



UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL
DE LOS LLANOS OCCIDENTALES
"EZEQUIEL ZAMORA"



VICERRECTORADO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
PROGRAMA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR
SUB-PROGRAMA INGENIERÍA AGRONÓMICA

EXTRACTOS ACUOSOS PARA EL CONTROL DE
***Colletotrichum spp* y *Meloidogyne spp* AGENTES**
PATOGENOS DE PLANTAS

Autores:

Duque Rosa CI: 26.076.600

Bustamante Elizabeth CI: 27.350.105

Guanare 2022



**UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL
DE LOS LLANOS OCCIDENTALES**

“EZEQUIEL ZAMORA”



VICERRECTORADO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

PROGRAMA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR

SUB-PROGRAMA INGENIERÍA AGRONÓMICA

**EXTRACTOS ACUOSOS PARA EL CONTROL DE
Colletotrichum spp y *Meloidogyne spp* AGENTES
PATOGENOS DE PLANTAS**

Autores:

Duque Rosa CI: 26.076.600

Bustamante Elizabeth CI: 27.350.105

Tutor:

Profesor: Rafael Bastidas

Guanare 2022



UNIVERSIDAD NACIONAL
EXPERIMENTAL
DE LOS LLANOS OCCIDENTALES
"EZEQUIEL ZAMORA"

ACTA DE VEREDICTO

El 14 de DICIEMBRE de 2022 en las instalaciones del Vicerrectorado de Producción Agrícola de la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales "Ezequiel Zamora" ubicada en el municipio Guanare se reunió el Jurado Integrado por los profesores: JHONER RAMIREZ CI:

4931297

THAIDA BERRIOS CI: 4962386 y el tutor

RAFAEL BASTIDAS CI: 10053089 para evaluar el trabajo de

Aplicación de Conocimientos

titular Extractos Anuales Para el Control de Coleoptichum spp y Helicodogone spp patógenos de plantas

como requisito parcial para optar por el grado académico de Ingeniero Agrónomo, de los bachiller(es) Elizabeth Bastidas CI:

2735105 Rosa Rigob CI: 26.076.600 se otorga el trabajo discutido

en su forma y contenido, dando la calificación de (A).

Dando fe y constancia de lo aquí señalado firman:

Prof. Rafael Bastidas

CI: 10053089

Tutor [Firma]

Prof. Thaída Berrio

CI: 4962386

Jurado Principal Interno

[Firma]

Prof. JHONER RAMIREZ

CI: 4.931.297

Jurado Principal Interno

[Firma]

Prof. [Firma]

Carmen Giménez-M

CI: 16475397

Coordinadora del Subproyecto de Aplicación de Conocimientos II

Prof. [Firma]

Hender Pérez

17.306.263 CI:

jefe de Subprograma de Agronomía



ÍNDICE:

INTRODUCCION	7
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	10
JUSTIFICACION	12
Objetivos	14
Objetivos General	14
Objetivos Específicos.....	14
REVISION BIBLOGRAFICA.....	15
Marco teórico.....	15
Antecedentes	15
Bases teóricas.....	16
Extractos vegetales	16
Modos de acción de los extractos vegetales	16
Tipos de extractos vegetales.....	17
Extractos Etanólicos	17
Extractos acuosos	17
Extracción por centrifugación	17
Uso de Extractos Vegetales en el sector agrícola	17
Descripción de las plantas.....	18
Cola de caballo (Equisetum arvense)	18
Moringa (Moringa oleifera L)	19
Jabillo (Hura crepitans L.)	20
Descripción de los fitopatogenos.....	21
Hongos.....	21
Morfología	22
Reproducción de los hongos.....	23
Tipos de hongos.....	24
<i>Colletotrichum spp.</i>	24

Nematodos fitopatogeno	25
Importancia de los nematodos fitopatogenos	26
Hábitos alimenticios	27
Nematodo de agalla (Meloidogyne spp)	27
Taxonomía	29
Habitat.....	29
Reproducción	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Materiales y equipos	32
DISEÑO METODOLÓGICO	33
RESULTADOS	45
Mediciones de hongos	50
Análisis de los resultados	¡Error! Marcador no definido.
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54

ÍNDICE DE CUADROS:

Distribución de los tratamientos (in vitro): Cuadro 1	43
Distribución de los tratamientos (in vivo): Cuadro 2.....	44
Crecimiento promedio de la colonia de <i>Colletotrichum spp</i> en cada uno de los tratamientos. Cuadro 3.....	46
Comparación de medias del crecimiento de la colonia de <i>Colletotrichum spp</i> en el tratamiento moringa (<i>Moringa oleífera L</i>). Cuadro 4.....	48
Comparación de medias del crecimiento de la colonia de <i>Colletotrichum spp</i> en el tratamiento Cola de caballo. Cuadro 5.....	49
Comparación de medias del crecimiento de la colonia de <i>Colletotrichum spp</i> en el tratamiento Jabillo. Cuadro 6.....	49
Promedio de agallas en las raíces una vez aplicados los tratamientos. Cuadro 7	52

RESUMEN

Con el fin de desarrollar estrategias que permitan minimizar el uso de agroquímicos que afectan de manera negativa el ambiente y la salud humana, se llevó a cabo una investigación en el laboratorio de Fitopatología de la UNELLEZ sede Guanare, del estado Portuguesa, en la cual, se evaluaron tres extractos vegetales (acuosos), cola de caballo (*Equisetum arvense*), Moringa (*Moringa oleífera* L), y Jabillo (*Hura crepitans* L.) para el control de fitopatógenos como *Colletotrichum ssp* y *Meloidogyne spp* en concentraciones de 1 y 5%. Los resultados obtenidos dan cuenta que el tratamiento que mostro mayor efecto en la inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum spp*, fue el extracto de moringa (*M. oleífera* L) y que se comporta mejor en la medida que su concentración es mayor.

