

**EFFECTO Y EVALUACIÓN IN-VITRO DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Trifolium repens* L. (trébol blanco) PARA EL CONTROL DE *Fusarium
oxysporum* Schlechtend.**

FREDDY ALEXANDER BONILLA RAMIREZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2010**

**EFFECTO Y EVALUACIÓN IN-VITRO DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Trifolium repens* L. (trébol blanco) PARA EL CONTROL DE *Fusarium
oxysporum* Schlechtend.**

FREDDY ALEXANDER BONILLA RAMIREZ

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

**DIRECTORA: M. Sc. SANDRA RIVAS
ASESOR: M. Sc. NELSON ROJAS MARTINEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2010**

Nota de Aceptación

Directora: _____

M.Sc Sandra C. Rivas Zúñiga

Asesor: _____

M.Sc Nelson Rojas

Jurado: _____

M.Sc. Giovanni Varona

Jurado: _____

Dr. Fabio Cabezas

Fecha de Sustentación:

Dedicado a mis padres, quienes con su infinito amor, esfuerzo y dedicación, me formaron para ser la persona que, gracias a Dios, hoy soy, a mi hermano por inculcarme la disciplina deportiva que tantas satisfacciones me ha traído y a Francy Gutiérrez Ceballos por todo el amor brindado durante todos estos años.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

En principio quisiera agradecer a Dios por brindarme la vida y hacer así posible la realización de este trabajo, a la profesora M.Sc Sandra Rivas, quien más que directora de tesis, ha sido una amiga incondicional y que gracias a su eterna disponibilidad y compromiso, fue posible la culminación con éxito de este proyecto.

Al profesor M.Sc Nelson Rojas por el conocimiento y los consejos aportados a lo largo de mi carrera y más aun este trabajo.

A los profesores Giovanni Varona, Gerardo Nandourf, Fabio Cabezas, Silvio Carvajal, a los auxiliares de laboratorio Jhon Meléndez, Betty Piamba Ruiz y en especial a Darwin Hoyos por su valiosa colaboración, a mis amigos Lina María Fletcher y Leonardo David Pinzón, por todos los buenos momentos vividos tanto en la universidad como fuera de ella. A mis compañeros del grupo de Biología Celular y Molecular que con su compañía y ayuda constante hicieron las jornadas de laboratorio más enriquecedoras y placenteras.

A mis padres y hermano, por su apoyo y paciencia infinita frente a la oportunidad de ver materializada una de mis metas y de las suyas. También a mi novia por todos estos años de comprensión, apoyo y amor sincero.

Y por último un sincero agradecimiento, a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo de grado.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1. JUSTIFICACIÓN	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GENERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. ANTECEDENTES	17
4. MARCO REFERENCIAL	21
4.1 FLAVONOIDES	21
4.1.1 Algunos tipos de Flavonoides	22
4.2 DESCRIPCION DEL HONGO	23
4.3 DESCRIPCION DE <i>Trifolium repens L.</i>	25
4.4 METODOS DE CONTROL	26

5. METODOLOGIA	27
5.1 LOCALIZACION	27
5.2 AISLAMIENTO DEL PATOGENO	27
5.3 PREPARACION DEL INOCULO	28
5.4 PREPARACION DE EXTRACTO VEGETAL	29
5.5 PRUEBAS QUIMICAS CUALITATIVAS	31
5.5.1 Pruebas para determinar flavonoides	31
5.5.1.1 Prueba de Shinoda	31
5.5.2 Pruebas para determinar alcaloides	31
5.5.2.1 Prueba de Dragendorff	31
5.6 CROMATOGRAFÍA BIDIMENCIONAL	32
5.7 ANÁLISIS EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VISIBLE	33
5.8 EVALUACION DEL EXTRACTO VEGETAL SOBRE EL PATOGENO	33
5.9 DISEÑO EXPERIMENTAL	35
5.9.1 Procesamiento y análisis estadístico	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36

7. CONCLUSIONES	56
8. RECOMENDACIONES	57
9. BIBLIOGRAFIA	58

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Prueba de Kruskal-Wallis ANOVA (Días vs. Tratamientos)	37
Tabla 2. Porcentajes de inhibición de cada una de las concentraciones del extracto frente al control positivo benomil (Benlate).	40
Tabla 3. Tabla de relación entre el color de la mancha y la estructura de los flavonoides	43
Tabla 4. Valores del Rf y color para cada una de las manchas	46
Tabla 5. Datos cromatográficos y espectroscópicos de <i>Trifolium repens</i> L.	47

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Quercetina Flavonoide.	21
Figura 2. Formononetina Isoflavonoide	23
Figura 3. Vista macro y microscópica de <i>Fusarium oxysporum Schlechtend</i>	24
Figura 4. <i>Trifolium repens</i> L.	25
Figura 5. Medición en técnica de difusión por discos	34
Figura 6. Fotografías de los halos de inhibición. a) Benomil, b) concentración 2%, c) concentración 1,5%, d) concentración 0,5%.	39
Figura 7. Cromatograma	42
Figura 8. Cromatograma bajo luz UV	43
Figura 9. Cromatografía de <i>Trifolium repens</i> L.	45
Figura 10. Plantilla de distribución de los flavonoides en el cromatograma	46
Figura 11. Análisis en espectrofotómetro	50
Figura 12. Coloración Prueba de Shinoda en capsulas de porcelana	52
Figura 13. Coloración Prueba de Shinoda en tubo de ensayo	52

Figura 14. Prueba de Dragendorff en tubo de ensayo 53

Figura 15. Diámetro de los halos de inhibición vs. Tiempo en días. 55

RESUMEN

Se evaluó la actividad fungicida del extracto etanólico de *Trifolium repens* L sobre el hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend, se utilizaron tres diluciones del extracto (0,5 %, 1,5 % y 2 %), un control positivo y otro negativo, observando que todas las concentraciones del extracto utilizadas tuvieron efecto inhibitorio frente al patógeno.

El diseño experimental utilizado, fue el de bloques completamente aleatorizados y los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza para medidas repetidas, complementado con la prueba de comparaciones múltiples para muestras con varianzas no homogéneas como la T3 de Dunnett.

Los porcentajes de inhibición al concluir el experimento fueron 76,43%, 72, 5% y 45,84%, en las concentraciones 2%, 1,5% y 0,5%, respectivamente. El control positivo presentó el valor más alto (100%) de inhibición dada su naturaleza química y el control negativo (0%) no mostro ninguna actividad fungicida.

Mediante el análisis estadístico se pudo determinar que las concentraciones 2% y 1,5% presentaron un efecto antifúngico muy similar frente a *F. oxysporum* Schlechtend, probablemente debido a factores externos como luz solar o la temperatura ambiente a la que estuvo sometido el extracto.

Palabras Claves: Fungicida, *Trifolium repens* L, *Fusarium oxysporum* Schlechtend, extracto etanólico.

INTRODUCCIÓN

La preocupación existente en el mundo por el uso de agentes químicos para el control de enfermedades en las plantas, ha impulsado al estudio de otras posibilidades para el control y manejo de las mismas, mediante el uso de productos naturales. Sabemos que la posibilidad de daños que puede ocasionar en el hombre y en la naturaleza la utilización de productos químicos es preocupante, se conocen estudios de metabolitos derivados de sustancias químicas que poseen un efecto acumulativo en plantas y suelos; además, estos compuestos contaminantes, por el fenómeno de escorrentías pueden llegar a los ríos y quebradas de donde se toma el agua para consumo humano.

En Colombia como en muchos otros países del mundo la investigación en este tema apenas empieza, en la actualidad se ha comenzado a tener moderación con la utilización de agentes químicos, no solo por el daño que estas sustancias pueden ocasionar al hombre, sino también al medio ambiente. Es así como surgen nuevas propuestas para controlar estas enfermedades, teniendo en cuenta que hoy es posible hacer un manejo integrado con los diferentes métodos que han surgido.

Se reporta que la enfermedad fusariosis producida por *Fusarium oxysporum* Schlechtend está entre las más limitantes y la que mayores pérdidas ocasiona en nuestro país y el mundo desde hace aproximadamente veinte años, donde mucho material vegetal contaminado proveniente de otros países facilito la dispersión del hongo. En Colombia además del plátano, uno de los de los cultivos que más ataques recibe de *F. oxysporum* Schlechtend es el del clavel, debido a la fácil propagación del patógeno a través de esquejes infectados, a la resistencia del hongo a condiciones adversas, al alto costo y la relativa baja eficiencia de las medidas de control utilizadas. En otros países la enfermedad produce grandes pérdidas económicas debido a la alta incidencia en cultivos comerciales como frijol, arroz, cebada y frutas, entre otros.

Por tal motivo, nació el interés de buscar una alternativa diferente en el manejo de esta enfermedad, cuyo agente causal es el hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend, patógeno que ataca a un gran número de especies vegetales y es de gran importancia por su alto grado de virulencia. El trabajo propuesto estuvo encaminado a evaluar la efectividad de un metabolito secundario de tipo flavonoide, sustancia presente en las plantas; esperando así que el extracto vegetal tenga un efecto fúngicida sobre el patógeno, con el fin de ayudar a combatir la Fusariosis.

Es necesario continuar investigando al respecto, ya que la información existente en el país y en especial en el Departamento del Cauca sobre la utilización de agentes naturales o de origen biológico es mínima, conjuntamente esto servirá para proponer alternativas o métodos que permitan disminuir al máximo los riesgos que ocasiona la utilización de agentes químicos para el manejo de fitopatógenos, y además de esto optimizar estos productos para que sean iguales o mejores que los productos químicos a la hora de tratar las enfermedades en plantas.

1. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades producidas por organismos fitopatógenos tales como bacterias, nemátodos u hongos constituyen generalmente la mayor causa de pérdidas en la producción agrícola. Dentro de estos, los hongos comprenden uno de los grupos más influyentes tanto por su diversidad como por las pérdidas que originan a nivel económico. La persistencia de varias de las especies de hongos fitopatógenos tales como *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn y *Fusarium oxysporum* Schlechtend ha aumentado durante los últimos años debido a los cambios que se han presentado en las prácticas agrícolas por el uso irresponsable que se le ha dado a los productos químicos al igual que la contaminación que estos generan, con efectos nocivos en los cultivos de interés económico y también sobre otros organismos que allí prosperan (Benítez *et al.*, 2004).

Fusarium oxysporum Schlechtend, es un patógeno de amplio espectro, tiene formas articulares especializadas a distintos cultivos y también tienen la capacidad de atacar a otros cultivos cuando entran en contacto con ellos. Cambios en las condiciones ecológicas pueden variar la fisiología del hongo incrementando su patogenicidad. Cabe añadir que los estudios han sido a nivel de laboratorio y no se puede predecir con exactitud su comportamiento en el medio natural, pero una cosa si es segura, y es que provoca una serie de alteraciones en las plantas atacadas, manifestándose con una gran diversidad de síntomas que afectan de diferente forma al normal crecimiento y desarrollo con la consiguiente repercusión en la producción, si se trata de cultivos económicos y la destrucción de especies nativas. Hasta el momento no se ha encontrado cura alguna para la enfermedad, ya que los productos aplicados solo brindan tratamiento preventivo contra la misma; otras posibilidades surgen al respecto como el desarrollo de variedades resistentes mediante manipulación genética de las plantas hospedantes.

