que todos los resultados obtenidos se encuentran dentro de una distribución normalidad.

Se realizó un análisis de varianzas simples utilizando los valores obtenidos en el número de espora y el área de crecimiento del hongo *Mycosphaerella musicola*, sometido los efectos de los diversos extractos en análisis de varianzas simples realizados en esporas, arrojó que los extractos presentaban distintos efectos sobre la esporulación y el crecimiento en área del patógeno. Por tal razón, se confirmó la hipótesis alternativa puesta a prueba, en donde por lo menos un par de tratamiento tenía un efecto diferente sobre el hongo (Anexos).

**a.2.5) Análisis morfológicos del hongo *Mycosphaerella musicola* a través del Microscopio Electrónico de Barrido bajo el efecto de diferentes extractos vegetales**

Con la finalidad de visualizar características del hongo *Mycosphaerella musicola*, y los cambios que se pudieran haber ocasionado a nivel de ultra estructura, por la acción de los diversos extractos vegetales. Para ello, se realizaron observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), con este objetivo se realizaron muestras experimentales, las cuales estaban tratadas con extractos vegetales agregados sobre el patógeno, éstos extractos vegetales fueron preparados en base Agua y en base Hexano, con material vegetal seco de Ajo, Cebolla y Neem en una concentración de 20 gr/l.

Los registros fotográficos hechos al Microscopio Electrónico de Barrido, permitieron observar características morfológicas del patógeno, bajo el efecto de los extractos vegetales.

Los registros fotográficos de las muestras tratadas con los extractos en base Agua, agregados en el medio de cultivo, reflejan que el extracto Ajo – Agua (Figuras 18 – 19), surtió un efecto a nivel micelial, debido a que presenta un micelio deteriorado y esporas alargadas en comparación con el grupo control (Figuras 16 -17), mientras que en los registros fotográficos, tomados a las muestras tratadas con los extractos Neem - Agua (Figuras 20 – 21), y Cebolla



- Agua (Figuras 22 - 23), agregados en el medio de cultivo, no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 16 - 17).

En la muestra tratadas con los extractos realizados en base Agua y agregados sobre el hongo, se visualiza un inminente daño micelial en las muestras tratadas con el extracto Ajo - Agua (Figura 24), en comparación con el grupo control (Figuras 16 -17), a diferencia de los resultados obtenidos en los tratamientos realizados para los extractos Cebolla - Agua (Figuras 25 - 26) y Neem - Agua (Figuras 27), cuyos registros fotográficos no evidenciaron diferencias en relación al grupo control (Figuras 16 -17).

Los registros fotográficos realizados a las muestras tratadas con los extractos vegetales en base Hexano, agregados en el medio de cultivo donde, posteriormente se sembraron los hongos, permiten visualizar que en las muestras del patógeno tratadas con el extracto Neem - Hexano (Figuras 28 - 29) y con el extracto Cebolla - Hexano (Figuras 30 - 31), se observa un daño en la estructura del patógeno a nivel micelial, pero no a nivel de esporas en relación con el grupo control (Figuras 16 -17).

Por otro lado, los resultados obtenidos con el extracto Ajo - Hexano (Figuras 32 - 33) indican que también existe un daño en el patógeno, ya que presentan cambios morfológicos en el micelio en contraste con micelios normales, los cuales se pueden observar en el grupo control (Figuras 16 - 17).

En el caso de los extractos en base Hexano agregados sobre el hongo, se pudo observar que la muestra tratada con el extracto Ajo - Hexano (Figuras

34 - 35), presentaba un daño a nivel micelial, al compararlo con el grupo control (Figuras 16 -17). En cambio, las imágenes reportadas en las muestras tratadas con extracto Neem - Hexano (Figuras 36 ) y con extracto cebolla -- Hexano (Figuras 36 ), muestran un desarrollo normal, puesto que en el campo observado en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), no se observan diferencias en el hongo al compararlo con el grupo control (Figuras 15 - 16).

Es importante destacar, que el estudio realizado al Microscopio Electrónico de Barrido, fue puntual, por tanto, no permite realizar afirmaciones en cuanto al efecto de los extractos sobre el hongo a través del tratamiento, ya que dicho estudio no fue sistemático. Adicionalmente, el único registro se realizó al final del proceso experimental.

### **a.3) Evaluaciones "in vivo":**

Las pruebas "in vivo" fueron realizadas con 12 plantas de banano de la variedad Pineo Gigante (AAA). Las hojas de dichas plantas fueron enumeradas y en cada una de ellas se circunscribió un área de 144 cm<sup>2</sup>. Esta área fue asperjada con 10 ml de cada uno de los extractos, de concentración 20 gr/l., debido a que esta fue la mejor concentración obtenida en las pruebas "in vitro".

Las plantas antes de la aplicación del tratamiento tenían la enfermedad en estadio I y II respectivamente ( Tabla I).

La tabla presenta las características mostradas por el hongo, luego de haberse realizado las aspersiones con los distintos extractos, en las distintas evaluaciones registradas durante lapsos de tiempo de 48 horas cada uno.

En la hoja de la planta donde se asperjó Hexano solo (control), se observó una necrosis en la zona basal y central de la hoja, desde la primera aplicación lo cual indica que el Hexano es un compuesto tóxico para estas plantas.

De igual manera, todos los extractos que fueron extraídos con Hexano tuvieron un efecto similar para las plantas en estudio. Por tal razón, no se observaron cambios en el desarrollo de la enfermedad, lo que impidió determinar la eficacia de los extractos obtenidos a partir de este solvente. Por el contrario, se observó que existieron daños mecánicos y necrosis en todas las hojas de las plantas donde se realizaron las aplicaciones de esos extractos.

En las hojas de las plantas donde se asperjó Agua, se presentaron alteraciones en la sintomatología de la enfermedad, pasando del estadio II al III, de manchas amarillas a pardas. En este caso, el Agua asperjada puede funcionar como un agente mecánico para la dispersión de las esporas a las plantas circundantes (Bello, 1996).

Los extractos que fueron obtenidos con Agua, no tuvieron ningún efecto tóxico sobre las hojas de las plantas donde se aplicaron. Sin embargo, es importante destacar que presentaron diversos efectos sobre la enfermedad en las hojas en las cuales fueron aplicados. En el caso del extracto Cebolla -

Agua, se puede indicar que no ejerce un efecto significativo sobre el hongo que causa la enfermedad, debido a que no ocurrió ningún retardo en la evolución de síntomas más avanzados de la enfermedad, por el contrario se observó en las plantas una sintomatología de la enfermedad, característica de los estadios III y IV respectivamente .

En relación al extracto Ajo - Agua, se observó un retardo en el avance de la enfermedad durante las primeras dos aplicaciones del asperjado. La enfermedad se mantuvo en el estadio II, pero luego de la tercera aplicación, se observó un avance de la enfermedad al próximo estadio, razón por la cual extracto Ajo- Agua no demuestra tener una excelente eficiencia sobre el hongo que causa la enfermedad denominada Sigatoka Amarilla.

Al aplicar el extracto Neem - Agua a las hojas de las plantas con la enfermedad, se observó un retardo en el desarrollo de la misma durante las 3 aplicaciones, manteniéndose en los estadios I y II, lo cual puede indicar que el extracto Neem - Agua inhibe la acción del hongo, durante su ciclo de aspersiones.

Los resultados discutidos anteriormente señalan que fue el extracto Neem - Agua el que demostró tener un efecto fungistático, deteniendo el desarrollo del hongo, lo cual ha sido señalado en otras investigaciones (Hernández et al, 2001; Okios, 2000).

**TABLAS**

TABLA I. CARACTERÍSTICAS DE LOS VEGETALES EN EXPERIMENTACIÓN

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	PARTE UTILIZADA	PRINCIPIO ACTIVO
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Liliaceae	Bulbo	Compuesto azufrado (alil disulfuro)
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Liliaceae	Bulbo	Compuesto azufrado (n propil – disulfuro)
Neem	<i>Azadirachta indica</i>	Meliáceae	Hojas y semillas	Triterpenoide

TABLA II. ESTADIOS DE LA ENFERMEDAD SIGATOKA AMARILLA

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS
I	- Se observan manchas de 1 mm, la decoloración de las hojas es leve
II	- Se observan manchas de varios mm de longitud, la decoloración de las hojas es más intenso
III	- Se observan nuevas manchas y algunas presentan forma oval y la coloración es levemente parda, presenta contornos muy mal definidos
IV	- Paraliza el crecimiento del micelio del hongo - Aparición de un aro amarillo envolviendo la mancha - Se inicia la esporulación del patógeno
V	- La mancha es de forma oval y alargada, con unos 12 a 15 mm de ancho 2 a 5 mm de largo - Las hojas toman coloración parda debido a la unión de las distintas manchas que han ido apareciendo en el desarrollo de la enfermedad en el tejido vegetal.

**TABLA III. CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPORAS ASEXUALES Y SEXUALES DEL HONGO**  
*Mycosphaerella musicola.*

<b>CONÍDIOS</b>		<b>ASCÓSPORAS</b>	
-	Producidos diariamente en presencia de llovizna.	-	Producido periódicamente en presencia de lluvia
-	Producidos en ausencia de la lluvia	-	Liberado preferiblemente en época de lluvia
-	Liberado en época de lluvia	-	Diseminado por el viento
-	Disemina por el agua	-	Sobrevive 8 semanas en el peritecio
-	Sobrevive 3-4 semanas sobre la hoja.	-	Temperatura óptima más altas
-	Temperatura óptima de germinación y crecimiento de tubo germinativo más baja.	-	Poca o ninguna infección en período seco
-	Poder infección período seco		



**TABLA IV. EFECTO DEL EXTRACTO DE AJO – AGUA AGREGADO SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola* A DIFERENTES ETAPAS DE SU DESARROLLO**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	3,3866 ± 0,6119	10,1496 ± 0,6863	54,4199 ± 0,2873
<b>5</b>	2,7923 ± 0,3690	6,7096 ± 0,3286	8,8354 ± 0,2573
<b>10</b>	3,7365 ± 0,5019	8,4721 ± 0,1277	8,8140 ± 0,1359
<b>20</b>	4,1209 ± 0,6358	5,2968 ± 0,1260	12,4366 ± 0,2065

**TABLA V. EFECTO DEL EXTRACTO DE AJO - HEXANO AGREGADO SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola* A DIFERENTES ETAPAS DE SU DESARROLLO**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	2,5378 ± 0,4204	7,3832 ± 0,2039	7,6128 ± 0,6649
<b>5</b>	3,9810 ± 0,3559	6,7293 ± 0,3515	8,3860 ± 0,5031
<b>10</b>	3,8252 ± 0,3763	6,2050 ± 0,5461	7,3092 ± 0,5930
<b>20</b>	3,6295 ± 0,3992	5,4523 ± 0,5237	6,6107 ± 0,4281

**TABLA VI. EFECTO DEL EXTRACTO CEBOLLA - AGUA AGREGADO SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola* A DIFERENTES ETAPAS DE SU DESARROLLO**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	3,3866 ± 0,6119	10,1496 ± 0,6863	54,4199 ± 0,2873
<b>5</b>	2,8776 ± 0,4115	8,4843 ± 0,3353	12,6404 ± 0,3996
<b>10</b>	3,3939 ± 0,3709	5,7935 ± 0,3116	13,304 ± 0,3300
<b>20</b>	2,7300 ± 0,4869	4,0491 ± 0,6449	6,8821 ± 0,8928

**TABLA VII. EFECTO DEL EXTRACTO CEBOLLA - HEXANO AGREGADO SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola* A DIFERENTES ETAPAS DE SU DESARROLLO**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	2,5378 ± 0,4204	7,3832 ± 0,2039	7,6128 ± 0,6649
<b>5</b>	4,1134 ± 0,3879	7,0920 ± 0,2634	8,2726 ± 0,4340
<b>10</b>	4,2057 ± 0,3357	6,8053 ± 0,2566	7,6011 ± 0,3975
<b>20</b>	4,1468 ± 0,5484	6,1830 ± 0,5089	7,9318 ± 0,4658

**TABLA VIII. EFECTO DEL EXTRACTO NEEM - AGUA AGREGADO SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola* A DIFERENTES ETAPAS DE SU DESARROLLO**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	3,3866 ± 0,6119	10,1496 ± 0,6863	54,4199 ± 0,2873
<b>5</b>	6,1538 ± 0,0872	9,1182 ± 0,6056	14,1648 ± 0,5851
<b>10</b>	1,8789 ± 0,3266	7,9872 ± 0,6081	11,6436 ± 0,8200
<b>20</b>	3,8686 ± 0,5759	7,2549 ± 0,6357	10,2085 ± 0,2172

**TABLA IX. EFECTO DEL EXTRACTO NEEM - HEXANO AGREGADO SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella MUSICOLA* A DIFERENTES ETAPAS DE SU DESARROLLO**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	2,5378 ± 0,4204	7,3832 ± 0,2039	7,6128 ± 0,6649
<b>5</b>	4,0160 ± 0,1315	7,8361 ± 0,0470	7,9371 ± 0,1080
<b>10</b>	3,9782 ± 0,2148	6,5220 ± 0,0351	6,7719 ± 0,3871
<b>20</b>	3,5039 ± 0,3992	5,2940 ± 0,5143	5,8487 ± 0,6851