La inquietud de desarrollar este trabajo surge de la necesidad a la que se ha visto forzada la agricultura, para controlar las diferentes enfermedades que atacan a diversos cultivos en todo el territorio Colombiano, y cuya práctica es esencialmente tradicional, extensiva y de muy baja producción. La razón de este atraso radica en la poca disponibilidad de recursos tecnológicos, la pobreza de nutrientes en los suelos y la utilización de estos para cultivos de subsistencia diaria y no para cultivos a gran escala, que pueden generar beneficios no solo para la economía del Departamento del Cauca sino de todo el país.

Por lo anterior, se pretende desarrollar una alternativa de manejo de Fusariosis con productos naturales, con el fin de minimizar los efectos nocivos que pueden producir los agentes químicos tradicionales utilizados en el mantenimiento de las producciones agrícolas y que en la actualidad son aplicados en altas dosis siendo categorizados toxicológicamente en niveles II y III (Volcy, 1990). Más aún, conociendo que la aplicación de sustancias químicas ha originado deterioro en la salud de las familias dedicadas a las labores agrícolas y a los consumidores de productos procedente de estos lugares. Por otro lado, los tóxicos provenientes de los productos químicos utilizados ocasionan daño no sólo al patógeno que se quiere controlar sino también a otros sistemas de vital importancia en estas zonas.

2 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del extracto etanólico de *Trifolium repens* L. para el control de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Aislar en condiciones in-vitro el patógeno *Fusarium oxysporum* Schlechtend a partir de frutos afectados de *Passiflora edulis* Sim.

Determinar el efecto del extracto etanólico sobre el crecimiento radial del micelio de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.

Establecer las concentraciones del extracto a las cuales se presenta inhibición del hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend.

3 ANTECEDENTES

En su libro "The flavonoids", Harborne, *et al.*, (1975), desarrollaron una investigación en la que hacen referencia a la utilización del extracto vegetal de *Trifolium subterraneum* L. contra *Sclerotinia trifoliorum* Erikss y *Fusarium nivale* (Schaffnit) e Müll, mencionando que la sustancia conocida como formononetina compuesto isoflavonoide, obtenido del trébol rojo (*Trifolium subterraneum* L.), es el agente activo causante del control de estos dos fitopatógenos; aclarando que el reporte encontrado esta sujeto ha posteriores investigaciones de los isoflavonoides como agentes fúngicos.

De los estudios realizados en Colombia no se tiene evidencia clara de la utilización del extracto etanólico de *Trifolium repens* L. como controlador de hongos fitopatógenos. Se sabe que algunas comunidades agrícolas en el país utilizan ciertos preparados de diversas plantas para controlar algunas enfermedades (Comunicación personal, Solarte, 2007) pero no se conoce con certeza sobre la utilización de esta sustancia.

Para el control de enfermedades ocasionadas por otros patógenos se conocen investigaciones con aplicaciones de extractos de plantas como la de Alcalá de Marcano *et al.*, (2005), quienes probaron el efecto antifúngico de extractos de tártago, *Ricinus communis* L.; albahaca, *Ocimum basilicum* L.; mastuerzo, *Lepidium virginicum* L.; ajo, *Allium sativum* L.; nim, *Azadirachta indica* A. Juss y los fungicidas benomil (Benlate) e iprodione (Rovral) sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* Sacc y *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris. Encontrando que todos los extractos y fungicidas probados manifestaron algún tipo de actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii* Sacc y *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris, en medio papa dextrosa (PD), resultando en el caso del ajo, una inhibición total del crecimiento hasta los 7 días. Benomil y ajo redujeron el crecimiento de *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris virtualmente a cero durante 21 días. Se encontraron diferencias significativas con iprodione (79%), benomil (54,1%) y tártago (8,3%), en relación al testigo. El número de esclerocios fue menor en los tratamientos ajo, nim y

benomil en comparación con el testigo (27,6; 49,3; 68,3 esclerocios vs 143,5 esclerocios). Según estos resultados el ajo podría considerarse como una alternativa a ser incorporada en una estrategia de manejo de estos hongos.

Otros estudios como el de Rodríguez y Montilla, (1999); muestran el efecto de la aplicación de citrex (CitruPar80MR, extracto de semilla de *Citrus paradisi* Macfad) sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en condiciones *in vitro* y en hojas de papa, en el que se propone la aplicación del producto en el medio de cultivo a diferentes concentraciones para observar el crecimiento de las colonias mediante la técnica de discos y sobre el follaje de papa. Los resultados indicaron que citrex tuvo un efecto controlador del crecimiento *in vitro* de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary pero causó toxicidad en hojas de papa.

Así mismo Lugo y Domínguez, (1999); estudiaron el efecto de extractos naturales y fungicidas comerciales para el control de *Alternaria solani* (Cooke) Wint en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), con un ensayo en campo en el que aplicaron tratamientos de Dithane M- 45, extracto a base de sábila, extracto a base de nim, Daconil, Kumulus y un tratamiento control (mezclas de productos que aplica el productor: Zineb Milgo Corsario), con una frecuencia de 15 días, en bloques al azar, con cuatro repeticiones y en diferentes parcelas; en donde se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad en hojas. El tratamiento a base de extracto de sábila presentó los valores de severidad de la enfermedad mas bajos, los tratamientos con Daconil y el control presentaron valores similares. En contraste, los tratamientos a base de nim y kumulus presentaron incrementos en el nivel de severidad. Estos resultados indican que la enfermedad puede manejarse mediante la aplicación de extractos de sábila ya que fue el tratamiento que alcanzó los niveles más altos de control.

En Cuba, Cartaya, *et al.*, (2001), en su trabajo “Extractos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre hongos fitopatógenos”, obtuvieron los extractos acuoso y alcohólico de albahaca así como su aceite esencial por hidrodestilación, los cuales después de realizado el correspondiente análisis químico cualitativo, fueron evaluados *in vitro* para conocer su

efecto sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos, encontrando así que en todos los casos, se inhibió el crecimiento micelial.

Complementariamente Márquez, *et al.*, (2007), propone el estudio preliminar actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit (ultimorrial), en el cual evalúa cuatro diferentes concentraciones 3.33, 6.66, 10.00 y 13.33mg/mL de este extracto total y sus fraccionamientos en Diclorometano y Acetato de etilo para determinar el efecto que este puede ocasionar sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Obteniendo como resultado que el extracto etanólico total de las hojas de la planta en mención carece de actividad antifúngica en la concentración de 6.66mg/mL, mientras que la fracción en Diclorometano presento mayor actividad fungicida que el extracto etanólico y la fracción acetato de etilo contra el patógeno en las concentraciones 6.66, 10.00 y 13.33mg/mL.

De igual forma en Costa Rica, Mendoza, *et al.* (2007), llevaron a cabo la evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, donde evaluaron 28 extractos etanólicos provenientes de raíces, tallos, hojas, flores y frutos de 13 especies de plantas pertenecientes a 8 diferentes familias colectadas en la reserva forestal de la Universidad EARTH. Junto con estos extractos también fueron evaluados otros 65 obtenidos de otras 24 especies clasificadas dentro de otras 13 familias de plantas y llevados a una concentración de 2500mg/L disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO), para ser utilizados posteriormente en los bioensayos. Los 93 extractos etanólicos obtenidos a partir de las 37 especies vegetales y que se evaluaron a la concentración anteriormente descrita sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. no mostraron inhibición en el crecimiento micelial en los fitopatógenos estudiados.

En México, Hernández, *et al* (2007), plantean la prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas, en donde se evaluaron 18 extractos acuosos y en polvos sobre el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. &

Sacc y solo los extractos de ajo (*Allium sativum* L.), acuyo (*Piper auritum* HBK.), guayaba (*Psidium guajava* L.) y Eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus* Labill.) redujeron significativamente el crecimiento micelial en 54.3, 48.8, 47.7 y 39 % respectivamente, encontrando también que la actividad fungistática difiere entre los extractos acuosos y en polvos; también se evidenció un efecto fungistático selectivo que depende de la especie de planta y del patógeno.

Benitez, et al (2007), evaluaron el efecto de extractos vegetales en el crecimiento de *Rhizoctonia solani* kün in vitro y en plantas de frijol susceptible. Las especies vegetales utilizadas para los extractos fueron *Allium sativum* L, *Larrea tridentata*, *Nicotiana glauca* y *Caryophyllus aromaticus*, y como testigos in vitro el fungicida tiabendazol, MSD en dosis de 600 ppm y el hongo creciendo en PDA sin extracto ni fungicida. El efecto de los extractos se estimó determinando el porcentaje de inhibición con respecto al testigo absoluto a las 72 y 144 h de incubación del hongo, dando como resultado diferencias altamente significativas entre extractos, concentraciones e interacción entre estos; El tiabendazol tuvo un efecto inhibitorio de 100 % en los dos periodos de incubación del hongo. Los extractos de *C. aromaticum* y *L. tridentata* resultaron estadísticamente iguales al fungicida, mientras que *A. sativum* L. aumentó su efecto inhibitorio al aumentar la concentración del extracto en el medio de cultivo, pero al incrementar el tiempo de incubación, el efecto inhibitorio disminuyó en las dos concentraciones del extracto y a las 144 h, el hongo ya había reiniciado su crecimiento.

4. MARCO REFERENCIAL

Es bien sabido que las plantas poseen una gran cantidad de compuestos químicos o metabolitos secundarios, moléculas que son sintetizadas en fases tardías del ciclo de crecimiento de la planta. Estas moléculas son necesarias en un gran número de procesos biológicos llevados a cabo en los vegetales. En estado natural, sus funciones se encuentran ordenadas a la conservación de la especie, pero cuando los organismos que los producen se desarrollan en cultivos puros, los metabolitos secundarios no desempeñan esa misión (Narváez, 2005).

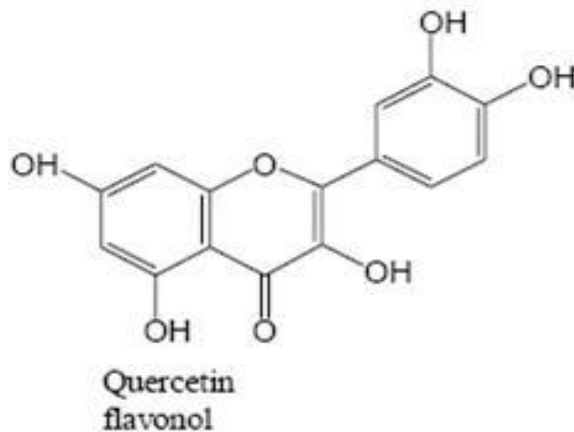
4.1 FLAVONOIDES

Desde hace mucho tiempo se ha hablado de la gran cantidad de bondades que poseen los flavonoides, compuestos ampliamente repartidos en la naturaleza, se originan a través de la combinación de la ruta del acetato y del sikimato, vías mediante las cuales se biosintetiza la estructura diaril-propánica (condensación de un triacetato que origina el anillo A y de un ácido cinámico que da lugar al anillo B). En la naturaleza pueden encontrarse tanto en forma libre (geninas) como combinados con azúcares mediante uniones O- y C-heterosídicas. La mayoría de ellos están constituidos por un núcleo bencénico unido a una γ - pirona, incluyendo además en distintas posiciones, C-1, C-2 o C-3, un segundo anillo bencénico dando lugar a los neoflavonoides, flavonoides propiamente dichos o a los isoflavonoides respectivamente. Con esta estructura existen un número elevado de compuestos distintos que pueden clasificarse en función del grado de oxidación del anillo piránico central (Harborne, *et al.* 1975).