**TABLA X. EFECTO DE EXTRACTO DE AJO - AGUA AGREGADO AL MEDIO DE CULTIVO EN EL HONGO *Mycosphaerella musicola* A DIFERENTES ETAPAS DE SU DESARROLLO**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>48 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	0,8484 ± 0,1808	6,4462 ± 0,7173	10,5327 ± 0,3974	10,3147 ± 0,3739
<b>5</b>	0,4949 ± 0,0073	3,4276 ± 0,6742	4,4615 ± 0,5147	4,7584 ± 0,3662
<b>10</b>	0,1449 ± 0,0121	0,9801 ± 0,2712	2,3222 ± 0,2029	2,3195 ± 0,2007
<b>20</b>	0,0193 ± 0,0974	0,9218 ± 0,1481	2,033 ± 0,2626	2,1314 ± 0,3415

**TABLA XI. EFECTO DE EXTRACTO DE AJO – HEXANO AGREGADO AL MEDIO DE CULTIVO EN EL HONGO *Mycosphaerella musicola* a diferentes etapas de su desarrollo**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>48 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	0,2558 ± 0,067	2,0417 ± 0,2556	10,2542 ± 0,4162	10,8910 ± 0,5099
<b>5</b>	0,0619 ± 0,0097	1,5995 ± 0,0843	4,9696 ± 0,7055	10,6571 ± 0,5053
<b>10</b>	0,0630 ± 0,0091	1,5199 ± 0,0706	4,7979 ± 0,7584	10,6631 ± 0,3929
<b>20</b>	0,0540 ± 0,0097	1,6045 ± 0,4749	4,4751 ± 0,7105	10,2263 ± 0,4013



**TABLA XII. EFECTO DE EXTRACTO DE CEBOLLA – AGUA AGREGADO AL MEDIO DE CULTIVO EN EL HONGO *Mycosphaerella musicola* a diferentes etapas de su desarrollo**

CONCENTRACIÓN (gr./l)	48 horas (cm <sup>2</sup> )	96 horas (cm <sup>2</sup> )	144 horas (cm <sup>2</sup> )	192 horas (cm <sup>2</sup> )
CONTROL	0,8484 ± 0,1808	6,4462 ± 0,7173	10,5327 ± 0,3974	10,3147 ± 0,3739
5	0,3808 ± 0,0430	0,7251 ± 1,0476	6,6253 ± 0,0212	8,4768 ± 0,0531
10	0,6922 ± 0,0153	0,6974 ± 0,0270	2,9468 ± 0,2809	3,6258 ± 0,1864
20	0,3051 ± 0,0474	0,6559 ± 0,1808	0,8493 ± 0,1521	1,2064 ± 0,1974

**TABLA XIII .EFECTO DE EXTRACTO DE CEBOLLA – HEXANO AGREGADO AL MEDIO DE CULTIVO EN EL HONGO *Mycosphaerella musicola* A DIFERENTES ETAPAS DE SU DESARROLLO**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>48 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	0,2558 ± 0,067	2,0417 ± 0,2556	10,2542 ± 0,4162	10,8910 ± 0,5099
<b>5</b>	0,1424 ± 0,0115	0,1692 ± 0,0096	4,5446 ± 0,3740	8,7396 ± 0,6011
<b>10</b>	0,1270 ± 0,0090	0,1443 ± 0,0051	3,8559 ± 0,1191	8,7676 ± 0,5624
<b>20</b>	0,0962 ± 0,0145	1,2634 ± 0,7364	3,3169 ± 0,3611	8,4180 ± 0,3897

**TABLA XIV. EFECTO DE EXTRACTO DE NEEM – AGUA AGREGADO AL MEDIO DE CULTIVO EN EL HONGO *Mycosphaerella musicola* a diferentes etapas de su desarrollo**

<b>CONCENTRACIÓN (gr/l)</b>	<b>48 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	0,8484 ± 0,1808	6,4462 ± 0,7173	10,5327 ± 0,3974	10,3147 ± 0,3739
<b>5</b>	0,3904 ± 0,0641	2,5733 ± 0,1480	4,0192 ± 0,7654	6,5102 ± 0,3967
<b>10</b>	0,6846 ± 0,0301	0,8398 ± 0,3283	2,9380 ± 0,2804	3,5558 ± 0,2273
<b>20</b>	0,2801 ± 0,0238	0,9693 ± 0,0226	1,268 ± 0,6965	1,4872 ± 0,4658

**TABLA XV. EFECTO DE EXTRACTO DE NEEM – HEXANO AGREGADO AL MEDIO DE CULTIVO EN EL HONGO *Mycosphaerella musicola* a diferentes etapas de su desarrollo**

<b>CONCENTRACIÓN (gr /l)</b>	<b>48 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>96 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>144 horas (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>192 horas (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>CONTROL</b>	0,2558 ± 0,067	2,0417 ± 0,2556	10,2542 ± 0,4162	10,8910 ± 0,5099
<b>5</b>	0,1129 ± 0,0078	0,5611 ± 0,0668	2,1388 ± 0,1083	8,0235 ± 0,0447
<b>10</b>	0,1058 ± 0,0416	1,2821 ± 0,2672	2,0332 ± 0,5378	7,7512 ± 0,3871
<b>20</b>	0,0988 ± 0,0059	0,1390 ± 1,4252	1,8906 ± 0,1039	7,0897 ± 0,6381

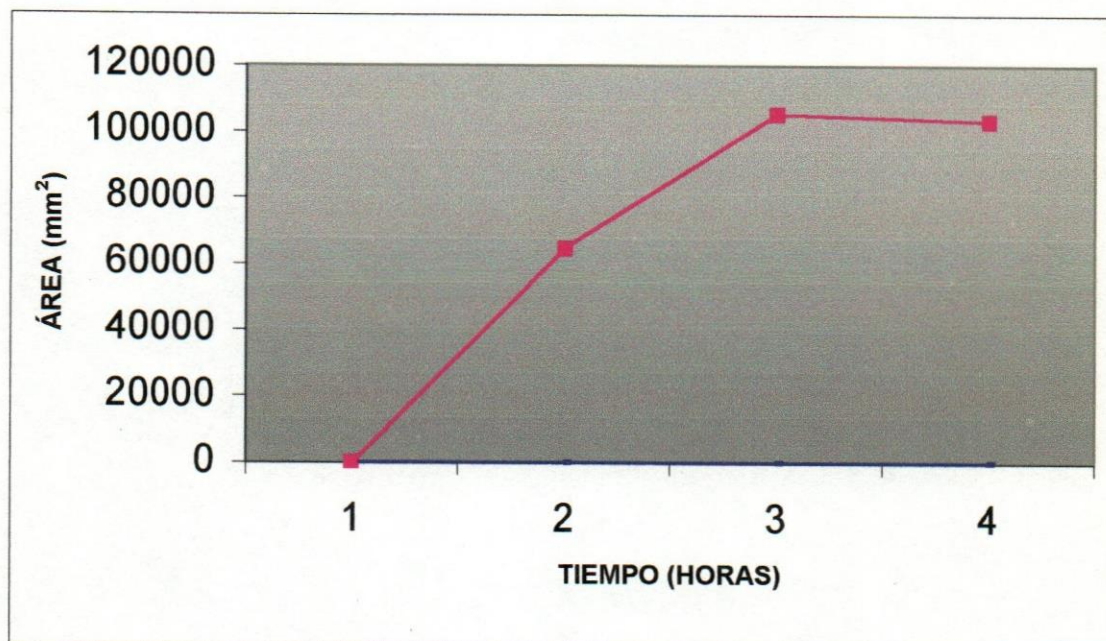
**TABLA XVI. EVALUACIONES "IN VIVO" DE DIFERENTES EXTRACTOS VEGETALES SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola*.**

TRATAMIENTO	1er Evaluación	2da Evaluación	3er Evaluación	4ta Evaluación
CONTROL HEXANO	Estadios I y II	Necrosis en la zona basal y central de las hojas	Necrosis en toda la hoja	Necrosis de toda la hoja
CONTROL AGUA	Estadios I y II	Estadio III	Estadio III	Estadio IV
AJO -AGUA	Estadio II	Estadio II	Estadio II	Estadio III
CEBOLLA AGUA	Estadio II	Estadio III	Estadio III	Estadio IV
NEEM AGUA	Estadio II	Estadio II	Estadio II	Estadio II
AJO HEXANO	Estadio II	Necrosis en toda la hoja	Necrosis en toda la hoja	Necrosis en toda la hoja
CEBOLLA HEXANO	Estadio II	Necrosis en toda la hoja	Necrosis en toda la hoja	Necrosis en toda la hoja
NEEM HEXANO	Estadio II	Necrosis en toda la hoja	Necrosis en toda la hoja	Necrosis en toda la hoja

**FIGURAS**

**FIGURA 1. HOJA INFECTADA CON SIGATOKA AMARILLA**

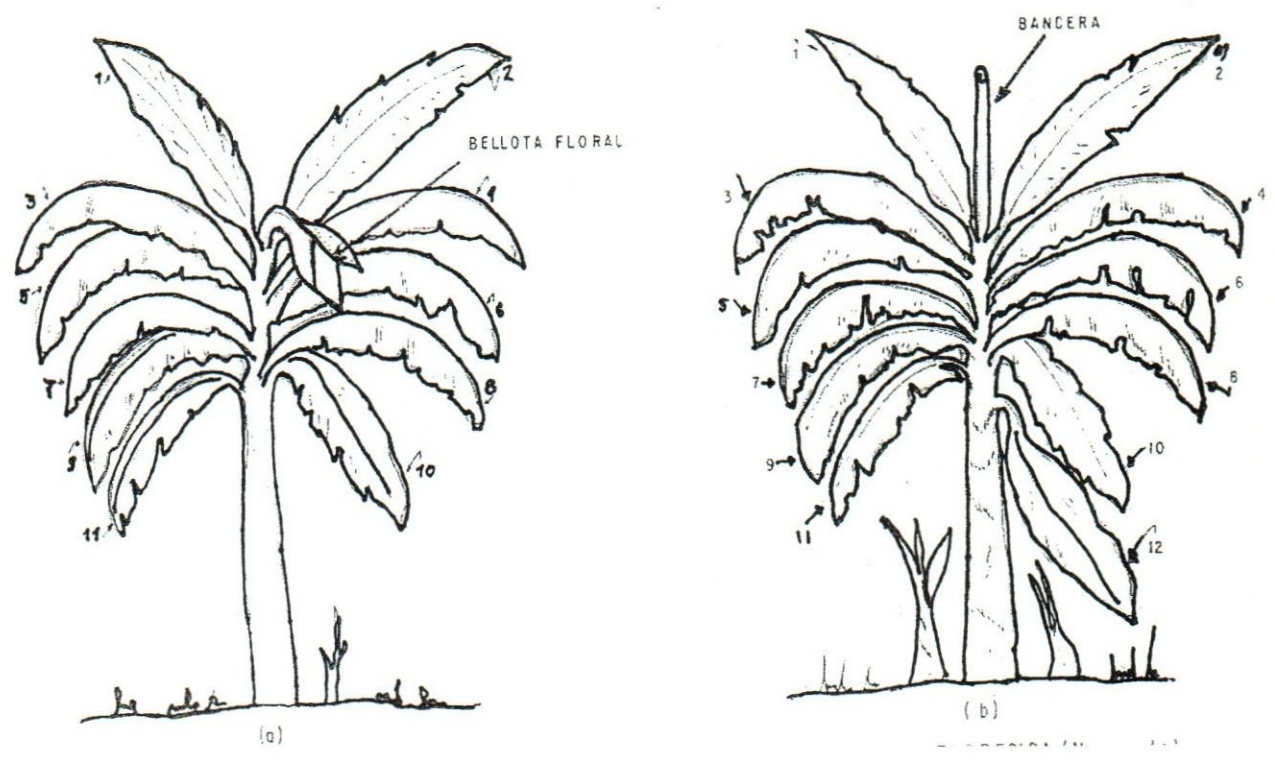


**FIGURA 2. CURVA PATRÓN DEL CRECIMIENTO DEL HONGO**

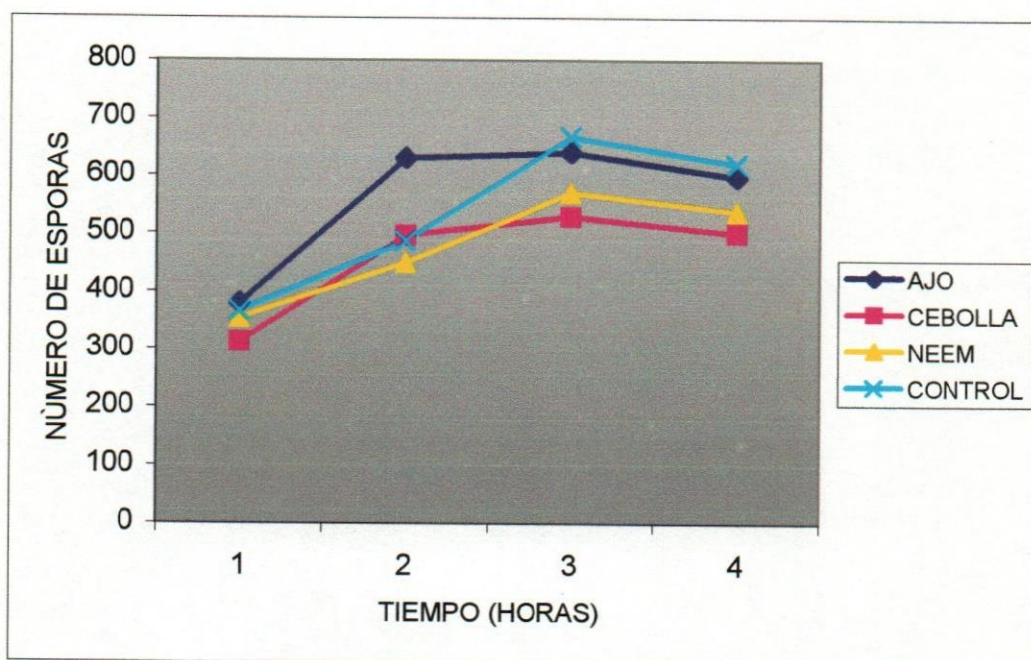
El tiempo 1 representa - 48 horas, el 2- 96 horas, el 3- 144 horas y l 4 - 192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo



FIGURA 3. PATRÓN DE NUMERACIÓN DE LAS HOJAS EN MUSÁCEAS



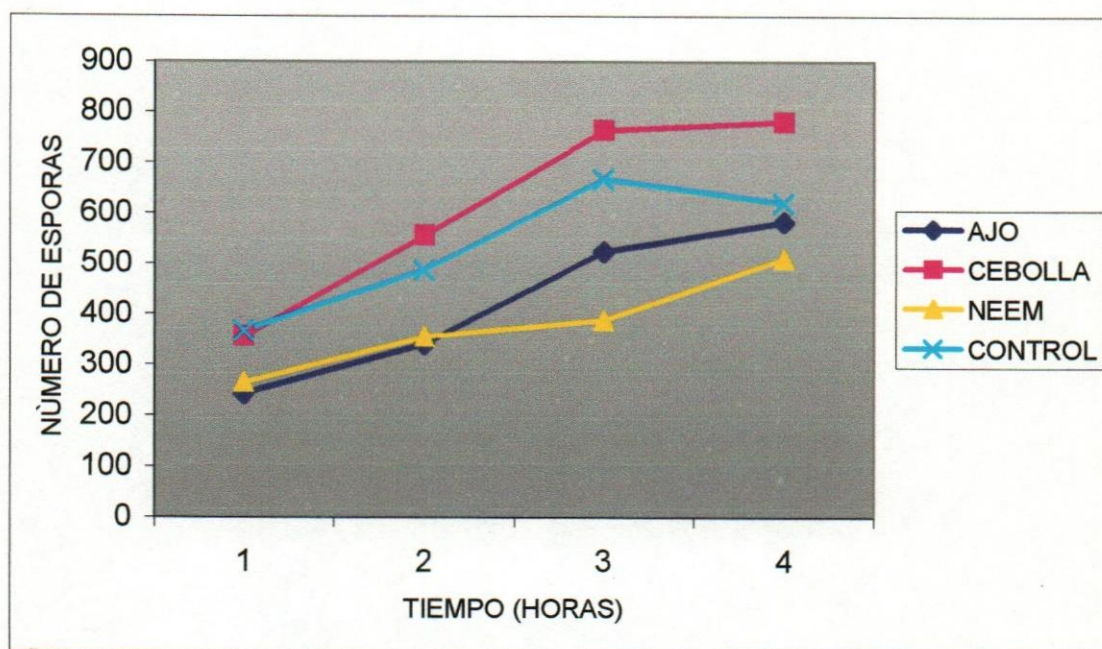
**FIGURA 4. EXTRACTOS CON AGUA AGREGADOS SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola*. 5gr/l**



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo

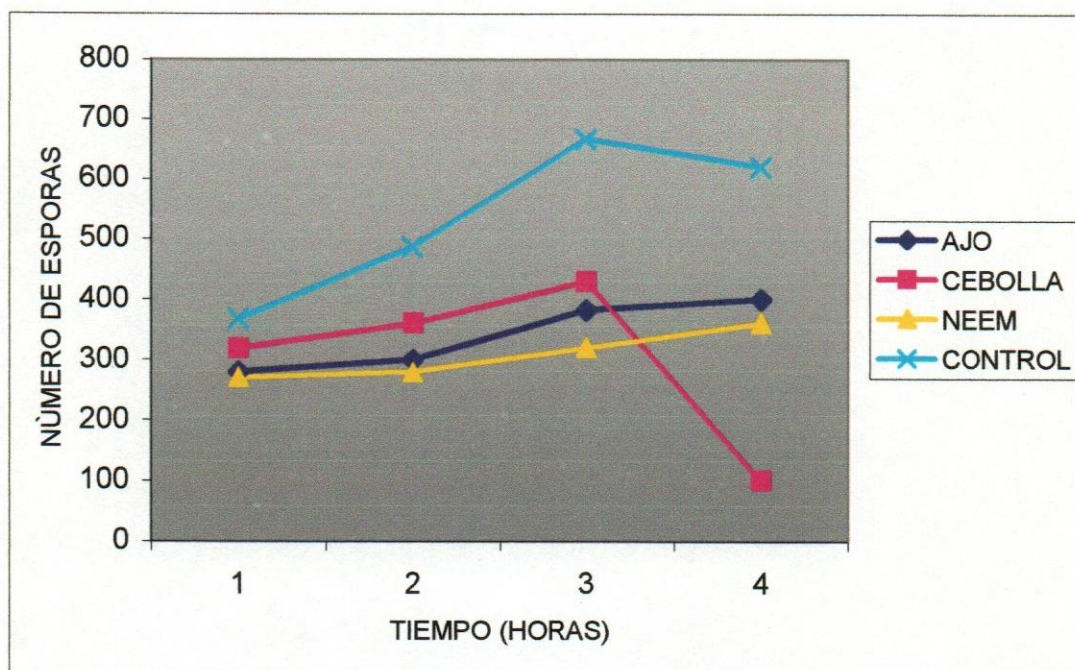
FIGURA 5. EXTRACTOS CON AGUA AGREGADOS SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola*. 10gr/l



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo.

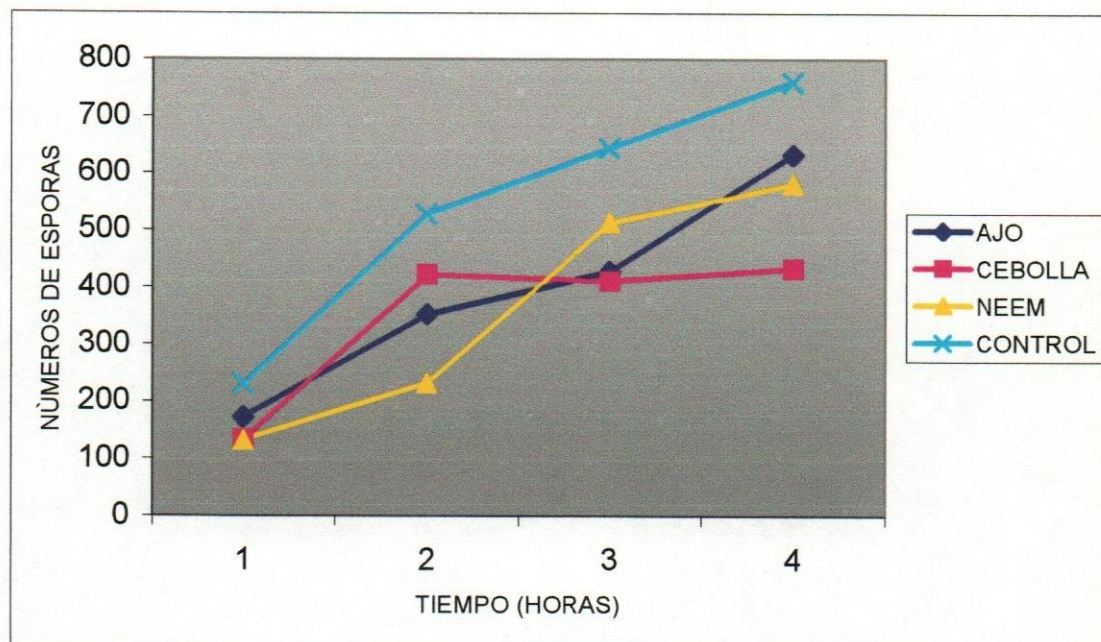
**FIGURA 6. EXTRACTOS CON AGUA AGREGADOS SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola*. 20 gr/l**



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo.

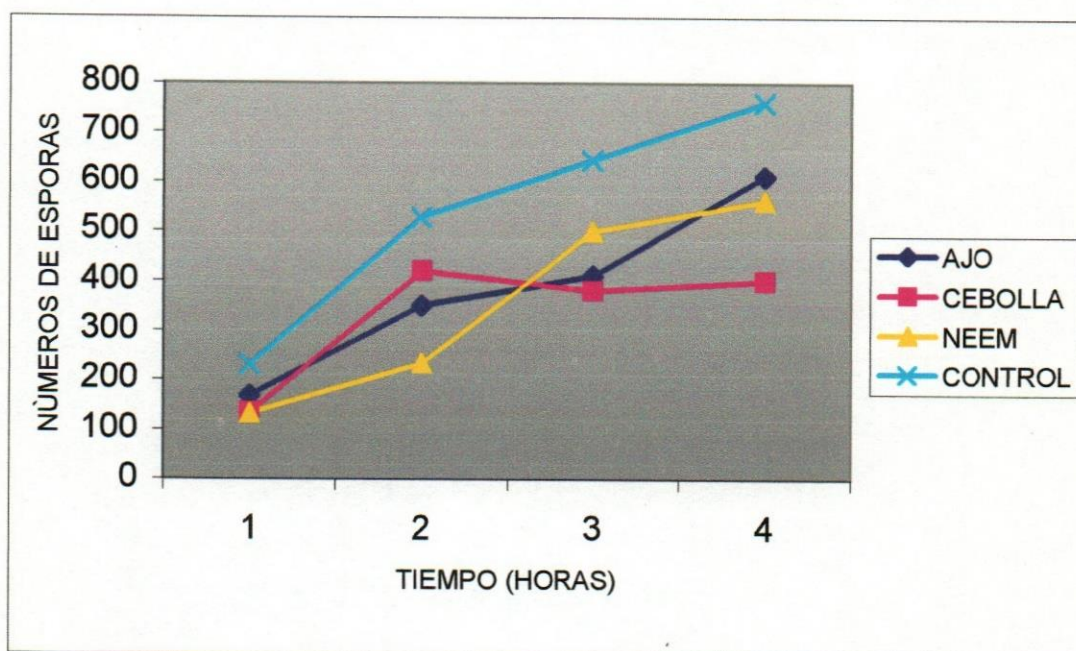
**FIGURA 7. EXTRACTOS CON HEXANO AGREGADOS SOBRE HONGO *Mycosphaerella musicola*. 5 gr/l**



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo

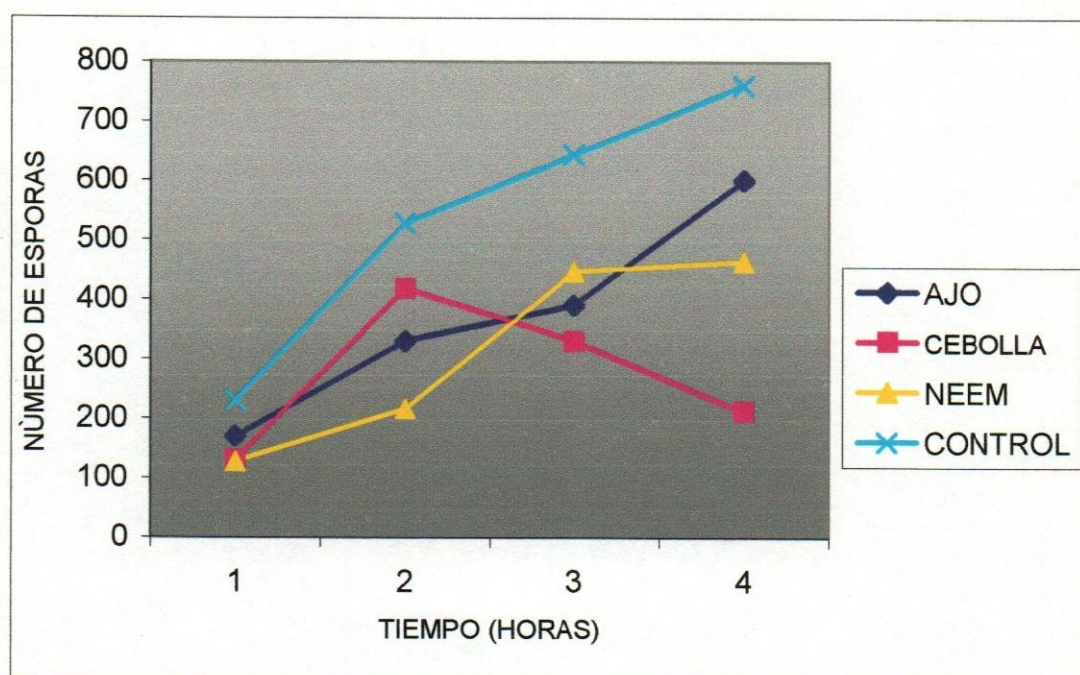
FIGURA 8. EXTRACTOS CON HEXANO AGREGADOS SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola*. 10 gr/l