Para los vegetales, estos compuestos son importantes pues, además de ser responsables de las coloraciones de muchas flores, frutos y hojas, también intervienen en la polinización atrayendo a los insectos, participan en la vida del vegetal ejerciendo

importantes funciones como por ejemplo protegerle de los efectos nocivos de la radiación UV y ejercer una eficaz actividad antioxidante, ver figura 1.

Figura 1. Quercetina Flavonoide

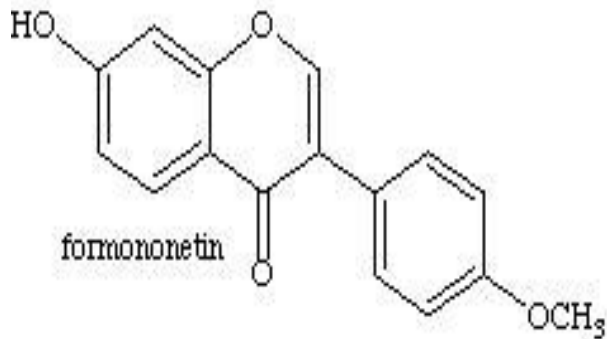


4.1.1 Algunos tipos de flavonoides

Existen diferentes tipos de flavonoides, entre los cuales podemos nombrar las flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianinas, catequinas y en especial los isoflavonoides, cuya actividad biológica estrogénica, insecticida y antifúngica es bien conocida. En la actualidad están adquiriendo una gran importancia pues algunos de ellos han mostrado un interesante efecto estrogénico débil pero relativamente selectivo sobre los receptores β -estrogénicos lo que les hace ser de utilidad en el tratamiento de la sintomatología asociada al climaterio además de actuar como inhibidores de tirosinakinasa y por tanto capaces de reducir la proliferación celular. Es el caso de la genisteína (5,7,4'-trihidroxi-isoflavona) y daidzeína (7,4'-dihidroxi-isoflavona) localizadas en la soja. Es en este último grupo (los isoflavonoides) en el cual se concentrara este trabajo, ya que se asume que la posible actividad fungicida de la sustancia a evaluar se cree que tiene una cantidad considerable de este grupo de compuestos que a su vez se le responsabiliza de la inhibición en el crecimiento de un pequeño número de hongos fitopatógenos, ver figura 2 (Bahorun, *et al.*1996).

Figura 2. Formononetina Isoflavonoide

7-hydroxy-4'-methoxyisoflavona



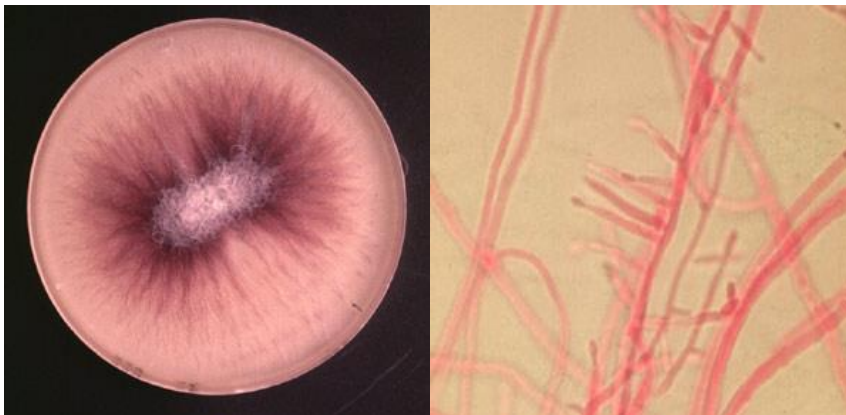
4.2 DESCRIPCIÓN DEL HONGO

Los hongos del género *Fusarium* son cosmopolitas y muy abundantes en las zonas tropicales y templadas del mundo. Además este género es uno de los que más causa daño a diversas plantas cultivadas, ocasionando distintos tipos de enfermedades, tales como manchas en las hojas, pudrición de raíces y de la base del tallo, cánceres de las plantas, muerte descendente, pudrición de frutos y marchitamientos vasculares. También presenta especies que ocasionan enfermedades en el hombre y en los animales y algunas son productoras de toxinas (Grose y Cotes, 1988).

Fusarium oxysporum Schlechtend es una de las más importantes especies del género *Fusarium*, debido a las pérdidas económicas que causa en los cultivos comerciales. Está entre las especies más abundantes, cosmopolitas y complejas pues tiene más de 100 formas especiales caracterizadas por su alta especificidad en las plantas hospedantes que afecta; (Armstrong y Armstrong, 1981). En lo que concierne a su especificidad, existen varias discusiones sobre la probabilidad de contaminar a otros cultivos; existen trabajos en los que se ha obtenido como resultado que el *Fusarium* específico que ataca al frijol (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*) infectó al clavel y al rábano con un porcentaje de infestación del 20 y 47% respectivamente (Toussoun y Cook, 1981).

En cuanto a la morfología microscópica tenemos que la forma y tamaño de las esporas es una característica fundamental para el reconocimiento de los hongos pertenecientes al género *Fusarium*. Las esporas se encuentran dispersas en el micelio aéreo o en esporodoquios. Los macroconidias son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoides, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas; teniendo en cuenta que no siempre son producidos ambos tipos de esporas (Booth, 1971).

Figura 3. Vista Macroscópica y Microscópica de *Fusarium oxysporum* Schlechtend



Carrillo L. 1990

El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso como un fieltro o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es limoso. Los pigmentos que difunden en el agar varían mucho de color o tono debido al pH en el que se encuentre el mismo. Los colores que se presentan en las colonias pueden ser el blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo, especialmente en el reverso de la colonia, a excepción del pardo oscuro o negro (Figura 3).

4.3 DESCRIPCIÓN DE *Trifolium repens* L.

El trébol blanco como se conoce vulgarmente o *Trifolium repens* L. perteneciente a la familia de las *Leguminosas* es una planta perenne que oscila entre 10-50 cm de altura. Tallos rastreros y enraizantes. Hojas trifoliadas, folíolos obovados, denticulados, a menudo con una mancha blanca en el haz. Estípulas bruscamente estrechadas en el ápice. Flores con corola blanca o rosada, membranosas en la fructificación; presentan una pequeña bráctea en su base. Cáliz con 10 nervios. Flores agrupadas en cabezuelas globosas, pedunculadas. Las semillas son lisas, en forma de corazón y van desde el color amarillo luminoso hasta amarillo castaño, de modo que se oscurecen con el tiempo. El interés de trabajar con esta especie surge del trabajo realizado por Harborne, *et al.*, (1975), donde llegan a conclusión que *Trifolium subterraneum* L. ejercía un efecto fungicida sobre *Sclerotinia trifoliorum* Erikss y *Fusarium nivale* (Schaffnit) e Müll, y que el compuesto conocido como formononetina, isoflavonoide presente en esta especie era el responsable de dicho control. Teniendo en cuenta que *Trifolium subterraneum* L. no se desarrolla en estas latitudes se recurrió a la especie descrita anteriormente (*Trifolium repens* L.), perteneciente al mismo género, ver figura 4.

Figura 4. *Trifolium repens* L.



4.4 METODOS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Realmente en Colombia aun se sigue con las practicas tradicionales para el control de enfermedades, en el cual se ha realizado utilizando todas las técnicas de manejo integrado de la misma, como las medidas de prevención, mediante el cumplimiento de las normas sanitarias para el transporte de material vegetal, erradicación, las cuarentenas cuando se requieran, semillas sanas, escape, predicción, saneamiento, control biológico en algunos casos, control químico y otras practicas de control cultural, todas estas aplican para una gran cantidad de cultivos de interés económico en las diferentes regiones del país. En el caso particular de la enfermedad producida por *Fusarium oxysporum* Schlechtend, no hay un tratamiento curativo, todo lo que se encuentra hoy en día es preventivo; actualmente se han venido desarrollando investigaciones y la manipulación genética mediante variedades resistentes parece ser la solución al problema.

5. METODOLOGIA

5.1 LOCALIZACIÓN:

El desarrollo de este trabajo se llevo a cabo en las instalaciones de los laboratorios de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación de la Universidad del Cauca. La temperatura promedio de la zona es de 19°C, humedad relativa anual del 74%, presión de 1020 (Mbs), precipitación anual de 2417 mm, y una altura de 1750 m.s.n.m.

5.2 AISLAMIENTO DEL PATÓGENO:

Para la obtención del patógeno, se recolectó material vegetal (frutas que presentan la sintomatología de la enfermedad), además se realizó una observación al microscopio de los tejidos para la confirmación de la presencia del microorganismo de interés. Los aislamientos se hicieron de maracuyá (*Passiflora edulis* Sim.), fruta en donde se encontró una alta incidencia de *Fusarium oxysporum* Schlechtend, hongo con un alto nivel de patogenicidad. Una vez obtenido el material se procedió a la debida limpieza y preparación del mismo, cortando pedazos de 1 cm² los cuales fueron pasados por una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %, luego para quitar todo rastro de la solución se procedió a lavar 3 veces con agua destilada estéril (Castaño y Del Río, 1997). Finalmente, se llevaron los trozos de muestra a las cajas petri que contenían el medio de cultivo y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Una vez pasó el periodo de incubación, se escogieron las colonias que fueron obtenidas en cultivo puro cuyo patógeno fue plenamente identificado taxonómicamente y luego fue sembrado en medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y preservado en condiciones ambientales hasta su posterior utilización.

5.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO:

De las cajas con los cultivos puros se tomó una de estas al azar, con un tiempo estimado de desarrollo de 25 días, se procedió a remover las esporas presentes en la caja con ADE (agua destilada estéril) con un volumen conocido de 20 ml. Así de esta manera se obtuvo la suspensión madre de la cual se tomaron 4 submuestras de 1 ml y se depositaron en tubos de ensayo con 9 ml de ADE, obteniendo de esta manera la dilución 10^{-1} , se repitió el procedimiento llevando 1 ml de la dilución (10^{-1}) a un tubo con 9 ml de ADE, de esta forma obtuvimos la dilución 10^{-2} y así sucesivamente hasta obtener la dilución de 10^{-4} o una dilución apropiada para facilitar el conteo del número de esporas por mililitro de la suspensión. Para el conteo de las esporas se utilizó una cámara de Neubauer o hemocitómetro en la cual se depositaron 10 μ l de la muestra tomada con una micropipeta, para determinar el número total de esporas por mililitro de la suspensión, se sumaron el total de esporas presentes en los 25 cuadrantes centrales en la cámara, lectura realizada en el microscopio con el objetivo de 40x y a cada una de estas submuestras se le realizó tres veces el procedimiento para un total de seis lecturas. En donde se pudieron contar con facilidad un número entre 10 a 50 esporas por cuadrante, así pues la dilución 10^{-1} cumplió con las características requeridas para ser utilizada en el diseño experimental del montaje (Vélez, *et al.* 1997). Para obtener el factor de la cámara se procedió de la siguiente manera:

Volumen = ancho x largo x profundidad

$V = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$ (Volumen del cuadrante en el cual se realizó el conteo de esporas).