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo

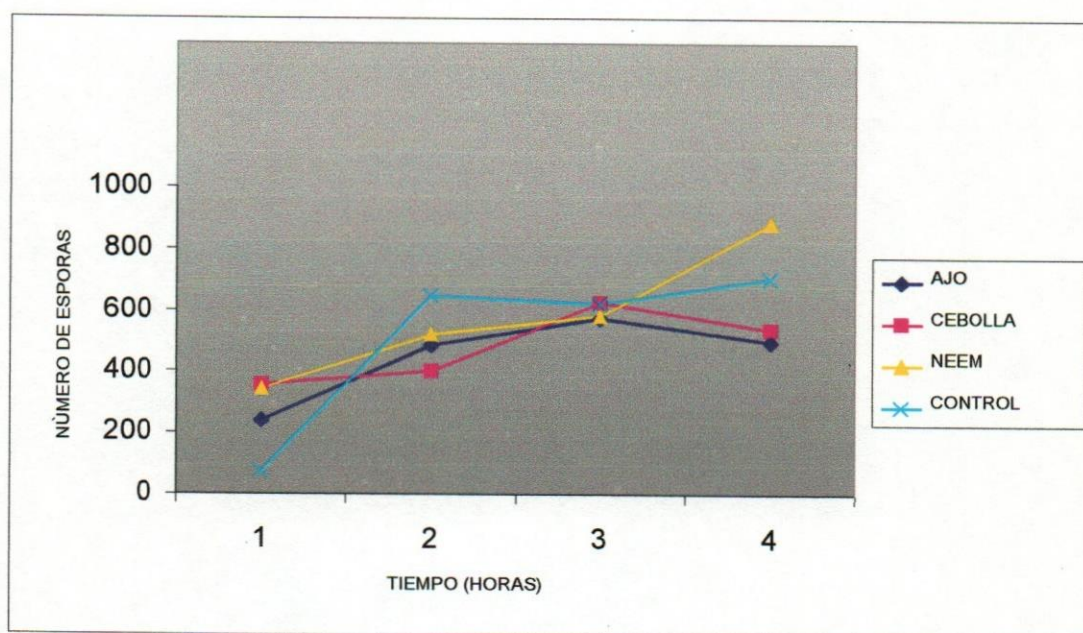
FIGURA 9. EXTRACTOS CON HEXANO AGREGADOS SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella musicola*. 20 gr/l



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo

FIGURA 10. EXTRACTOS CON AGUA INCLUIDOS EN EL MEDIO DE CULTIVO. 5 gr/l

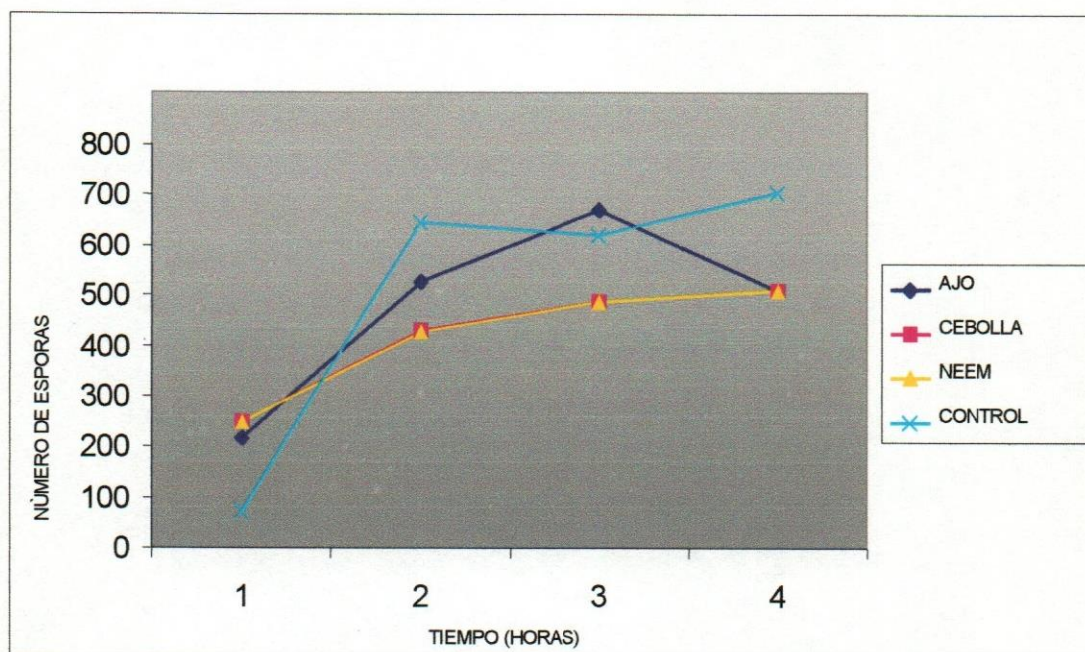


El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo



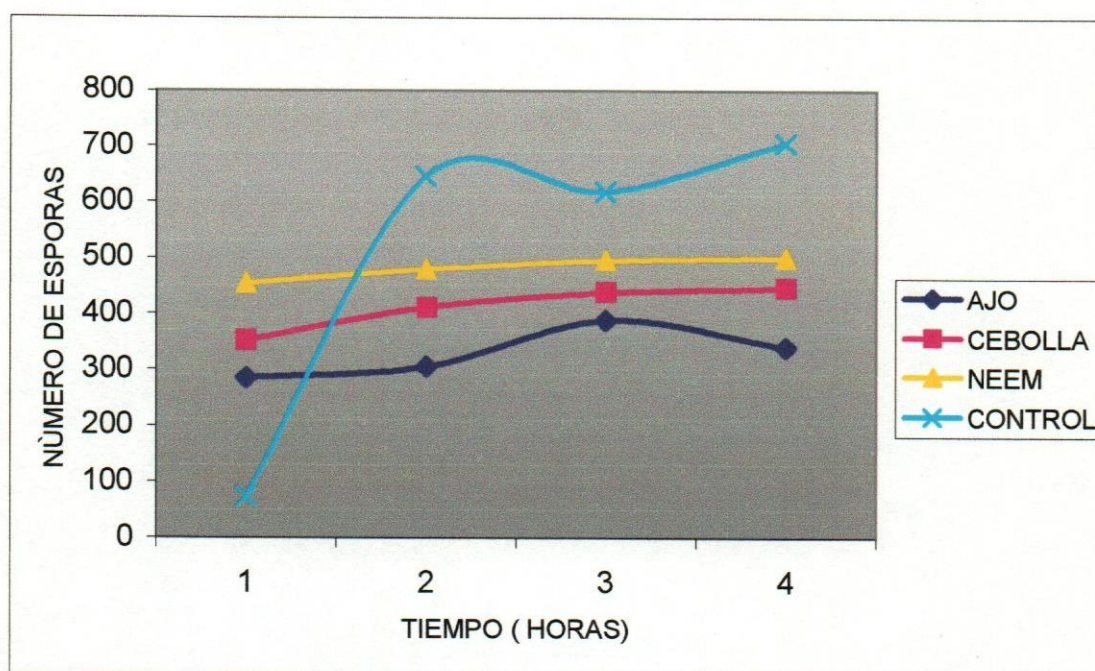
FIGURA 11. EXTRACTOS CON AGUA INCLUIDOS EN EL MEDIO DE CULTIVO. 10 gr/l



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo

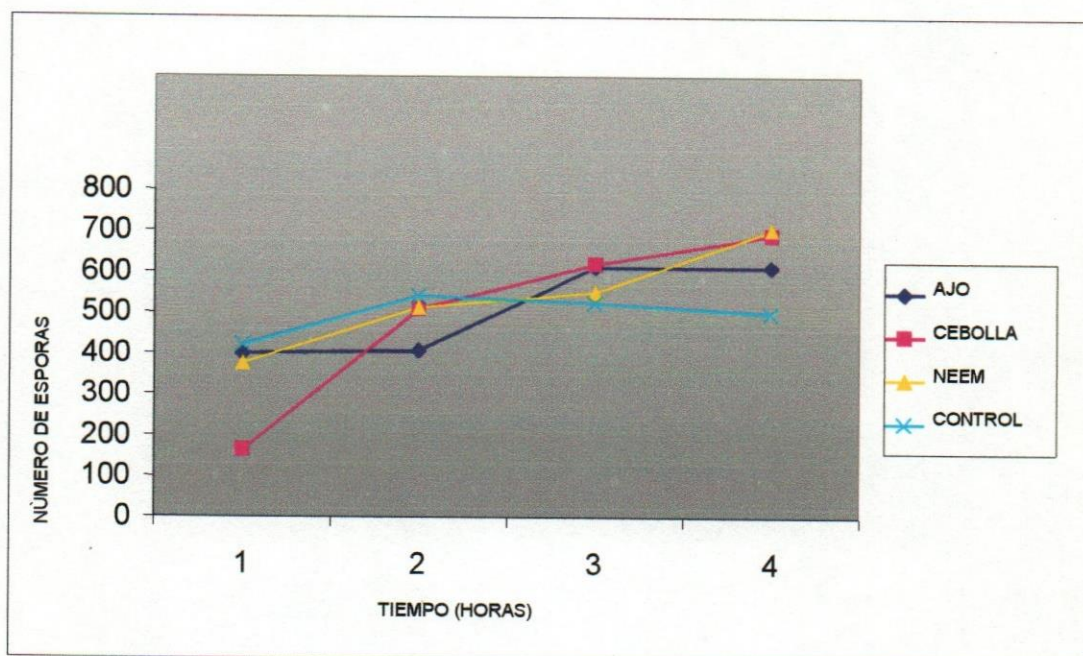
FIGURA 12. EXTRACTOS CON AGUA INCLUIDOS EN EL MEDIO DE CULTIVO. 20 gr/l



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo

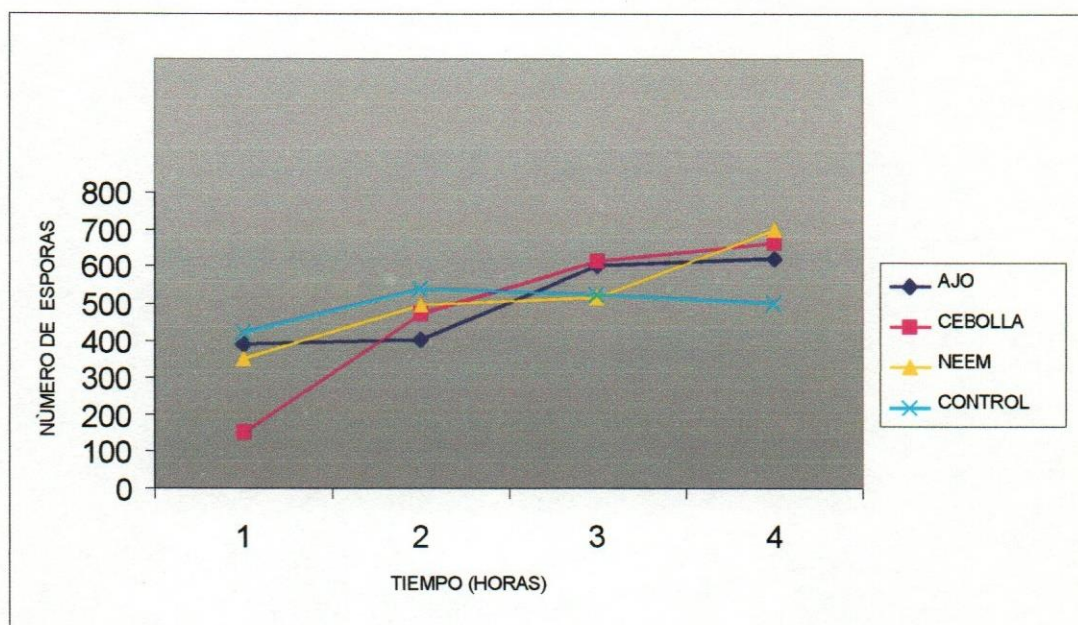
FIGURA 13. EXTRACTOS CON HEXANO INCLUIDOS EN EL MEDIO DE CULTIVO. 5 gr/l



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo

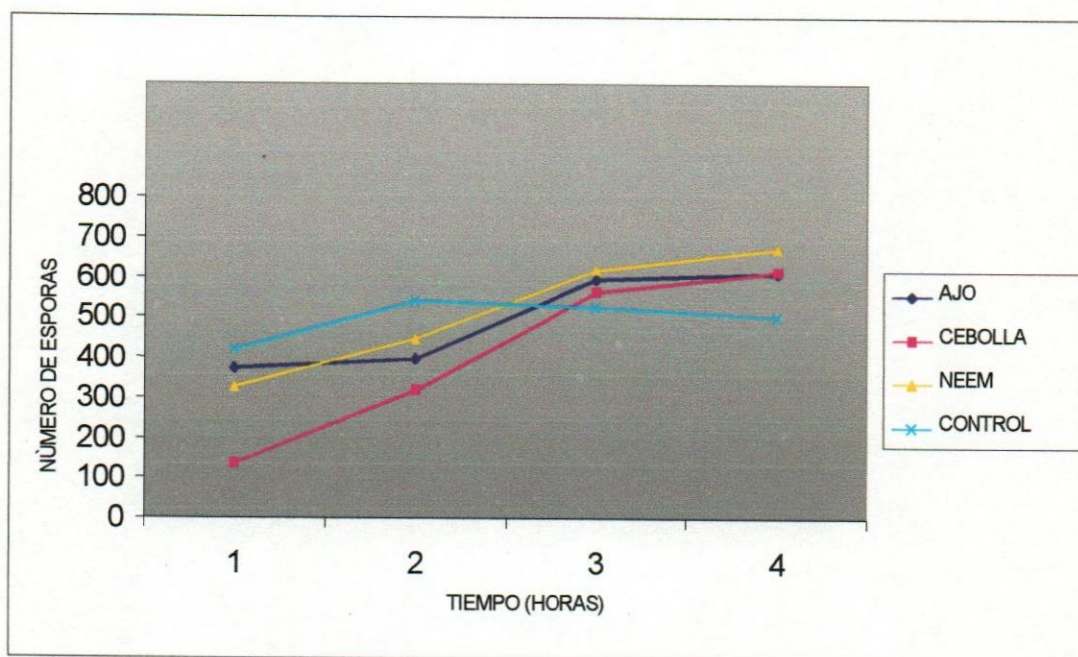
**FIGURA 14. EXTRACTOS CON HEXANO INCLUIDOS EN EL MEDIO DE CULTIVO. 10gr/l**



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo

FIGURA 15. EXTRACTOS CON HEXANO INCLUIDOS EN EL MEDIO DE CULTIVO. 20gr/l



El número de esporas debe ser multiplicado por  $10^4$  (Factor de la Cámara de Neubauer)

El tiempo 1 representa -48 horas, el 2 - 96 horas, el 3 -144 horas y el 4 -192 horas de haber sido efectuada la siembra del hongo

FIGURA 16. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* SIN NINGÚN TRATAMIENTO. AUMENTO (10.000X).