El número de esporas se obtiene en ml, por tanto, se debe realizar la conversión de mm^3 a ml, entonces:

$$\frac{1 \text{ ml} - 10^3 \text{ mm}^3}{x} \times \frac{1 \text{ ml} \times 0,1 \text{ mm}^3}{10^3 \text{ mm}^3} = \frac{0,1 \text{ ml}}{10^3} = \boxed{0.1 \times 10^3}$$

$$X = 10^{-1} \times 10^{-3} = 10^{-4} \text{ ml (Factor de la cámara)}$$

Obtención de la concentración de esporas en la suspensión:

$C = N \times \text{Inverso de dilución empleada} \times \text{Inverso de factor de la cámara}$

Donde N es el promedio del número de esporas por cuadrante.

σ es la desviación estándar.

$$N = 81$$

$$\sigma = 28,04$$

$$C = N \times 10^1 \times 10^4$$

$$C = 81 \times 10^1 \times 10^4$$

$$C = 81 \times 10^5$$

$$81 \times 10^5 \pm 28,04 \times 10^5 \text{ e/ml.}$$

$$[] \text{ e/ml} = 81 \times 10^5 \pm 28,04 \times 10^5$$

Luego, la concentración de esporas por ml de suspensión es de $81 \times 10^5 \pm 28,04 \times 10^5$ e/ml.

5.4 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL:

Para la preparación de este, también se debió recolectar material vegetal, en este caso *Trifolium repens* L. planta denominada como forrajera y conocida popularmente como trébol blanco. Una vez recolectado el material, se procedió a pesarlo para tener un dato exacto, el cual fue de 240,1 g. en base húmeda, luego se puso a secar a temperatura ambiente por espacio de 5 días (peso en base seca = 192,08g) y se paso por un molino mecánico para disminuir el tamaño de la muestra. Al mismo tiempo se realizaron pruebas como la de porcentaje humedad para eliminar todo posible sesgo a la hora de procesar la información. Posteriormente se llevó la muestra vegetal a un matraz de fondo plano, ahí se agregaron 3 adiciones sucesivas de etanol al 96% (solvente polar) hasta alcanzar un volumen de 150ml para extraer todos los posibles metabolitos que pudieran actuar como agentes antifúngicos en la realización del montaje; preparado el extracto en bruto se pasó por una gasa, luego se filtro en papel filtro 589/5 Rotband red Ribbon marca s & s papel

filtro Ø 185mm Ref – No. 300414, para eliminar residuos. Los extractos fueron liofilizados en un aparato marca Freeze Dryer 4.5 LABCONCO, por espacio de 48h para eliminar la mayor cantidad de solvente, y así garantizar un valor de rendimiento del extracto en crudo y confrontarlo con la cantidad de material con el que se trabajo inicialmente. Finalmente este se preservó en un frasco color ámbar forrado en papel aluminio y puesto en la oscuridad a temperatura ambiente para de esta forma procurar que la sustancia no perdiera sus propiedades (Narváez, 2005).

Se hallo el porcentaje de humedad así:

240,1g. de *Trifolium repens* L. en base húmeda

192,08g en base seca.

% Humedad= $\frac{\text{peso húmedo}-\text{peso seco} \times 100}{\text{Peso húmedo}}$

Peso húmedo

% H= $\frac{240,1\text{g.} - 192,08\text{g.} \times 100}{240,1\text{g.}}$

240,1g.

% H= 20

Teniendo en cuenta que para la prueba de porcentaje de humedad no se contó con una gran cantidad de material para realizar la prueba se tuvo que hacer otra en una escala más pequeña para la obtención de este importante dato, realizado de la siguiente manera:

Se tomaron 3 cajas de petri

Caja # 1: *T. repens* L. Peso húmedo= 2,0153

Peso seco=1,6137

Caja # 2: *T. repens* L. Peso húmedo= 2,0114

Peso seco=1,6068

Caja # 3: *T. repens* L. Peso húmedo= 2,0046

Peso seco=1,619

Caja # 1% H=19,93

Caja # 2% H=20,12

Caja # 3% H=20,09

% H prom.=20,05

5.5 PRUEBAS QUIMICAS CUALITATIVAS

Para complementar la información obtenida y establecer la presencia de algunos metabolitos secundarios relacionados con la actividad antifúngica del extracto etanólico de *Trifolium repens* L. se realizaron algunas reacciones coloridas para la identificación de los mismos.

5.5.1 Pruebas para determinar flavonoides

5.5.1.1 Prueba de Shinoda

A un tubo de ensayo con el extracto diluido se le agrega un trocito de viruta de magnesio amalgamado y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. La aparición de colores que van del rojo profundo a magenta, indica la presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas (Domínguez, 1973).

5.5.2 Pruebas para determinar alcaloides

5.5.2.1 Prueba de Dragendorff

A un tubo de ensayo que contenga el extracto diluido se le agrega el reactivo de Dragendorff y se le considera positivo con la aparición de un precipitado color marrón naranja (Domínguez, 1973).

5.6 CROMATOGRAFÍA BIDIMENCIONAL:

Al extracto etanólico *Trifolium repens* L. se le realizó una cromatografía bidimensional para compararlo con la plantilla de coloración y distribución de los flavonoides en el cromatograma propuesto por J.J Mabry (Ramírez, 1998), para relacionar la posición con la estructura de los flavonoides.

Obtenido el extracto, se preparan los dos solventes que van a ser utilizados en la cromatografía bidimensional de papel (2D). El primer solvente es una solución de TBA (terbutanol, ácido acético y agua) en una proporción de 3:1:1 y el segundo es una solución de HOAc (ácido acético y agua) con una proporción de 15 ml de ácido acético + 85 ml de agua.

Para el cromatograma se utilizan láminas de papel Whatman N° 3, con dimensiones de 22x22 cm. Con ayuda de una micropipeta se toma una cantidad de 25 µl del extracto etanólico y se deposita esta alícuota en la esquina izquierda, a una distancia de 1 cm de los bordes para finalmente dejar secar.

La primera fase de la cromatografía consiste en depositar en la cámara cromatográfica el TBA y la lámina cromatográfica con la muestra hacia el fondo de la cámara, el solvente no debe estar por encima del sitio donde se depositó la muestra (1 cm).

El desarrollo de la primera dimensión tiene una duración de 20 a 24 horas aproximadamente. Una vez terminada esta fase se retira el primer solvente junto con la lámina de papel cromatográfico, esta última se deja secar a temperatura ambiente, posteriormente se deposita el segundo solvente en la cámara para correr la segunda fase, para esta se gira el cromatograma 90 grados hacia la izquierda con respecto a la primera posición, este recorrido de la muestra tiene una duración de 6 a 8 horas.

Una vez finalizado todo este proceso en sus dos reacciones, se retira el cromatograma de la cámara y se deja secar; luego se revela por medio del uso de una lámpara de luz

ultravioleta, se identifican los diferentes componentes de la muestra ya que estos fluorescen bajo la lámpara, así se señalan y se identifica su color (Ramírez, 1998).

Después de demarcar las manchas en el cromatograma se calcula el Rf para cada componente (manchas en la lámina) mediante la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia entre el origen y el centro de la mancha}}{\text{Distancia entre el origen y el frente del solvente}}$$

5.7 ANÁLISIS EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VISIBLE

Para el análisis espectral, se recortaron cada una de las manchas presentes en la lámina y se depositaron en un beaker que contenía una solución etanólica al 20%, luego se aisló el pigmento del papel mediante un agitador magnético, para posteriormente ser analizadas en el espectrofotómetro UV-visible marca Genesys™ 5.

5.8 EVALUACIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL SOBRE EL PATÓGENO:

Una vez obtenidos los extractos etanólicos, se prepararon las diferentes diluciones que en este caso fueron tres, una dilución de 0,5 %, otra de 1,5 % y finalmente la de 2 %. Junto con estas tres diluciones también se tuvieron que evaluar otros dos tratamientos tales como el control positivo benomil (Benlate) cuya concentración provista por el productor es de 135g por cada 100l de agua, fungicida comercial, y el control negativo (Etanol + H₂O en proporción 2/3), así de esta forma se garantizó que la sustancia a evaluar es la verdaderamente responsable de la inhibición en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* Schlechtend, y no exista duda con el posible control que el etanol puede causar sobre el patógeno. La actividad antifúngica del extracto se hizo por el método de difusión por discos (Cavalieri, 2005) en cajas petri con Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), en el cual las cajas previamente servidas con el medio e inoculadas con el patógeno se les incorporó 5

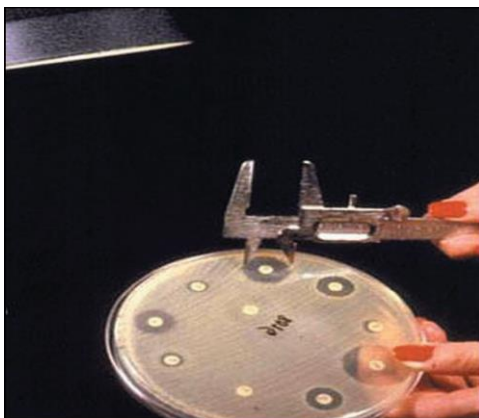
discos cortados a 0,6mm de diámetro, el papel filtro 595 marca s & s filter paper circles Ø 150mm. Ref-No. 311612 que ya habían sido impregnados con 10µl de sus respectivos tratamientos (control positivo, control negativo, y los tratamientos con concentraciones 0,5 %, 1,5 % y 2 %). Luego de terminado todo el procedimiento anterior, se incubaron a 28°C durante 96 a 144 horas, aunque se tomó registro de ellos diariamente hasta los 14 días.

Es de resaltar que para la aplicación de los tratamientos sobre los sensidiscos se procedió a agitar cada uno de estos sobre un vortex ó agitador para garantizar de esta forma que la posible no homogenización de los tratamientos tuviera un efecto contraproducente en el desarrollo del experimento.

La determinación de la actividad fúngica se hizo tomando en cuenta las medidas de los halos de inhibición alrededor de cada disco con el extracto vegetal de *Trifolium repens* L., en sus diferentes concentraciones de la siguiente manera:

La sensibilidad del patógeno a los extractos se estableció por el tamaño del halo del control negativo y positivo, medida que se hizo con un calibrador o pie de rey en milímetros, registrando tres mediciones diferentes promediándolas y sacando un valor más exacto, concluyendo así lo siguiente: Halos cuyo diámetro sean \leq al control serán negativos y halos cuyo diámetro sean $>$ al control serán positivos, ver figura 5.

Figura 5. Medición en técnica de difusión por discos



Cavalieri, S. J. 2005

5.9 DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se llevo a cabo en un tipo de diseño de bloques completamente aleatorizados, con tamaño de muestra $n = 75$ por tratamiento y las unidades experimentales divididas. Como variables independientes están cada uno de los tratamientos; como variable dependiente el tamaño del halo y como factor cuantitativo el diámetro del halo en milímetros. Los bloques fueron cada uno de los experimentos realizados que en este caso fueron 3, la unidad experimental fue cada una de las cajas de petri y la subunidad experimental cada uno de los discos.

5.9.1 Procesamiento y análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos conseguidos en el presente trabajo se utilizo el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), para el análisis de varianza se aplicó una prueba paramétrica llamada análisis de varianza para medidas repetidas, ya que el tamaño de muestra lo ameritaba con un $n=75$ y la prueba de comparaciones múltiples para muestras con varianza no homogéneas como la T3 de Dunnett. Luego para la posterior confirmación de todo lo realizado se hizo el análisis con una prueba no paramétrica como la de Kruskall Wallis para comparar los diferentes tratamientos entre si y la utilización de la prueba de Friedman para comparar diferencias en los días de medición.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el trabajo mostraron que todas las concentraciones del extracto etanólico de *Trifolium repens* L. utilizadas tuvieron algún tipo de actividad antifúngica frente al patógeno *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Entre más alta la concentración del extracto mayor efecto inhibitorio causó en el hongo; a continuación se explica detalladamente como los tratamientos utilizados incidieron en el desarrollo del experimento.

Los diámetros de los halos de inhibición correspondientes a los tratamientos evaluados en la investigación no se ajustan a la distribución normal (Shapiro-Wilk; $p > 0,05$) para todas las muestras (Los 4 tratamientos), y tampoco a la homogeneidad de varianza (Levene; $p < 0,05$).

Mediante el anterior análisis se estableció que el tamaño del halo si se incrementa a medida que pasan los días, pero con tendencia a ser constante, a su vez la influencia del día es independiente de los tratamientos y la interacción es no significativa ($f = 0,959$; $p = 0,545$), también es lineal, ya que se encuentra por encima del nivel de significancia del 0,05.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($f = 400,679$; $p = 0,000$), esto nos muestra que los tratamientos difieren en todos los tiempos del montaje.

De esta forma se observa que en general todas las concentraciones del extracto etanólico utilizado en el montaje tuvieron efecto inhibitorio contra el patógeno *Fusarium oxysporum* Schlechtend, debido a la formación de los halos de inhibición en las cajas petri; y presentando menores halos en las concentraciones más bajas y mayores en las concentraciones más altas, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($f = 400,679$; $p = 0,000$). A su vez la influencia del día fue independiente de los

tratamientos por tanto no se hallaron diferencias significativas entre la interacción días y tratamientos ($f= 0,959$; $p= 0,545$).

Mediante la prueba H de Kruskal Wallis, se pudo establecer que si hay diferencias entre los tratamientos en días x día en todos ellos, siendo el control positivo el que mayor efecto mostró hasta el de menor efecto como fue la dilución de 0,5% de concentración. Tanto la pruebas de Kruskal Wallis con una significancia de $p= 0,000$ y Friedman con una significancia del $p= 0,004$ que son pruebas no paramétricas sirvieron para corroborar la prueba paramétrica utilizada en un comienzo, ver tabla 1.

Tabla 1. Prueba de Kruskal-Wallis ANOVA (Días vs. Tratamientos)

Variable	H	gl	α
Día 1 vs. Ttos.	236,5569	4,375	0,000
Día 2 vs. Ttos.	219,4942	4,375	0,000
Día 3 vs. Ttos.	223,5934	4,375	0,000
Día 4 vs. Ttos.	224,7284	4,375	0,000
Día 5 vs. Ttos.	224,7284	4,375	0,000
Día 6 vs. Ttos.	224,7284	4,375	0,000
Día 7 vs. Ttos.	219,9736	4,375	0,000
Día 8 vs. Ttos.	203,5619	4,375	0,000
Día 9 vs. Ttos.	216,9357	4,375	0,000
Día 10 vs. Ttos.	207,7471	4,375	0,000
Día 11 vs. Ttos.	211,5693	4,375	0,000

H= Chi-cuadrado

gl.= Grados de libertad

α = Significancia

De igual forma se pudo establecer que mediante la prueba H de Kruskal Wallis, se encontraron diferencias significativas en cada uno de los tratamientos día x día. Sin hacer un seguimiento en días se pudo observar que la acción inhibitoria del extracto en sus tres concentraciones comenzó a brindar el efecto esperado, pero a medida que pasaban los días este perdía un poco de eficacia contra el patógeno y el hongo se propagaba por toda

la superficie de la caja petri. Debido a que las cajas se incubaron a una temperatura de 28°C, esto facilitó que el hongo esporulara más rápidamente y su desarrollo fuera más exitoso bajo las condiciones propuestas en el experimento. Mediante lo anterior también se puede inferir que el extracto perdió un poco de su acción fungicida, ya que al someter los montajes a 28°C de temperatura este por su misma naturaleza termosensible se degradó en los sensidiscos, se secó y por este motivo el patógeno invadió su entorno.

Sin hacer un seguimiento en días se puede observar que los tratamientos difieren entre sí, a excepción de los tratamientos con concentraciones de 1,5% y 2%, que mostraron un parecido efecto inhibitorio sobre el patógeno.

Ya se ha dicho que todos los tratamientos tuvieron efecto inhibitorio contra *Fusarium oxysporum* Schlechtend, pero de acuerdo al análisis realizado se encontró que las concentraciones de 1,5% y 2% fueron muy parecidas en cuanto a la actividad fungicida se refiere, esto se puede deber a varios factores, tales como: el tiempo de almacenamiento de los extractos, el someter a los extractos a la luz directa, ya que estos estaban muy bien tapados y forrados con papel aluminio y en frascos ámbar, pero no se debe olvidar que en el espacio dispuesto para las prácticas microbiológicas, no solo se encontraba en desarrollo este trabajo, sino también muchos otros y esto pudo acarrear que algún otro estudiante por error dejara la puerta de donde se guardaban los materiales abierta exponiendo así el material a varias horas de luz solar, aunque esta no fuera directa por la ubicación de los cajones de materiales.

En el bioensayo realizado en este trabajo se determinó como control positivo el benomil (Benlate) fungicida recomendado ampliamente por las casas agronómicas y cuyo porcentaje de inhibición en este caso fue del 100%, seguido por la concentración alta del extracto (2%) con un 76,43%, la concentración media (1,5%) con un 72,5% y finalmente la concentración baja (0,5%) con un 45,84% de inhibición (Ver tabla 2).

La decisión de utilizar como control positivo el benomil (Benlate) con categoría toxicológica III con fórmula $C_{14}H_{18}N_4O_3$, y nombre IUPAC: 1-(butilcarbamoil)benzimidazol-

2-ilcarbamato de metilo, se debe a que este fúngida sistémico es muy utilizado en todo el país y en campo se suministra a aquellos cultivos atacados por *Fusarium oxysporum* Schlechtend y otros hongos, aunque estos cultivos deben estar en las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad producida por el patógeno. Por este motivo se decidió trabajar con él, ya que como el experimento se haría in-vitro y las condiciones serían controladas, se creyó que no era necesario la utilización de otro fungicida con mayor poder antifúngico y tóxico. Al parecer, el compuesto se transforma en la célula del hongo en metilben-cimidazolil carbamato (MBC) y posteriormente a un mononucleótido activo. El MBC actúa interfiriendo la síntesis del DNA, la mitosis y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos de DNA al RNA (<http://hostalia01.hostalia.com/~tragusa/es/catalogo/ficha.php?producto=133>).

En la figura 6 se pueden observar algunas fotos de los halos de inhibición para cada uno de los tratamientos empleados.

Figura 6. Fotografías de los halos de inhibición. a) Benomil, b) concentración 2%, c) concentración 1,5%, d) concentración 0,5%.



a) Halos de inhibición producidos por el Benomil.



b) Halos de inhibición producidos por la concentración 2%.



c) Halos de inhibición producidos por la concentración 1,5%.



d) Halos de inhibición producidos por la concentración 0,5%.

Tabla 2. Porcentajes de inhibición de cada una de las concentraciones del extracto frente al control positivo benomil (Benlate).

Tratamientos	Promedio del diámetro de los halos de inhibición en mm.	Porcentaje de inhibición
Control Positivo (+) Benomil (Benlate)	1,239	100%
Concentración 2,0%	0,947	76,43%
Concentración 1,5%	0,898	72,5%
Concentración 0,5%	0,568	45,84%
Control Negativo (-) Etanol + Agua (1:3)	0	0

En la tabla 2, se puede observar claramente la inhibición producida por el benomil con un porcentaje de eficiencia del 100% frente a los otros tratamientos con porcentajes del 76,43%, 72,5% y 45,84% respectivamente. Cabe resaltar que los tratamientos con concentraciones de 2% y 1,5% mostraron una alta eficacia, pese a que su origen es natural comparado con su contraparte de origen químico que ya ha sido ampliamente probada su efectividad en diversos estudios. Como resultado obtenido es de gran satisfacción, ya que para la realización de este trabajo se tuvo en cuenta como

antecedente la investigación realizada por Harborne, *et al.*, (1975), donde plantea que el trébol rojo *Trifolium subterraneum* L. posee cierta actividad fungicida frente al hongo *Fusarium nivale* (Schaffnit) e Müll, atribuyendo la actividad a un tipo de metabolito secundario presente en la planta y perteneciente al grupo de los flavonoides conocido como formononetina (7-hydroxy-4'-methoxyisoflavona). Pese a que el trébol rojo no se encuentra en estas latitudes, se tomó la decisión de trabajar con el trébol blanco *Trifolium repens* L. por su cercanía taxonómica; también por su buen desarrollo en condiciones in-vitro *Fusarium oxysporum* Schlechtend fue escogido para la realización de esta investigación, pues *Fusarium nivale* (Schaffnit) e Müll no poseía muchos antecedentes causales de enfermedades en la región del Cauca, y en general se puede determinar que el trébol blanco muestra buenos resultados.

En el material vegetal utilizado se realizaron diferentes métodos de análisis para acumular suficiente información sobre la presencia de flavonoides, entre los cuales tenemos: cromatografía bidimensional en papel y espectrofotometría UV.

En la cromatografía bidimensional se emplea una capa plana y relativamente delgada de un material que a su vez es el soporte, la fase móvil se mueve a través de la estacionaria por capilaridad, a veces ayudada por gravedad o por un potencial eléctrico. En este tipo de cromatografía la muestra se deposita en una de las esquinas del papel y se coloca a correr con el primer disolvente que es TBA (terbutanol, ácido acético y agua) en una proporción de 3.1:1, y el segundo es una solución de HOAc (Ácido acético y agua) en proporción de 15 ml de ácido acético + 85 ml de agua (Figura 7).