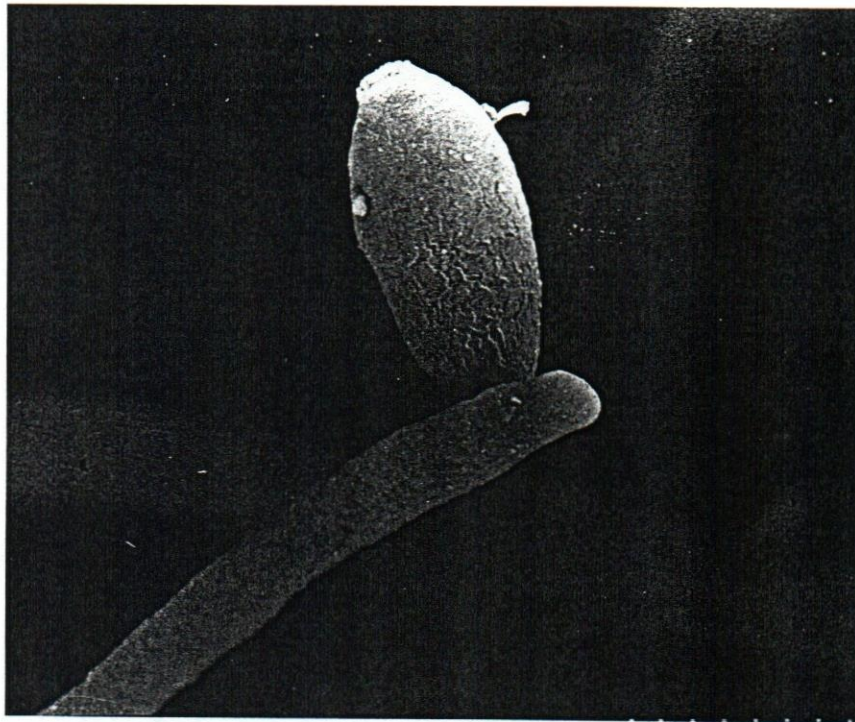


FIGURA 17. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* SIN NINGÚN TRATAMIENTO. AUMENTO (10.000)X.

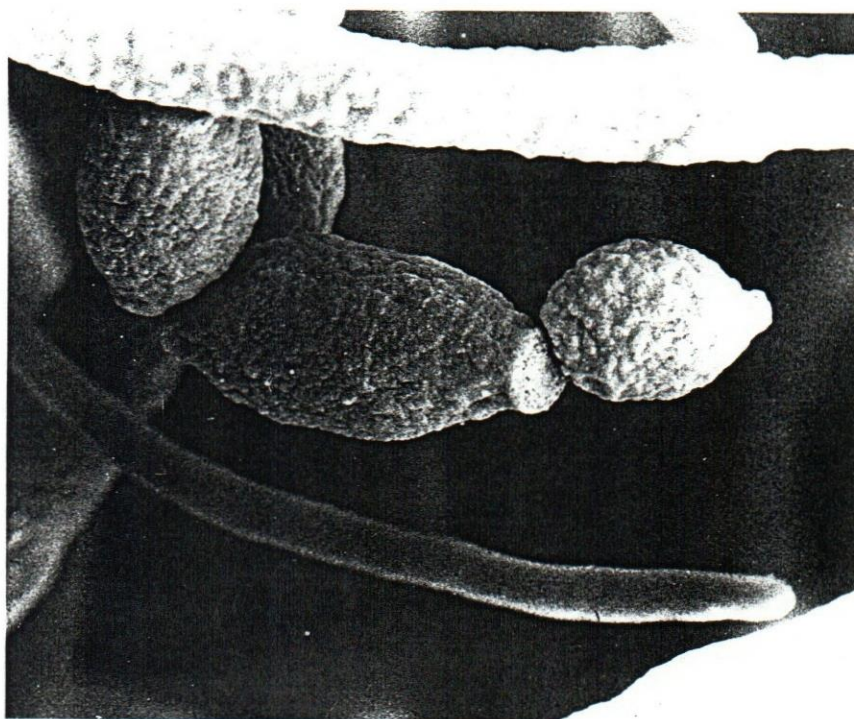


FIGURA 18. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO AJO - AGUA INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (2.500X).

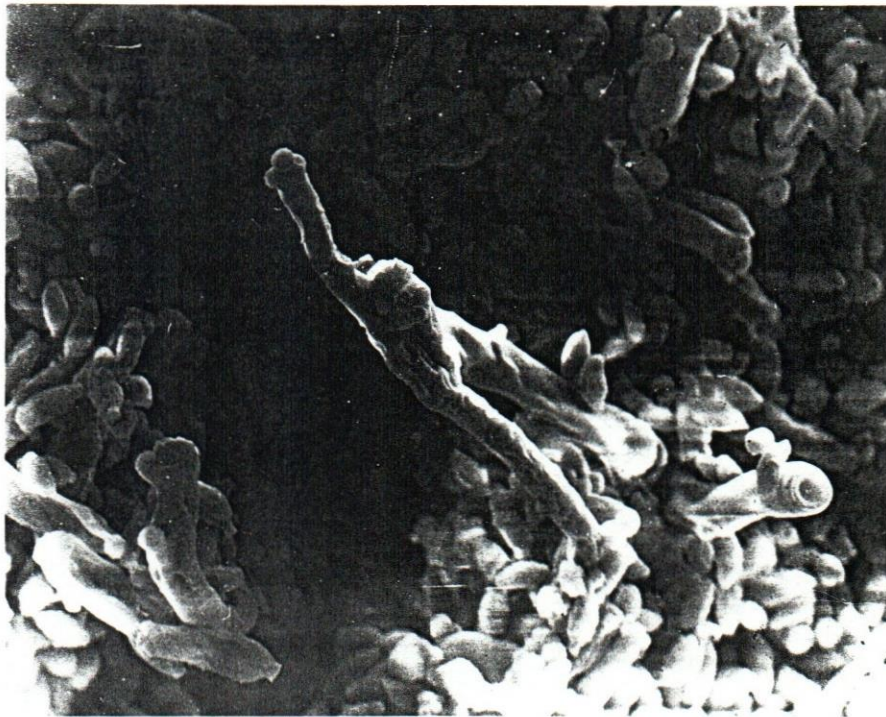




FIGURA 19. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO AJO - AGUA INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (7.500X).

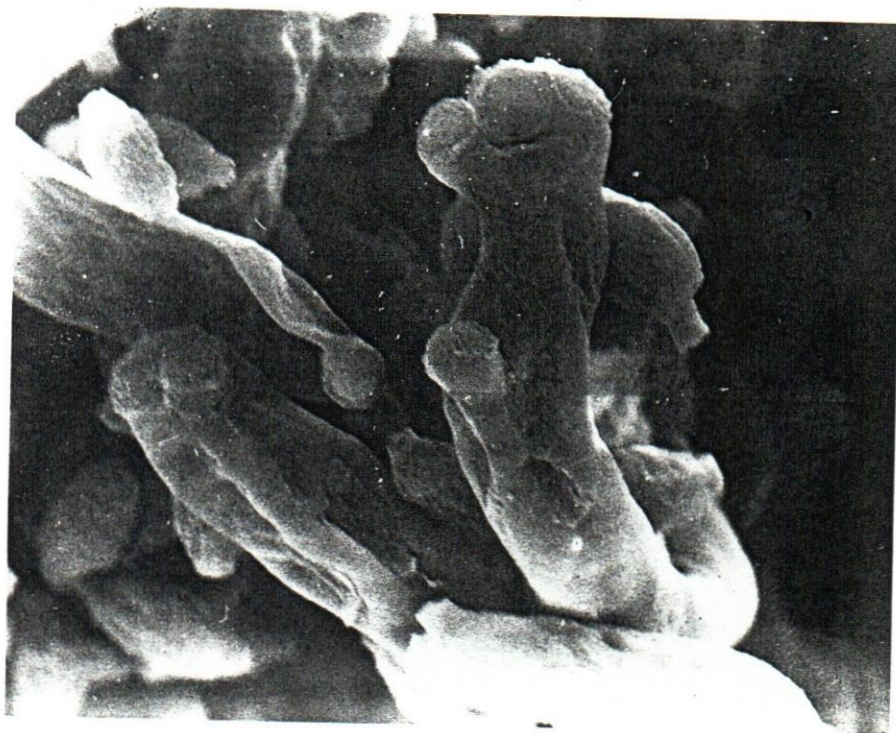


FIGURA 21. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO NEEM - AGUA INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (7.500X).



FIGURA 22. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO CEBOLLA - AGUA INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (11.250X).



FIGURA 23. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO CEBOLLA - AGUA INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (5.000X).

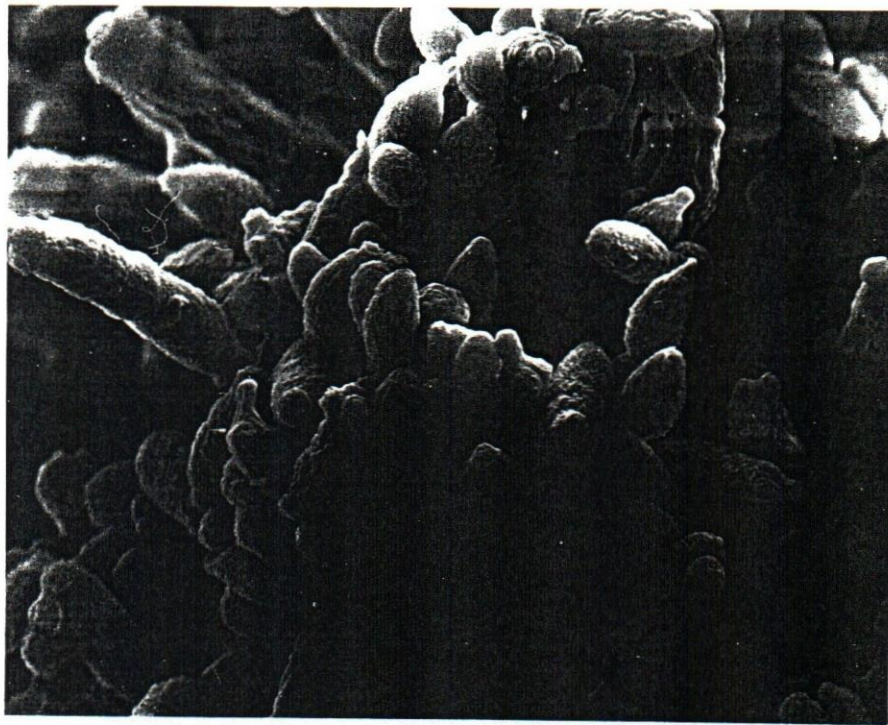


FIGURA 24. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO AJO - AGUA AGREGADO SOBRE EL HONGO. AUMENTO (3.750X).

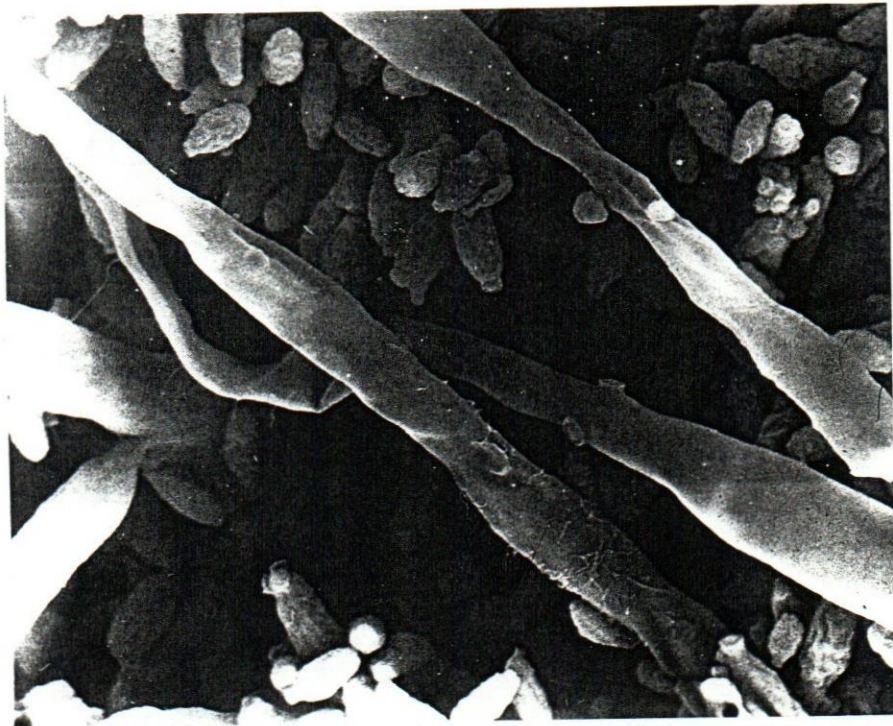


FIGURA 25. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO CEBOLLA - AGUA AGREGADO SOBRE EL HONGO. AUMENTO (5.000X).