Figura 7. Cromatograma



El desarrollo de la primera dimensión tiene una duración de 12 horas aproximadamente. Terminada esta fase se retira el primer solvente y se deposita el segundo solvente HOAc y la lamina de papel cromatográfico se retira se deja secar para correr la segunda fase, para el inicio de esta fase el papel se gira 90 grados hacia la izquierda con respecto a la primera posición, este recorrido con el segundo solvente tarda de 4 a 6 horas.

Ya finalizadas las dos fases de la cromatografía, se retira el cromatograma de la cámara y se dejó secar, luego con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta se revelaron los componentes de la muestra, porque estos fluorescen bajo la lámpara, así se señalan y se identifica su color (Figura 8, 9).

Figura 8. Cromatograma bajo luz UV



Luego de someter el cromatograma bajo la luz UV e identificar los colores, se procedió a compararlos con la plantilla de coloración propuesta por J. J. Mabry en el año de 1970 (Tabla 3).

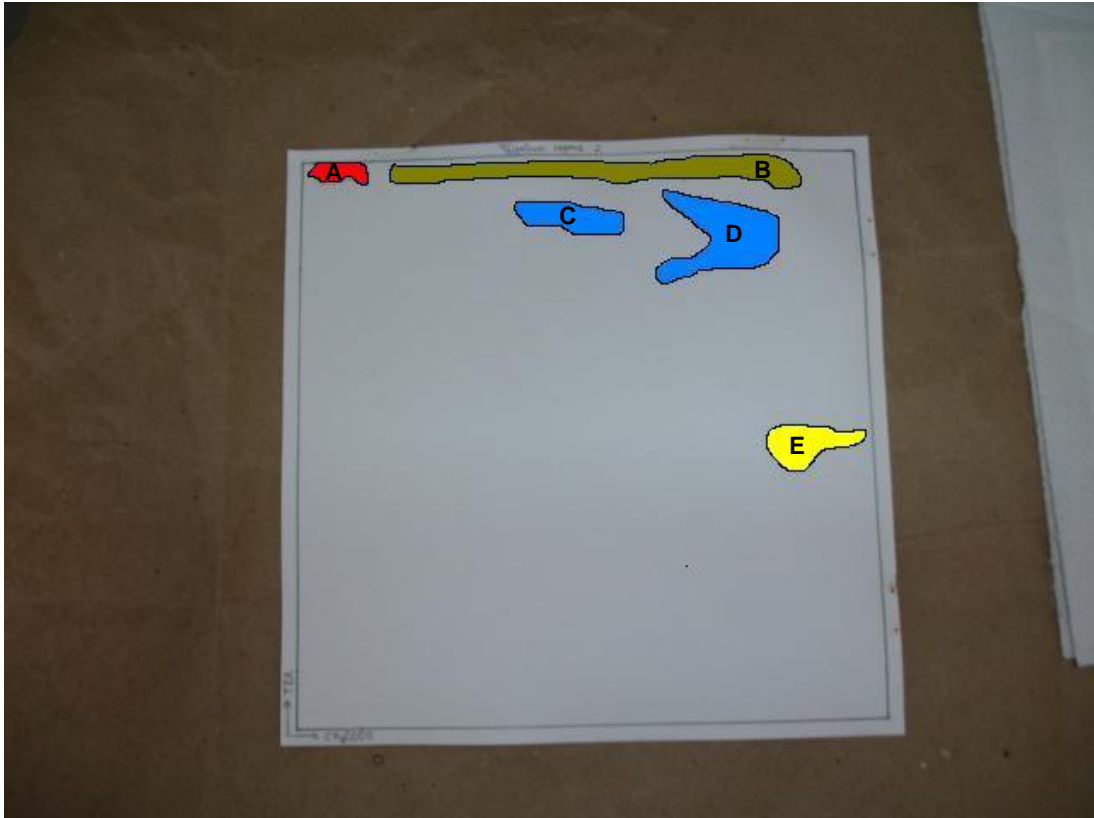
Tabla 3. Tabla de relación entre el color de la mancha y la estructura de los flavonoides

Color de la mancha del flavonoide (bajo luz UV)	Tipo de Flavonoide
1. Violeta intenso	a. Usualmente flavonas con 5-OH y 4'-OH o 3-OH. b. Algunos 5-OH flavonas y 4'-OH charconas de anillo B carentes del grupo hidroxilo. c. Flavonas o flavonoles con 5-OH pero con el 4'-OH ausente o sustituido. d. Isoflavonas, dihydroflavonoles y algunas

	<p>flavonas con 5-OH.</p> <p>e. Chalconas con 2'- o 6'-OH pero sin un 2- o 4-OH.</p> <p>Algunas 5-OH flavonas</p> <p>Chalconas con un 2- y/o 4-OH.</p>
2. Azul fluorescente suave	<p>a. Flavonas y Flavononas carentes de un 5-OH libre.</p> <p>b. Flavonoles carentes de un 5-OH libre pero con el 3-OH sustituido.</p> <p>c. Isoflavonas carentes de un 5-OH libre.</p>
3. Invisible	Isoflavonas carentes de un 5-OH libre.
4. Amarillo suave, amarillo o naranja fluorescente	Flavonoles con un 3-OH libres y con o sin un 5-OH libre.
5. Amarillo fluorescente, amarillo verdoso, azul verdoso o verde.	<p>a. Auronas con un 4-OH libre y algunas 2 o 4-OH chalconas.</p> <p>b. Auronas carentes de un 4'-OH libre y flavononas carentes de un 5-OH.</p> <p>c. Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin un 5-OH libre.</p>
6. Amarillo pálido	Dihydro flavonoles carentes de un 5-OH.

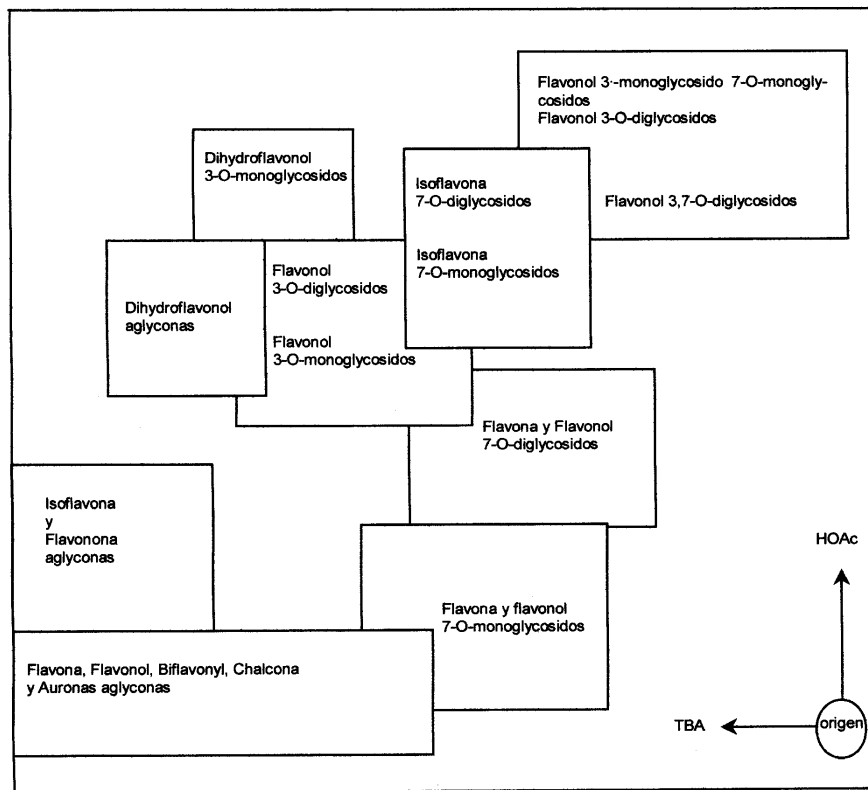
Mabry, 1970

Figura 9. Cromatografía de *Trifolium repens* L.



Después de demarcar cada una de las manchas en el cromatograma, se comparo la ubicación de estas con la plantilla de distribución de flavonoides en el cromatograma bidimensional propuesto por Mabry, (1970) (Figura 10).

Figura 10. Plantilla de distribución de los flavonoides en el cromatograma (Mabry, 1970)



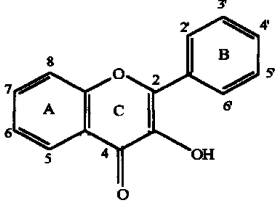
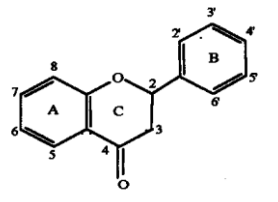
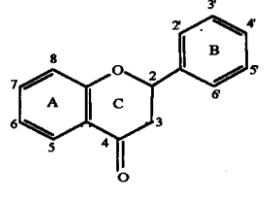
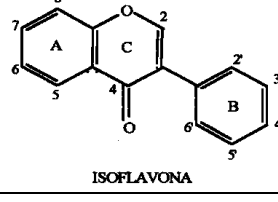
En la tabla 4, se calcularon los valores Rf para cada una de las manchas o componentes, mediante la siguiente fórmula:

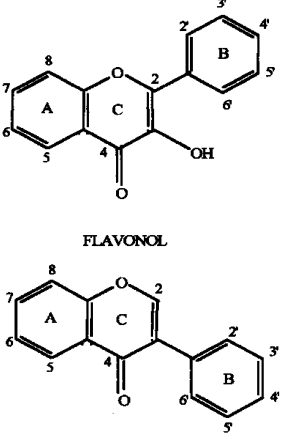
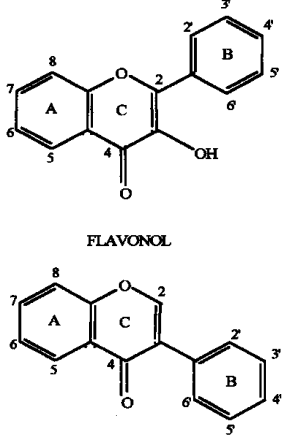
$$R_f = \frac{\text{Distancia entre el origen y el centro de la mancha}}{\text{Distancia entre el origen y el frente del solvente}}$$

Tabla 4. Valores del Rf y color para cada una de las manchas

Mancha	Valor Rf	Color de la mancha
A Clorofila	0,9840	Rojo
B (1)	0,9734	Verde amarillo
C (2)	0,8563	Azul ciano
D (3)	0,8404	Azul ciano
E (4)	0,4627	Amarillo

Tabla 5. Datos cromatográficos y espectroscópicos de *Trifolium repens* L.