FIGURA 26. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO CEBOLLA - AGUA AGREGADO SOBRE EL HONGO. AUMENTO (2.000X).



FIGURA 27. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO NEEM - AGUA AGREGADO SOBRE EL HONGO. AUMENTO (7.500X).





FIGURA 28. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO NEEM - HEXANO INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (2.500X).

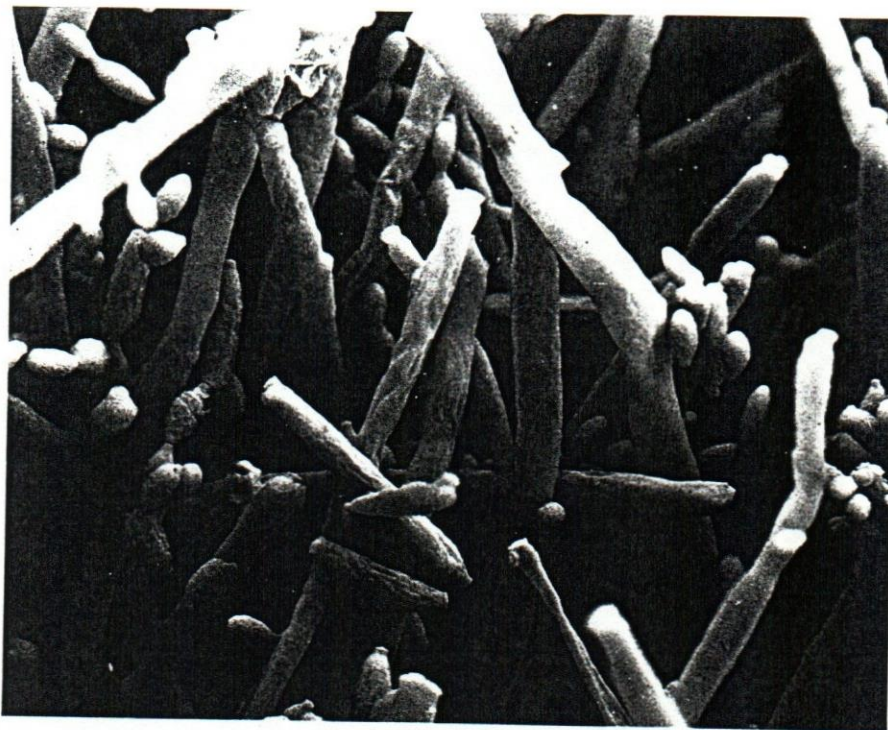


FIGURA 29. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO NEEM - HEXANO INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (3.750X).



FIGURA 30. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO CEBOLLA – HEXANO INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (3.250X).

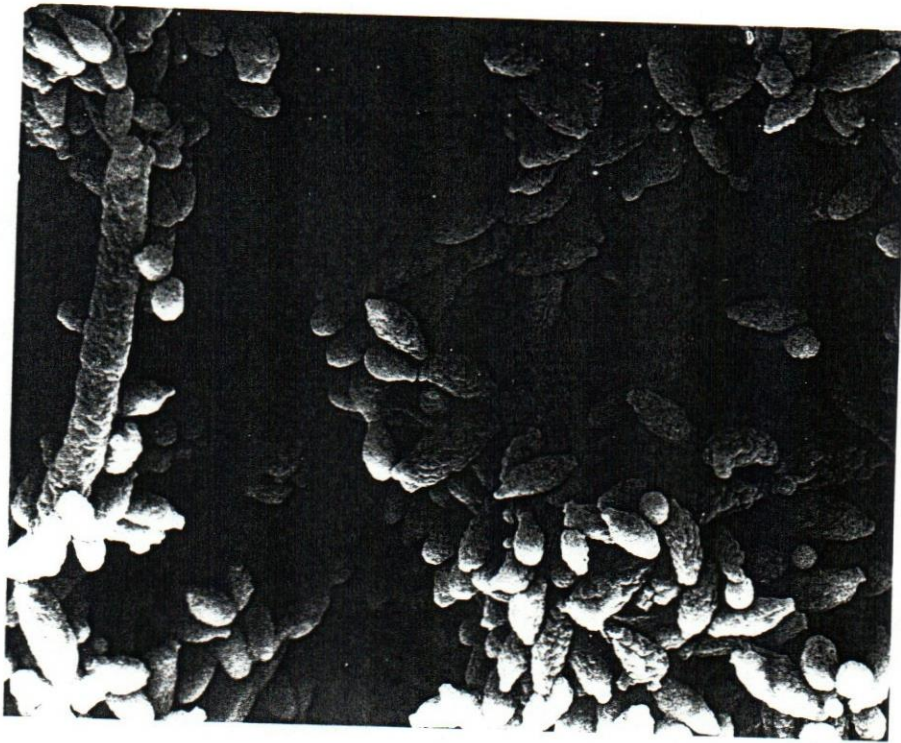


FIGURA 31. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO CEBOLLA - HEXANO INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (5.000X).



FIGURA 32. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO AJO - HEXANO INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (2.000X).

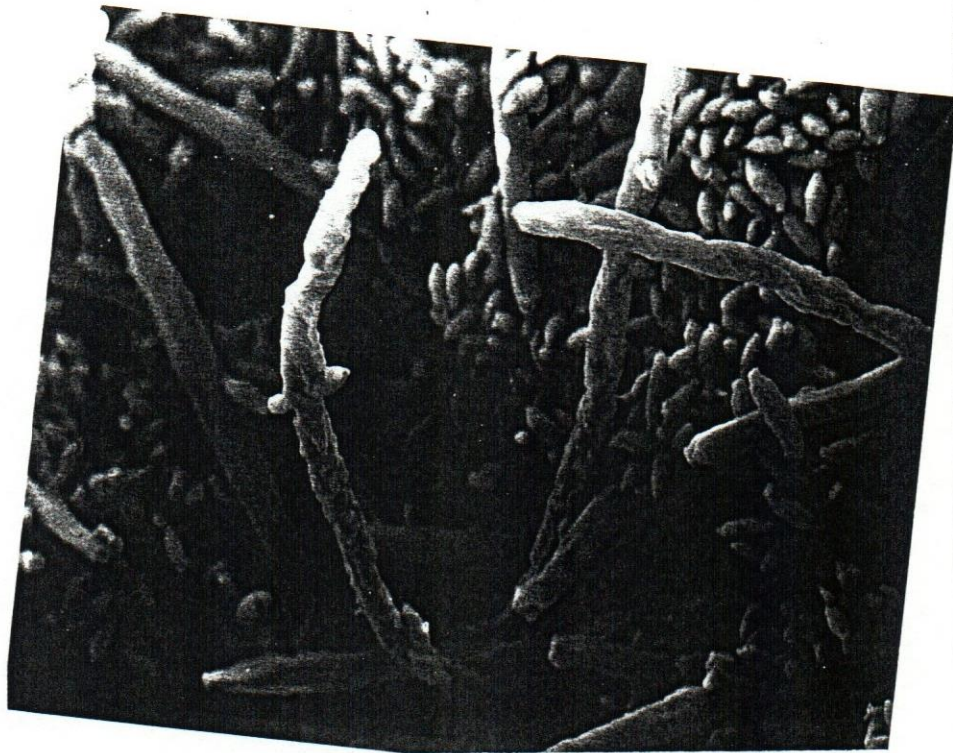


FIGURA 33. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO AJO - HEXANO INCLUIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO. AUMENTO (3.750X).

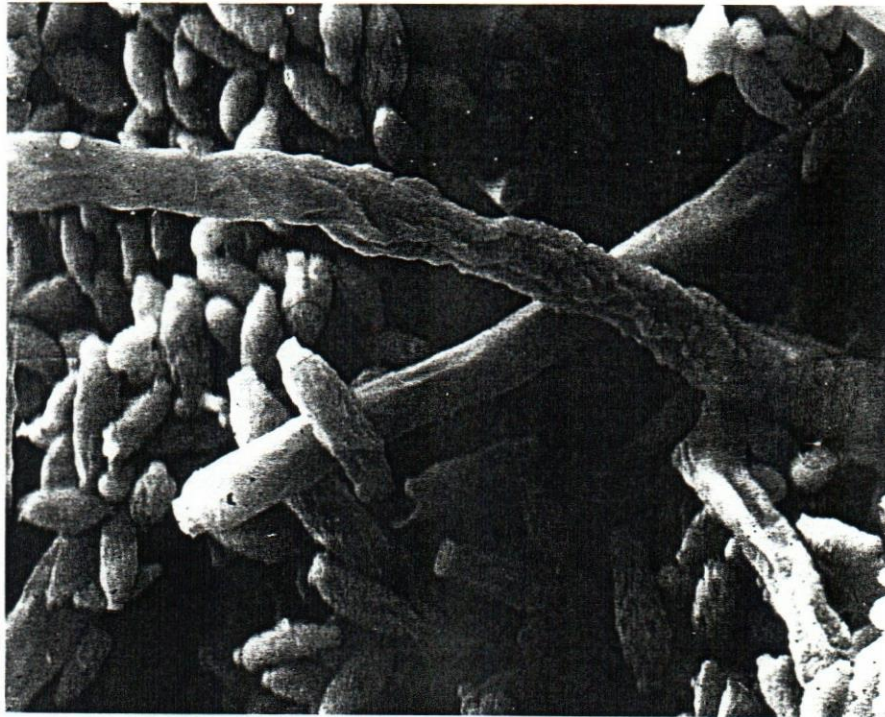


FIGURA 34. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO AJO - HEXANO AGREGADO SOBRE EL HONGO. AUMENTO (2.500X).



FIGURA 35. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO AJO - HEXANO AGREGADO SOBRE EL HONGO. AUMENTO (5.000X).





FIGURA 36. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO NEEM - HEXANO AGREGADO SOBRE EL HONGO. AUMENTO (8.750X).

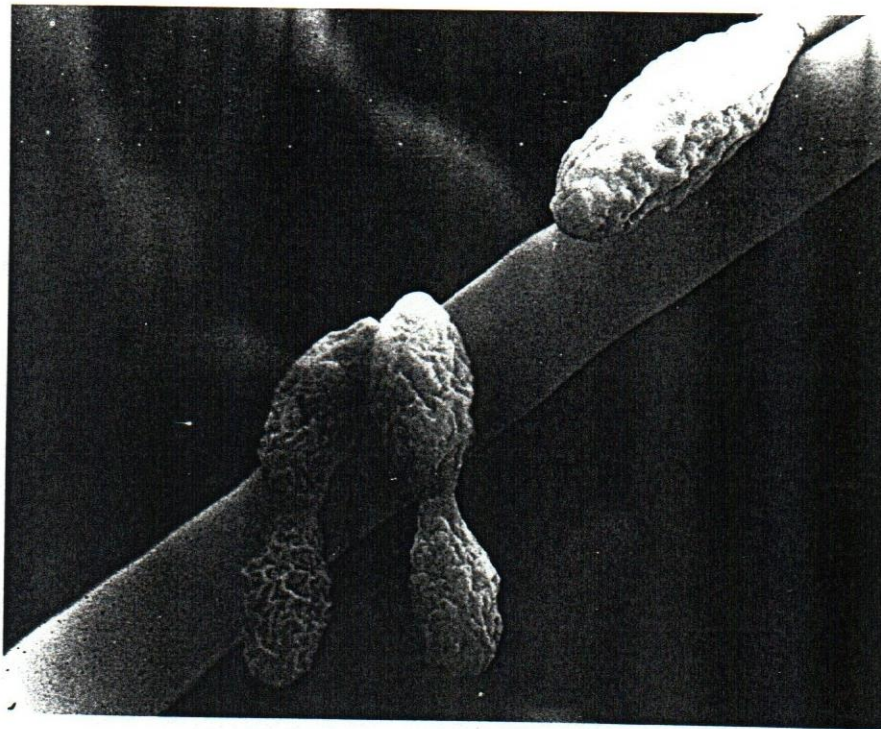


FIGURA 37. REGISTRO FOTOGRÁFICO REALIZADO EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DEL HONGO *Mycosphaerella musicola* TRATADO CON EXTRACTO AJO - HEXANO AGREGADO SOBRE EL HONGO. AUMENTO (2.000X).



## VI. CONCLUSIONES

Luego de analizar los resultados obtenidos a través de esta investigación, se puede concluir :

1. La obtención de extractos vegetales utilizando como solvente al agua, fue más eficiente en el control biológico del patógeno, debido a las desventajas que presentó el solvente Hexano.
2. Los extractos que demostraron mayor eficacia en el control del área de crecimiento y en la esporulación del hongo, fueron los extractos de concentración 20 gr/l.
3. Las pruebas realizadas "in vitro" permiten concluir que hay extractos que poseen una mayor eficacia en el control del área de crecimiento del hongo y a la vez pueden ser ineficaces en el control de esporas, lo que se evidenció, debido a que:
  - El extracto Neem – Hexano agregado sobre el hongo presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del patógeno.
  - El extracto Cebolla – Hexano agregado sobre el hongo presentó un efecto inhibitorio sobre La esporulación del patógeno.
  - El extracto Neem – Hexano agregado al medio de cultivo presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del patógeno.