Mancha	color	Rf encontrado	λ (nm) encontrada	Posible clase de Flavonoide
B(1)	Verde amarillo	0,9734	278	 <p>FLAVONOL</p>  <p>FLAVANONA</p>
C(2)	Azul ciano	0,8563	275	 <p>FLAVANONA</p>  <p>ISOFLAVONA</p>

D(3)	Azul ciano	0,8404	263	 <p>The image shows two chemical structures. The top structure is labeled 'FLAVONOL' and consists of a central C ring (a pyrone ring) with a carbonyl group at C4 and a hydroxyl group at C3. It is substituted at C2 with a B ring (a phenyl ring) and at C6 with an A ring (a phenyl ring). The A ring is numbered 5-8, the C ring is numbered 2-4, and the B ring is numbered 2'-6'. The bottom structure is labeled 'ISOFLAVONA' and has the same core as the flavonol, but the B ring is attached to C3 and the A ring is attached to C6.</p>
E(4)	Amarillo	0,4627	262	 <p>The image shows two chemical structures, identical to those in the row above. The top structure is labeled 'FLAVONOL' and the bottom structure is labeled 'ISOFLAVONA'. Both structures show the characteristic flavone skeleton with A, B, and C rings and their respective numbering.</p>

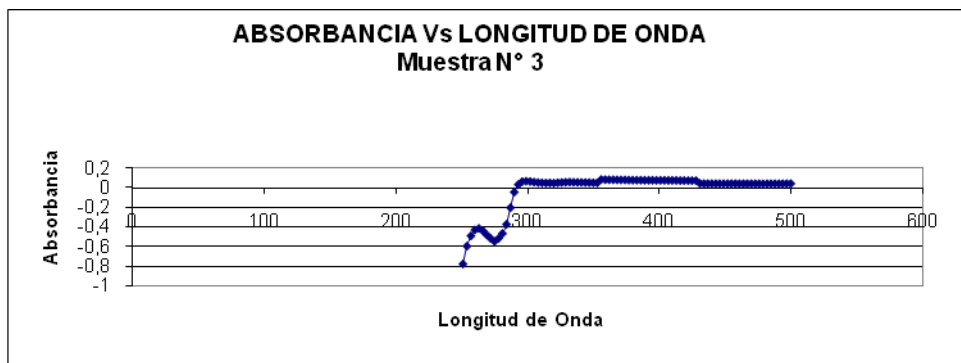
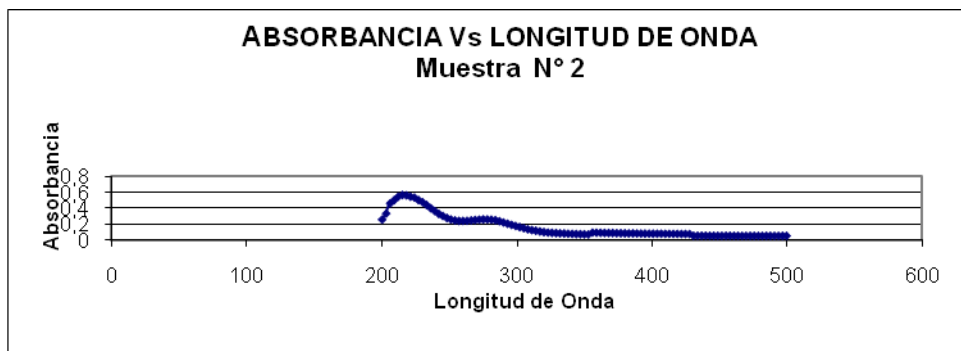
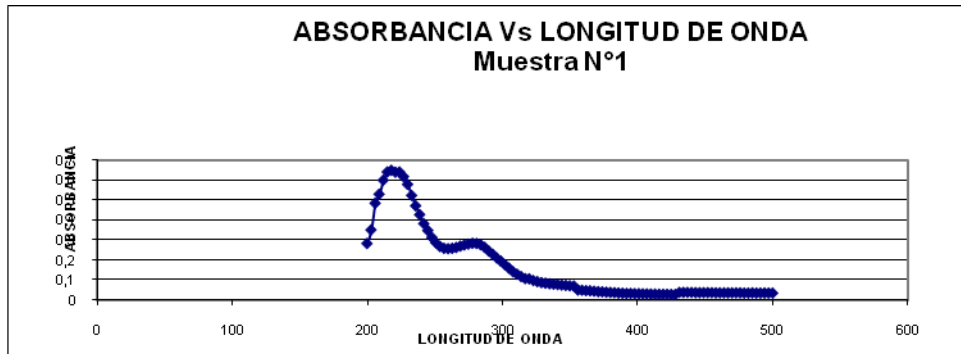
Arteaga, 2009.

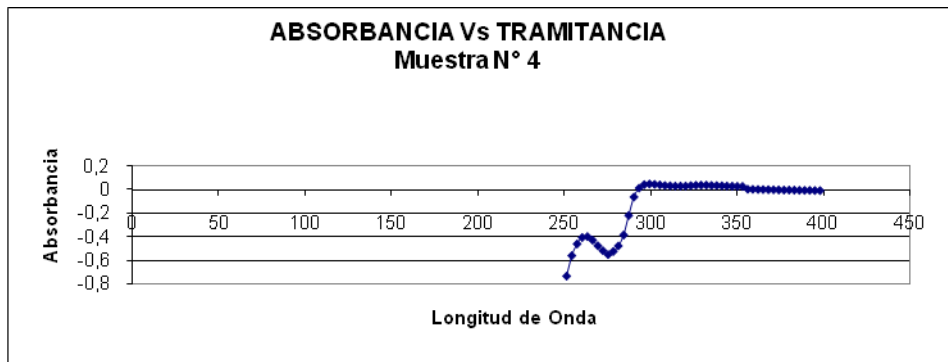
Respecto al análisis cromatográfico se pudo determinar que según la ubicación de las manchas en la lámina y su color bajo la lámpara de luz UV, hay presencia de Isoflavonas, flavanonas y flavonoles compuestos flavonoides presentes en algunas familias vegetales. Pero sería muy apresurado determinar cuál de estos compuestos es el responsable de la actividad inhibitoria del extracto frente al hongo en cuestión, por esta razón se debe profundizar en otras técnicas de análisis químico como HPLC, espectrofotometría infrarroja y RMN, para de esta forma corroborar lo dicho en este trabajo. El análisis aquí realizado es preliminar puesto que solo se encaminó a la actividad fungicida del extracto como tal y no a cada uno de los compuestos flavonoides presentes en la planta. De todas formas los resultados obtenidos son de gran ayuda para posteriores estudios sobre el tema y la información aquí recolectada sirvió para revalidar lo propuesto por Harborne, *et al.*, (1975) en su libro (Tabla 5).

Finalmente se corta cada mancha, las cuales se depositaron cada una en un vaso de precipitado junto con una solución etanólica al 20%, para que mediante un agitador magnético se aislaran los pigmentos del papel, pues las cantidades requeridas para el análisis en el espectrofotómetro Uv-visible marca Genesys™ 5 pueden ser extraídas del cromatograma.

En la figura 11, se puede observar claramente todos los espectros de absorción para cada una de las manchas encontradas en el cromatograma, cuyas longitudes de onda van desde los 200 nm hasta los 500 nm, longitudes características para los flavonoides.

Figura 11. Análisis en espectrofotómetro





Gracias a los estudios espectrales realizados se pudo determinar que muy posiblemente *Trifolium repens* L posee metabolitos secundarios de tipo flavonoide de las clases isoflavonas, flavanonas y flavonoles, con valores de longitudes de onda para la banda I comprendidos entre 240-280 nm, 275-290 nm y 250-270 nm respectivamente (Domínguez, 1973) .

Complementariamente al procedimiento realizado para los extractos, también se hicieron otras pruebas para obtener la mayor cantidad de información posible sobre estos. Se realizaron pruebas preliminares como las químicas que son útiles para estos casos ya que son sencillas, sensibles, específicas y fáciles de realizar. Las reacciones de químicas de coloración y de precipitación que junto con propiedades físicas como la sublimación o la fluorescencia son muy útiles y nos permiten observar la presencia o existencia de determinados compuestos químicos en las plantas. Estas pruebas realizadas nos permitieron tener un mayor conocimiento sobre la especie vegetal utilizada en el experimento y decidir sobre cuál iba a ser la metodología y cuidados a seguir durante el desarrollo del mismo (Domínguez, 1973).

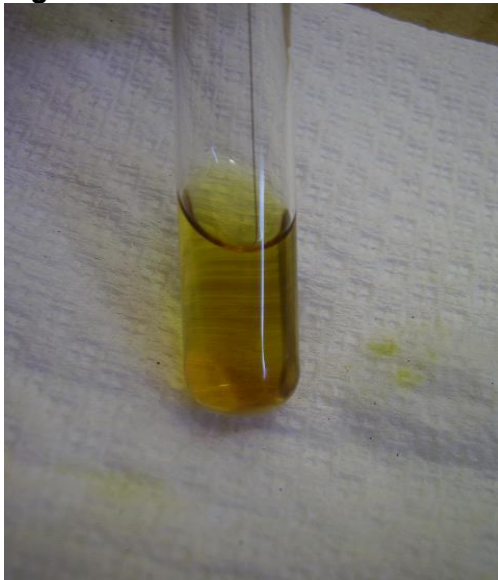
Pruebas como la de Shinoda, sirven para determinar presencia ó ausencia de flavonoides, en la cual a un tubo de ensayo con una poca cantidad del extracto diluido se le agrega un trocito de viruta de magnesio amalgamado y unas gotas de acido clorhídrico concentrado. La aparición de colores que van desde el rojo profundo hasta el magenta indicaron la presencia de estos compuestos y se le considero como positiva (Figura 12, 13).

Figura 12. Coloración Prueba de Shinoda en capsulas de porcelana



Izq. Extracto solo, Der. Extracto con reactivos

Figura 13. Coloración Prueba de Shinoda en tubo de ensayo



Nótese la diferencia de colores en el primer montaje con dos recipientes sobre una superficie blanca y en el segundo la prueba realizada en un tubo de ensayo como sugiere el protocolo, se observa claramente la coloración rojiza.

También se realizaron otras pruebas como la de Dragendorff, para observar alcaloides, la cual consiste en agregar el reactivo a un tubo de ensayo que contiene el extracto diluido y

la prueba se considera positiva cuando hay aparición de un precipitado color marrón naranja. Cabe resaltar que las plantas poseen una gran cantidad de compuestos y sería muy apresurado asegurar que la especie vegetal *Trifolium repens* L. posee algún tipo de alcaloide. Puesto que el numero de compuestos en las plantas es alto la prueba pudo reconocer algún otro compuesto con la presencia del grupo funcional amino reconocido por el reactivo y que puede estar presente en muchos otros metabolitos secundarios, (Figura 14).