- El extracto Cebolla – Hexano agregado al medio de cultivo presentó un efecto inhibitorio sobre la esporulación del patógeno.
  - El extracto Cebolla – Hexano agregado al medio de cultivo presentó un efecto fungistático sobre el crecimiento del hongo.
4. El análisis de varianza simple, determinó que todos los extractos presentaron una diferencia en su media, en relación al número de esporas y al área de crecimiento, lo que demuestra que todos los extractos tienen un efecto distinto sobre estas variables.
  5. Las fotografías realizadas en Microscopio Electrónico de Barrido, demostraron cambios estructurales en la morfología del hongo, en algunos tratamientos: Ajo – Agua agregado al medio de cultivo, Ajo – Agua agregado sobre el hongo.
  6. En pruebas “in vivo” se determinó que:
    - El extracto Neem - Agua presenta un efecto fungistático sobre el hongo *Mycosphaerella musicola*.
    - El extracto Ajo – Agua es un inhibidor medianamente bueno.
    - El extracto Cebolla – Agua no es un fungistático efectivo.
  7. El control biológico de este patógeno, podría constituir una alternativa al uso de fungicidas altamente tóxicos y que causan graves afecciones al medio ambiente.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Debido a que no se realizaron pruebas con concentraciones mayores a 20 gr/l, es recomendable que el presente trabajo se continúe, empleando concentraciones más altas a manera de determinar la concentración del extracto más adecuada para el control biológico del patógeno y que no presente efectos tóxicos en la planta.
2. Adicionalmente, se recomienda trabajar con otros solventes orgánicos, que permitan monitorear la efectividad de extractos vegetales.
3. Cabe destacar, que es importante realizar un estudio sistemático en la observación del hongo al Microscopio Electrónico de Barrido, a fin de determinar los efectos causados por los extractos en el patógeno.
4. Adicionalmente, sería interesante estudiar el mecanismo de acción de los extractos a nivel de biología celular.

### VIII. BIBLIOGRAFÍA

- BELLO, A., LÓPEZ, M., TRAPERO, A., y YACER, G., (1996). Patología Vegetal. Vol 2. Sociedad Española de Fitopatología. España. 1154p.
- BULLERMAN, L., LIEW, Y., y SEIER, S., (1977). Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove Oil, cinnamic aldehyde and eugenol. Journal of food science. 42: 1107-1109.
- CALPOUZOS, L., (1955). Studies on the Sigatoka disease of Banana and its fungus pathogen. Athens Garden and Research Laboratory. Cuba. 70p.
- CHAMPION, J., (1963). Le Bananier. Paris, mainsonnuive. Et. Larose. 203p.
- CHEESMAN, E., (1948). Clasificación of the Bananas. III. critical notes on especies *Musa paradisiacal M.Sapientum*. Kew Buel. 2:145-153.
- CHISTHIE, H., (1954). New big supplier of bananas. Foreign Agr. Ecuador. 18(4):109-111.
- CORDEIRO, Z., y PIRES, A., (2000). Doenças en banana produção aspectos técnicos. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnología. Brasilia. DF. 143p.
- CORDERO, M., GONZÁLEZ, M., y HADDAD, O., (1989). Metodología para evaluar el daño de la Sigatoka en el campo. Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas. 19p.

- COSTA, J., MARGHERITIS, E., y MARISCO, J., (1979). Introducción a la terapéutica vegetal. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 533p
- DE BACH, P., (1968). Control de las plagas de insectos y malas hierbas. Compañía editorial continental. México. D.F. 838 p.
- DICKSON, B.T. (1928). Leaf spot of banana in southern Queensland. Queensland. Agr. J. 30:455-457.
- DIEGUEZ, J., (1953). La Sigatoka en tingo María. PCEA. 2(2):14-17.
- DOMÍNGUEZ, X.A., (1978). Métodos de investigación fitoquímica. Edt. Limusa. México. 204p.
- DUNLAP, V., (1950). SIGATOKA DISEASE. United fruit company. La lima. Honduras. S /p.
- FALICO, L., ATLAS, E., NOELTING, M., y SANDOVAL, M., (2001). Control in vitro de *Fusarium oxysporum* patógeno de lavanda (*Lavandula officinalis*) en: Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Vol 26. Brasil. P. 480.
- FERNÁNDEZ, B., (1953). Estudios sobre la nutrición y desarrollo de *Cercospora musae*, causante de la Sigatoka del banano. Turrialba. 3 (4): 200-201.
- FILHO, W., y LOYOLA, J., (2000). Classificação botânica, origem e evolução. Aspectos técnicos. Embrapa Comunicação para Transferência de tecnologia. Brasilia. DF. 143p.
- FOLGUERAS, M., FOLGUERAS, M., y RAMOS, M., (1990). Aislamiento de la toxina de *Mycosphaerella musicola*, causante de la Sigatoka Amarilla

- del plátano. Instituto de Investigación de Viandas Tropicales (INIVIT).Cuba.4p.
- FOURÉ, E., (1989).Varietal reactions of Bananas and plantains to black leaf streak disease. S /p.
- FUSAGRI, J. (1977). Control de enfermedades en plantaciones de cambur. Noticias agrícolas. Vol VIII . Nro 7: 25-27.
- GERTH, A., (1991). El plátano. Folleto. Instituto de Agricultura Tropical. Leipzig. 4p.
- GONZÁLEZ, C. (1976). Introducción a la Fitopatología. Editorial Ilca. Costa Rica. 145p.
- GRAINGE, M., y AHMED, S., (1988). Hand Book of plants with pest control properties.John wiley and sons. 470p.
- HADDAD, O., y BORGES, L., (1973). Bananos en Venezuela. CENIAP.106p.
- HERNÁNDEZ E., ROJAS, D., (2001).Inhibición del crecimiento micelial y esporulación de 5 géneros se hongos fitopatógenos, mediante el extracto de hojas del árbol de Neem, en: Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Vol 26. Brasil. P462.
- HORTICOM.(2001).[On Line]. Disponible en:  
[Http://WWW.Horticom/publicac/juego\\_v/ih120html](http://WWW.Horticom/publicac/juego_v/ih120html).
- KENNETH,D.H., (1986), Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens.American Phytopathological society.312p.



- KIMATI, K., AMORIN, L., FILHO, B., CAMARGO, L., y REZENDE, J., (1997).  
Manual de fitopatología. Vol 2 . Editora agronómica ceres Ltda. São Paulo. 600p.
- LAGUNES, T., y RODRÍGUEZ, C., (1989). Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas. CONACYT. Colegio de Post graduados. México. 105 p.
- LEACH, R., (1941). Banana leaf spot *Mycosphaerella musicola*, the perfect stage of *Cercospora musae zimm*. Trop. Agr. Trin. 18: 91-95.
- MARTINEZ, G ., PARGAS, R ., MANZANILLA, E ., MUÑOZ, D., (1998). La Sigatoka negra y su avance en el territorio Venezolano; implicaciones socioeconómicas. FONAIAP. (59).40- 42.
- MASSEE, G., (1914). *Cercospora musae*. Masee Bul Misc info Roy. Bot Gard; Kew, England P.159.
- MEREDITH, C., y BUTLER A., (1939). The production of *cercospora musae* in banana leaf- agar. J.Jamaica Agr. Soc. 43:621.
- MONTES-BELMONT, R., (1996). Productos naturales de origen vegetal para el combate de Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. 9-13.
- MONTES-BELMONT, R., (1997). Extractos sólidos, acuosos y hexánicos de plantas para el combate de *Aspergillus flavus* Link. en Maíz. Revista Mexicana de Fitopatología. 1-15.

- MONTES-BELMONT, R., y ZILCH, S.,(1997). Pudrición del fruto de pepino y su control con extractos vegetales. Revista Mexicana de Ciencia y Tecnología. Nro 42. 87-94.
- MOROZUMI,S., WAUKE, T., KUDOH, Y., y HITOKOTO,H.,(1989).Antifungal effects of commercial foods and spices, and their components. P 155-160. In: Nattori, s., Hashimoto,K and Uneno,Y. (Eds). Mycotoxins and Phycotoxins, 88. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam Netherland.Payne. G.A. 1992 Aflatoxin in maize. Critical Review of plant Science.10: 423-440.
- MORRISON,R., y BOYD, R., (1996). Química orgánica. Addison Wesley Iberoamericana. 5ta edición. Venezuela.1356 p.
- OIKOS, SA., (2000). La historia de Sukina. Boletín divulgativo. Maracay. Venezuela .8p
- PEPENOE, W., (1939). Leaf spot of bananas J.Jamaica Agr. Soc. 43:1-6.
- PÉREZ, O., HADDAD, O., y WAGNER, J., (1989). Desarrollo y distribución de clones de Musáceas de distinta composición genómica en suelos de lenta permeabilidad. En: memorias de la IX Reunión de ACORBAT. Mérida. Venezuela. S /p.
- RAMA, G., (1994).Coltivare L´orto. Edizioni polaris. Italia.191p
- RIVERA, M., LÓPEZ, M., LÓPEZ, S., (2001).Evaluación de microorganismos para el control biológico de *Botrytis cinerea* en violeta de los alpes en:

- Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia.Vol 26. Brasil.  
P.482.
- RODRÍGUEZ, H., TORRES, E., y SANABRIA, E., (1997), Actividades de extractos Vegetales sobre el crecimiento "in vitro" de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthia*, *alternaria solani* y *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Fitopatología. México. p 139.
- SALGADO, A., CARDOSO, M., SOUZA,J., SOUZA,P., y AZEVEDO,S., (2001).Estudio biológico e atividade fungitóxica do óleo esencial das folhas de eucalyptus en: Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia.Vol 26. Brasil.p 331.
- SÁNCHEZ, K.,(1987). Cultivos de plantaciones manuales para educación agropecuaria.Producción vegetal. Nro 22. pp:53-62.
- SHEPHERD, K., (1990). Evolução e classificação das bananeiras. Cruz das Almas. Embrapa Comunicação para Transferencia de Tecnología. Brasilia. DF.4p.
- SIMMONDS,J., (1928). Diseases of the banana in Queensland. Queensland Agri. J.30:438-454.
- SIMMONDS,J., (1933). Banana leaf spot Queensland Agri. J.39:21-40.
- SIMMONDS, N., (1966). Bananai. 2ed. London: Logmans. 512p.
- SINGH, A., DICKSHIT, A., SHARMA, M., y DIXIT, S., (1980).Fungitoxic activity of some essential oils. Econ. Bot. 34:186.

- STAHEL, G., (1937).Notes on *Cercospora* leaf spot of bananas (*Cercospora musae*). Trop. Agr. Trin. 14. 257-264.
- SURGA, J.,(1988). Obtención de plantas libres de virus del mosaico del pepino por cultivo de ápices meristemáticos aislados "in vitro" de los cultivares de banano. Fitopatología. Venezuela. Vol 1. Nro 2.:69-72.
- SWAMINATHAN,S., (1988).Foreword. In: Grainge,M. and Ahmed (eds) Handbook of plants with pest control properties. John wiley and sons. P.V.
- TRUJILLO, I., (1994).Aplicación de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento genético del género musa. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 236p.
- VÁSQUEZ, N., TAPIA, A., y GALINDO, J., (1990). Ultraestructural studies of the infection process of *Mycosphaerella fijiensis* of Musa Cultivars. 4p.
- VIÑAS, J., y ABADIAS, M., (2001). Control de *Penicillium digitatum*. En: Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia.Vol 26. Brasil. P. 486.
- WARDLAM, C., (1934). Bananas Diseases Trop. Agri. Trin. 11 : 173-175.

**ANEXOS**

ANÁLISIS DE VARIANZA EN LAS MEDICIONES DE ESPORAS  
48H

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
371	284	454	131	327	282
371	284	454	133	325	281
372	285	453	131	326	280
371	286	452	132	326	281
373	285	454	131	326	281
372	284	453	132	326	281
372	285	454	131	327	280
371	284	453	132	326	281
371	284	453	133	326	280
372	285	454	132	327	280
<b>371.6</b>	<b>284.6</b>	<b>453.4</b>	<b>131.8</b>	<b>326.2</b>	<b>280.7</b>

**Media**

Método 7	Método 8	Método 9	Método 10	Método 11
169	128	134	353	319
171	127	135	352	319
171	128	133	352	319
170	128	135	353	320
171	128	135	353	318
170	126	134	353	318
170	127	134	352	319
170	128	133	351	320
171	127	134	352	319
169	127	134	353	319
<b>170.2</b>	<b>127.4</b>	<b>134.1</b>	<b>352.4</b>	<b>319</b>

**Media**

**Gran Media** 268.3  
**SCD** 49.8  
**SCE** 10194.7

**F** 20.68

Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias poblacionales con un nivel de significación del 5%

menor que 1.92768113

96H

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
397	305	479	418	445	300
396	304	480	417	445	300
395	306	478	419	445	301
396	305	479	418	445	300
396	304	479	416	446	300
395	305	480	417	445	299
396	305	480	418	446	300
396	306	479	417	444	301
395	305	480	417	445	300
396	305	478	418	445	301
<b>395.8</b>	<b>305</b>	<b>479.2</b>	<b>417.5</b>	<b>445.1</b>	<b>300.2</b>

**Media**

Método 7	Método 8	Método 9	Método 10	Método 11
330	215	418	410	360
330	216	418	411	360
331	217	418	410	360
330	217	417	410	358
331	216	418	411	360
330	217	416	410	360
329	217	417	411	359
330	216	418	411	359
331	216	418	412	360
329	217	417	411	361
<b>330.1</b>	<b>216.4</b>	<b>417.5</b>	<b>410.7</b>	<b>359.7</b>

**Media**

<b>Gran Media</b>	<b>370.7</b>
<b>SCD</b>	<b>50.2</b>
<b>SCE</b>	<b>6847.5</b>

<b>F</b>	<b>13.78</b>
----------	--------------

Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias poblacionales con un nivel de significación del 5%



144H

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
593	389	495	330	538	382
592	388	496	331	538	381
592	389	496	330	538	382
593	388	497	330	538	382
594	388	496	330	537	381
593	389	497	331	538	382
593	388	496	330	538	382
592	387	495	329	537	380
594	387	495	331	539	382
592	388	496	330	538	382
<b>592.8</b>	<b>388.1</b>	<b>495.9</b>	<b>330.2</b>	<b>537.9</b>	<b>381.6</b>

**Media**

Método 7	Método 8	Método 9	Método 10	Método 11
390	446	564	438	430
391	445	563	437	431
389	447	564	438	430
389	446	565	439	430
390	445	564	438	430
389	445	563	438	432
391	447	564	437	430
390	446	564	439	430
390	446	564	438	430
391	445	563	437	430
<b>390</b>	<b>445.8</b>	<b>563.8</b>	<b>437.9</b>	<b>430.3</b>

**Media**

**Gran Media 454.0**  
**SCD 50.5**  
**SCE 7487.8**  
**F 14.98**

Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias  
poblacionales con un nivel de significación del 5%

192H

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
610	340	500	212	670	400
611	341	501	213	669	399
610	341	500	211	668	399
611	340	501	212	669	401
612	340	500	211	668	399
611	341	502	212	670	399
610	342	500	213	670	399
610	340	501	211	669	401
611	340	501	211	669	401
610	340	502	212	669	400
<b>610.6</b>	<b>340.5</b>	<b>500.8</b>	<b>211.8</b>	<b>669.1</b>	<b>399.8</b>

**Media**

Método 7	Método 8	Método 9	Método 10	Método 11
601	463	616	446	400
602	463	615	445	400
601	463	616	447	400
601	465	614	446	401
600	464	615	446	400
600	463	614	446	401
600	464	616	445	400
600	464	616	447	402
601	463	615	447	400
602	463	615	446	400
<b>600.8</b>	<b>463.5</b>	<b>615.2</b>	<b>446.1</b>	<b>400.4</b>

**Media**

Gran Media	478.1
SCD	57.6
SCE	12124.5

F	21.2622
---	---------

Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias poblacionales con un nivel de significación del 5%

Método 1	Neem	Agua	agregado sobre el hongo
Método 2	Ajo	hexano	med de cultivo
Método 3	Ajo	Agua	med de cultivo
Método 4	Neem	Agua	med de cultivo
Método 5	Cebolla	Hexano	agregado sobre el hongo
Método 6	Neem	Hexano	med de cultivo
Método 7	Ajo	Agua	agregado sobre el hongo
Método 8	Ajo	Hexano	agregado sobre el hongo
Método 9	Neem	Hexano	agregado sobre el hongo
Método 10	Cebolla	Hexano	med de cultivo
Método 11	Cebolla	Agua	agregado sobre el hongo

ANÁLISIS DE VARIANZA EN LAS MEDICIONES DE ÁREA

48H

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
0.5128	0.0449	0.1026	0.2949	0.3974	0.0705
0.5385	0.0513	0.0897	0.3141	0.0631	0.0833
0.4936	0.0641	0.0962	0.2692	0.3974	0.2051
0.3974	0.0577	0.1474	0.2308	0.3782	0.109
0.5256	0.0384	0.0769	0.2628	0.3846	0.1282
0.5321	0.0592	0.0883	0.2692	0.3782	0.1154
0.5128	0.0577	0.0897	0.2756	0.3974	0.0769
0.5385	0.0705	0.0962	0.2885	0.4167	0.0641
0.5513	0.0449	0.0897	0.2949	0.4295	0.0833
0.4871	0.0513	0.1026	0.3013	0.3846	0.1218
<b>0.5090</b>	<b>0.0540</b>	<b>0.0979</b>	<b>0.2801</b>	<b>0.3627</b>	<b>0.1058</b>

Media

6.609  
7.486  
13.0539  
**3.7564**  
30.9053

Método 7	Método 8	Método 9	Método 10	Método 11
0.3782	0.4743	0.3718	0.0833	0.2949
0.3526	0.4231	0.4551	0.1154	0.4744
0.2436	0.3141	0.5513	0.0897	0.1987
0.5321	0.4359	0.5321	0.0705	0.3141
0.3846	0.4487	0.3654	0.0962	0.2885
0.3462	0.4295	0.4489	0.1026	0.2564
0.25	0.4423	0.5449	0.109	0.2436
0.5385	0.4359	0.5385	0.1154	0.2308
0.5256	0.4551	0.359	0.0897	0.2179
0.5728	0.4423	0.4615	0.0897	0.2756
<b>0.4124</b>	<b>0.4301</b>	<b>0.4629</b>	<b>0.0962</b>	<b>0.2795</b>

Media

Gran Media	<b>0.2810</b>
SCD	<b>0.4046</b>
SCE	<b>2.8115</b>

F 2.8073

Se acepta la hipótesis de igualdad de al menos dos medias poblacionales con un nivel de significación del 5%

96H

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
4.25	1.2821	0.7372	0.9423	4.3846	1.9295
3.8526	1.6282	0.6026	0.9872	4.1859	1
3.9615	2.6667	0.9103	0.968	3.0385	1.3013
3.1474	2.2756	1.0321	0.9295	3.4615	1.2949
4.2564	1.3461	0.9231	0.9615	4.359	1.2949
3.8782	1.3333	0.9359	0.9551	5.0641	1.0128
3.968	1.4102	0.9295	0.9744	4.3782	1.0256
4.1667	1.359	1.0385	1	4.1987	1.3077
4.218	1.3782	1.0513	0.9936	4.1667	1.3205
3.9871	1.354	1.0577	0.9808	4.2308	1.3333
<b>3.9686</b>	<b>1.6033</b>	<b>0.9218</b>	<b>0.9692</b>	<b>4.1468</b>	<b>1.2821</b>

**Media**

Método 7	Método 8	Método 9	Método 10	Método 11
4.6282	4.0513	2.6795	2.5577	3.8846
4.0385	3.2885	3.4359	0.891	3.359
4.0449	3.0064	4.6346	2.7564	2.5
2.5064	3.2949	4.2949	0.9231	2.5
4.6346	4.0385	2.6859	0.8974	2.5321
4.0448	3.9744	3.4295	0.9038	2.5128
4.0385	3.9615	4.2821	0.9615	2.4354
4.6	3.9487	2.6923	0.9038	2.5256
4.6218	3.3333	3.4423	0.9551	2.5285
4.0513	3.9374	3.4615	0.8846	2.5221
<b>4.121</b>	<b>3.683</b>	<b>3.504</b>	<b>1.263</b>	<b>2.730</b>

**Media**

Gran Media 2.5630  
SCD 23.1776

SCE 445.5342

F 1.9417

Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias poblacionales con un nivel de significación del 5%

144H

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
5.8654	6.0449	1.4615	3.1603	5.0833	2.032
7.9039	5.4359	2.2115	1.1923	7.1987	1.5256
6.7564	4.1154	1.6539	1.6218	6.3397	2.6387
7.7628	4.1026	2.141	2.5513	6.109	2.3013
7.1346	4.0961	2.1538	1.2051	6.0897	3.0641
7.6975	4.0769	2.1667	1.2169	6.1218	1.5385
7.1795	4.1346	2.2667	1.2821	6.1282	2.0513
7.75	4.2308	2.1795	1.2564	6.2821	1.5769
7.2436	4.0385	2.1923	1.1538	6.2949	1.5705
7.1539	3.9808	2.141	1.2244	6.3397	1.5897
<b>7.2448</b>	<b>4.4257</b>	<b>2.0568</b>	<b>1.5864</b>	<b>6.1987</b>	<b>1.9889</b>

Media

Método 7	Método 8	Método 9	Método 10	Método 11
4.39	5.8654	6.0577	3.5769	5
4.109	6.7821	4.9285	3.8141	3.2692
4.1154	4.9744	5.4231	3.5385	5.3141
3.9744	5.2821	4.7244	2.8974	3.8974
4.0962	5.2564	6.0449	3.5897	3.9231
4.109	5.25	4.9359	2.9359	3.9744
3.9872	5.2244	5.4167	2.9487	3.8846
4.1218	5.2308	5.3974	2.9551	3.8462
3.9679	5.2051	4.7179	3.5961	3.3333
3.9808	5.2692	4.7436	3.5961	3.9744
<b>4.0852</b>	<b>5.4340</b>	<b>5.2390</b>	<b>3.3449</b>	<b>4.0417</b>

Media

Gran Media	4.1496
SCD	24.2564
SCE	494.6011

F	2.0597
---	--------

Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias poblacionales con un nivel de significación del 5%

192H

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
9.5385	9.8077	3.3013	2.0513	8.3974	7.2308
10.4359	10.1923	2.6603	1.1923	8.2592	5.6795
10.8013	11.3077	2.3397	1.6346	7.7895	7.4539
8.0833	10	3.2756	2.5577	6.8846	6.1859
10.4615	10.1603	3.3013	1.2115	7.7564	7.2564
10.5792	10.1282	3.3141	1.2308	7.7692	7.2949
10.3974	10.1218	3.2756	1.2949	7.7949	7.3077
10.7692	10.2244	3.2885	1.2756	8.2436	7.6282
10.5641	10.2564	3.2691	1.1667	8.2051	7.6154
10.4551	10.0641	3.2885	1.2564	8.2179	7.2436
<b>10.2086</b>	<b>10.2263</b>	<b>3.1314</b>	<b>1.4872</b>	<b>7.9318</b>	<b>7.0896</b>

**Media**

Método 7	Método 8	Método 9	Método 10	Método 11
12.2628	7.2244	5.6987	8.2436	6.6923
12.6858	6.3205	5.7051	8.5641	6.5192
12.56	7.577	5.9872	9.4936	9.391
12.26	6.3141	5.4359	8.2692	6.9744
12.2623	6.4744	5.7051	8.2692	6.5385
12.6923	6.4615	7.6987	8.2756	6.5705
12.5	6.4487	5.9744	8.2821	6.5064
12.2	6.4167	5.4231	8.2436	6.5128
12.2564	6.4531	5.4423	8.2564	6.5513
12.6795	6.4167	5.4166	8.2821	6.5641
<b>12.4359</b>	<b>6.6107</b>	<b>5.8487</b>	<b>8.4180</b>	<b>6.8821</b>

**Media**

Gran Media	7.2973
SCD	31.0052
SCE	990.1569

F	3.2258
---	--------

Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias poblacionales con un nivel de significación del 5%

Método 1	neem	agua	asperjado
Método 2	ajo	hexano	med de cultivo
Método 3	ajo	agua	med de cultivo
Método 4	neem	agua	med de cultivo
Método 5	cebolla	hexano	asperjado
Método 6	neem	hexano	med de cultivo
Método 7	ajo	agua	asperjado
Método 8	ajo	hexano	asperjado
Método 9	neem	hexano	asperjado
Método 10	cebolla	hexano	med de cultivo
Método 11	cebolla	agua	asperjado



192H

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6
610	340	500	212	670	400
611	341	501	213	669	399
610	341	500	211	668	399
611	340	501	212	669	401
612	340	500	211	668	399
611	341	502	212	670	399
610	342	500	213	670	399
610	340	501	211	669	401
611	340	501	211	669	401
610	340	502	212	669	400
<b>610.6</b>	<b>340.5</b>	<b>500.8</b>	<b>211.8</b>	<b>669.1</b>	<b>399.8</b>

**Media**

Método 7	Método 8	Método 9	Método 10	Método 11
601	463	616	446	400
602	463	615	445	400
601	463	616	447	400
601	465	614	446	401
600	464	615	446	400
600	463	614	446	401
600	464	616	445	400
600	464	616	447	402
601	463	615	447	400
602	463	615	446	400
<b>600.8</b>	<b>463.5</b>	<b>615.2</b>	<b>446.1</b>	<b>400.4</b>

**Media**

<b>Gran Media</b>	<b>478.1</b>
<b>SCD</b>	<b>57.6</b>
<b>SCE</b>	<b>12124.5</b>

F 21.2622

Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias poblacionales con un nivel de significación del 5%

Método 1	neem	agua	asperjado
Método 2	ajo	hexano	med de cultivo
Método 3	ajo	agua	med de cultivo
Método 4	neem	agua	med de cultivo
Método 5	cebolla	hexano	asperjado
Método 6	neem	hexano	med de cultivo
Método 7	ajo	agua	asperjado
Método 8	ajo	hexano	asperjado
Método 9	neem	hexano	asperjado
Método 10	cebolla	hexano	med de cultivo
Método 11	cebolla	agua	asperjado