Figura 14. Prueba de Dragendorff en tubo de ensayo



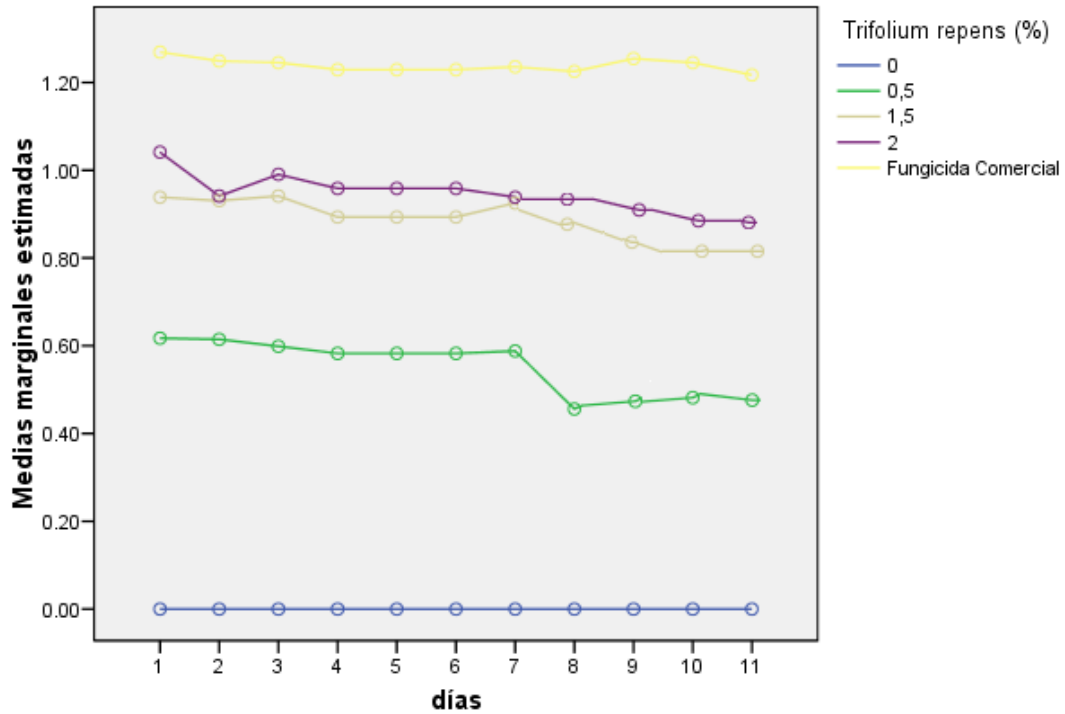
Con pruebas químicas cualitativas como la de Shinoda, en la cual se hace reaccionar una pequeña cantidad de extracto diluido con un trocito de viruta de magnesio amalgamado y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, se pudo observar la aparición de un color rojo profundo indicando la presencia de este tipo de compuestos y se tomó como positiva. La otra prueba cualitativa realizada fue la de Dragendorff, para determinar presencia de alcaloides, la cual consistió en agregar el reactivo a un tubo de ensayo que contiene el extracto diluido y la prueba es positiva cuando hay aparición de un precipitado color marrón naranja. Esta prueba fue considerada como positiva, pero se debe tener cierta prudencia ya que esta reconoce el grupo funcional amino y en las plantas podemos encontrar una gran variedad de compuestos con este grupo. Es muy apresurado decir que la especie vegetal *Trifolium repens* L. cuenta con la presencia alcaloides, por esta razón

es necesario seguir investigando al respecto (http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/fernandez_a_le/capitulo5.pdf).

En la figura 15, se puede observar el comportamiento del extracto en cuanto al diámetro de halo de inhibición y la proporcionalidad de las diferentes concentraciones del extracto empleadas con respecto al tiempo del experimento, cuya información nos dice que hay una relación en la cual a menor concentración menor halo de inhibición y a mayor concentración mayor halo de inhibición, por lo cual el mayor nivel de inhibición lo presento la concentración 2,0%, a su vez el control positivo benomil (Benlate) como era de esperar por su misma naturaleza química presentó los mayores halos de inhibición.

Figura 15. Diámetro de los halos de inhibición vs. Tiempo en días.

Medias marginales estimadas de MEASURE_1



Finalmente mediante la figura anterior, se puede observar claramente el comportamiento de cada uno de los tratamientos empleados en este trabajo y a su vez como los diámetros de los halos se comportan a lo largo de los 14 días del experimento. Donde el control positivo (Benomil) fue el tratamiento que presentó los mayores halos de inhibición debido a su misma naturaleza química con un porcentaje del 100%, seguido de las concentraciones 2% con 76,43% y 1,5% con 72,5% de efectividad respectivamente. El hecho de que estos dos tratamientos tuvieran un efecto muy cercano en cuanto a porcentajes de refiere pudo estar relacionado con el tiempo de almacenamiento de los extractos, la desnaturalización de sus compuestos debido a que en algún momento del montaje estos pudieron estar en contacto con la luz solar directa o en el lugar de almacenamiento la temperatura varió de tal forma que pudo alterar las propiedades del mismo.

7. CONCLUSIONES

Mediante el estudio realizado con *Fusarium oxysporum* Schlechtend se pudo determinar que el extracto de *Trifolium repens* L en las tres concentraciones utilizadas tuvo efecto inhibitorio contra el patógeno, siendo la concentración de 2% la que mostró mayor poder fungicida.

También con el análisis estadístico se pudo determinar que hay una relación directamente proporcional con respecto a la concentración del extracto, en otras palabras a mayor concentración mayor diámetro del halo de inhibición.

Entre los tratamientos se encontraron diferencias significativas ($f= 400,679$; $p= 0,000$), mostrando que estos si difieren en todos los tiempos del montaje.

Gracias a los resultados obtenidos se pudo observar que las concentraciones 2% y 1,5%, mostraron un parecido efecto antifúngico.

Se puede asegurar que el control negativo en la proporción utilizada en este trabajo, no es un medio muy eficaz contra el hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend en condiciones in-vitro.

Comparando los tratamientos entre si, permitió determinar que el control positivo (Benomil) presento el mayor efecto toxico frente al patógeno con un 100%, posteriormente la concentración 2% con un 76,43%, 1,5% con 72,5% y finalmente la concentración 0,5% con 45,84%.

Las pruebas de análisis cualitativo para determinación de flavonoides, son un medio muy efectivo para corroborar la presencia de estos compuestos en las plantas.

8. RECOMENDACIONES

Aunque el estudio es preliminar, el extracto de *Trifolium repens* L puede ser empleado como controlador del hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend en condiciones in-vitro. Para utilizar el extracto en campo sería necesario estudios más profundos acerca de su composición química y elucidación de moléculas.

Se sugiere hacer un análisis químico al extracto cuantificable y de estructura a sus componentes para de esta forma garantizar la actividad fungicida del mismo.

Sería importante realizar pruebas toxicológicas de cada uno de los metabolitos secundarios (Flavonoides) encontrados en el trébol blanco.

Finalmente se recomienda la continuación del trabajo, inicialmente por parte de un químico para garantizar que los compuestos encontrados son responsables de la actividad antifúngica y de un agrónomo para la realización de pruebas en campo.

9. BIBLIOGRAFIA

- ❖ ALCALA DE MARCANO, D.; VARGAS N.; PIRE, A. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. Rev. Fac. Agron. v.22 n.4. Caracas oct. 2005
- ❖ ARMSTRONG, G. M. y J.K. ARMSTRONG. Special forms and races of *Fusarium oxysporum Schlechtend* causing wilt diseases. (1981) p. 391-399.
- ❖ BAHORUN, T. et al. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel/Forschung/Drug/Research* 1996 46(11):1086/1089.
- ❖ BENÍTEZ, A., BETANCOURT, S. y MENDOZA, M. Efecto de extractos vegetales en el crecimiento de *Rhizoctonia solani* Kün in vitro y en plantas de frijol susceptible. Departamento de Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. CIGA, ITA, No. 33. Celaya, Guanajuato. Mexico. (2007).
- ❖ BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C., CODÓN, A. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, (2004). Vol. 7: 249-260.
- ❖ BOOTH, C. The Genus *Fusarium*. CMI. Kew, Surrey. (1971) p. 19-31.
- ❖ CARPENA, O. Estudios sobre flavonoides de los citrus. En: An. Real Acad. (1979). Farm.45, 231-258.
- ❖ CARTAYA, O., REYNALDO, I, BARROSO, L. y MÁRQUEZ, R. Extractos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre hongos fitopatógenos. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. San José de las Lajas, P. Habana. Cuba. (2001).

- ❖ CARRILLO, L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Revista Argentina de Microbiología (1990).p 22: 212 – 215.
- ❖ CASTAÑO, J., y DEL RIO, L. Manual para el diagnostico de Hongos, Bacterias, Virus y Nematodos Fitopatógenos. Universidad de Caldas. Facultad de Agropecuarias. Departamento de Fitotecnia. (1997).
- ❖ CAVALIERI, S. J. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana [citado 2008-03-09], p. 45. Disponible en : http://www.paho.org/spanish/ad/ths/er/00.02_fm.pdf
- ❖ ENTREVISTA con Elsy Solarte, Ingeniero Agrónomo. Popayán, 25 Junio de 2007.
- ❖ FERNANDEZ, C. y JUNCOSA, R. Biopesticidas ¿La agricultura del futuro? En: Phytoma. Vol 141, (2002) p.14-19
- ❖ GROSE, E y COTES, A. Preliminary studies of host limitation in Fusarium Wilt. En: Reporte del Centro de Investigaciones Microbiológicas Universidad de Los Andes, Bogotá (1988) p 43.
- ❖ HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H. “The Flavonoids”, Chapman and Hall, London. (1975).
- ❖ _____; Introduction to ecological Biochemistry. Academic press, London (1977) Pg. 22-25.
- ❖ HERNANDEZ, A.N., BAUTISTA, S., VELAZQUEZ, M.G. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 30, numero 002 Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C.P; Chapingo México. Abril-Junio 2007 p. 119-123.

- ❖ LUGO, Z y DOMINGO, T. Efecto de extractos naturales y funguicidas para el control de *Alternaria solani* (Cooke) Wint en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) Instituto Nacional de Investigaciones agrícolas. Falcón Estado Zulia (1999).

- ❖ MARQUEZ, R. L., DE LA ROSA, C. y MERCADO, A. Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit (ultimorrial) Scientia et Technica Año XIII N° 33. Universidad de Sucre (2007).

- ❖ MENDOZA, C.B., MORENO, M. N., WEIL, M. y ELANGO, N. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Revista Tierra tropical. Universidad EARTH (2007). Pg. 81-89.

- ❖ NARVAEZ, Ivonne Andrea. Evaluación de la actividad insecticida de extractos acuosos vegetales sobre Diabrotica sp (*Coleoptera: Chrysolidae*).Popayán 2005. Trabajo de grado (Biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

- ❖ RODRIGUEZ, D y MONTILLA J. Efecto de la aplicación de citrex en *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en hojas de papa. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía, Postgrado de Fitopatología. Barquisimeto Estado Lara (1999).

- ❖ TOUSSOUN T.A. y COOK R.J. (Eds.). *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Pennsylvania State University Press. (1981).

- ❖ VAN ETTEN, H. D. Antifungal activity of pterocar pans and other selected isoflavonoids. En: Phytochen. Vol 15 (1976) p. 655-659.

- ❖ VÉLEZ, P., POSADA, F. J., MARIN, P., GONZÁLEZ, M. T., OSORIO, E., y BUSTILLO, A. E. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. CENICAFE. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Boletín Técnico N° 17. Chinchiná-Caldas-Colombia. (1997).

- ❖ VOLCY, C. Principios de control de enfermedades en las plantas. Universidad Nacional de Colombia, Seccional Medellín, 1990, Facultad de Ciencias. p. 109-110.

Fuentes electrónicas

❖ <http://hostalia01.hostalia.com/~tragusa/es/catalogo/ficha.php?producto=133>

http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/