Palabras claves: **Extractos vegetales**, *Colletotrichum ssp* y *Meloidogyne spp*.

Abstract:

In order to develop strategies to minimize the use of agrochemicals that negatively affect the environment and human health, an investigation was carried out in the Phytopathology laboratory of UNELLEZ, Guanare campus, in the state of Portuguesa, in which, Three plant extracts (aqueous), horsetail (*Equisetum arvense*), Moringa (*Moringa oleífera* L), and Jabillo (*Hura crepitans* L.) were evaluated for the control of phytopathogens such as *Colletotrichum ssp* and *Meloidogyne spp* in concentrations of 1 and 5%. . The results obtained show that the treatment that showed the greatest effect in inhibiting the growth of the *Colletotrichum spp* fungus was the extract of moringa (*M. oleífera* L) and that it behaves better as its concentration is higher.

Key words: plant extracts, *Colletotrichum ssp* y *Meloidogyne spp*.

INTRODUCION

Durante los últimos años, los sistemas agrícolas se han visto afectados por el uso de agroquímicos para controlar el ataque de malezas, plagas y enfermedades, lo que ha generado graves problemas sobre la salud humana y de carácter ambiental; entre estos problemas, se cita la reducción de la biodiversidad como uno de los más importantes, seguido de la pérdida en la sanidad del suelo (Gan et al, 2017).

Algunos autores señalan que las pérdidas directas en rendimiento en productos agrícolas causadas por patógenos, animales y malezas oscilan entre el 20% y el 40%; mientras que otros estiman que al discriminar por continentes las pérdidas pueden variar entre el 29% y el 43% (Castaño et al, 2015).

Entre los hongos y oomycetos fitopatógenos más significativos tanto en pre como en poscosecha en distintos cultivos se encuentran algunos géneros como: *Botrytis*, *Puccinia*, *Rhizoctonia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Mycosphaerella*, *Hemileia*, *Tilletia*, *Ceratocystis*, *Cochliobolus*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Erysiphe*, *Sphaerotheca*, *Phytium*, *Plasmopara*, *Peronospora*, *Phytophthora*, entre otros (Hosni et al., 2013; Castaño et al, 2015).

Los fungicidas de síntesis han sido una de las estrategias más utilizadas por los agricultores para controlar las enfermedades causadas por estos; los más comunes en su composición química son compuestos fosforados, clorados, carbamatos, nitroderivados y derivados aromáticos (Martínez-Romero et al., 2008; Cantrell et al., 2012)

Sin embargo, en los últimos años el uso de fungicidas de síntesis química ha aumentado la preocupación del consumidor y se ha visto cómo su uso es cada vez más restrictivo debido a efectos carcinógenos, problemas de toxicidad residual, contaminación ambiental como disminución de la biodiversidad y contaminación del suelo y aparición de resistencia microbiana (Martínez-Romero et al., 2008; Cantrell et al., 2012)

El control biológico de enfermedades de plantas constituye una práctica ampliamente difundida y sigue siendo objeto de investigaciones en desarrollo. Las plantas tienen la capacidad de sintetizar una gran diversidad de metabolitos secundarios relacionados con diferentes mecanismos de defensa, entre los que se encuentran compuestos químicos como terpenos, fenoles, compuestos nitrogenados como alcaloides y compuestos azufrados, muchos de estos con propiedades antimicrobianas. Estos metabolitos tienen una función importante en la protección ante depredadores, microorganismos patógenos y herbívoros, así como diversos tipos de estrés abiótico (por ejemplo, exposición UV) (Cowan, 1999; Ávalos-García y Carril, 2009) (Citado por Mesa et al, 2019)

Nuestro objetivo en la presente investigación es mostrar el desarrollo de potenciales moléculas como fungicidas a partir de extractos obtenidos de especies vegetales y evaluados in vitro contra hongos fitopatógenos como un paso inicial al desarrollo de las alternativas tecnológicas prometedoras en el uso de bioproductos disponibles a partir de plantas. Estos potenciales productos pueden retardar la reproducción de microorganismos indeseables, y sería un método realista y ecológicamente sólido para la protección de los cultivos, lo que permitiría sustituir con éxito a los agroquímicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de los cultivos se ven atacados por diferentes enfermedades las cuales son provocadas por agentes bióticos que alteran las funciones fisiológicas de las plantas, afectando a su normal funcionamiento, reduciendo los rendimientos y en casos muy graves, provocándoles la muerte. Estos agentes bióticos son conocidos comúnmente como patógenos y algunos ejemplos de ellos son bacterias, hongos, virus o nematodos. (Álvaro 2019.)

Los hongos constituyen el grupo más importante de agentes fitopatógenos en razón del número y diversidad de enfermedades que causan. Además, existen hongos patogénicamente especializados sobre una sola especie vegetal o sobre las especies de un solo género. A ello hay que unir su extrema versatilidad parasítica, indicada por la variedad de especies y órganos vegetales que pueden atacar, la diversidad de síntomas y enfermedades que pueden inducir, y las estrategias de hábitos ecológicos, formas de nutrición y especificidad de las interacciones que utilizan para ello.(Carreras, et al, 2022).

Los hongos y nematodos que enferman a las plantas se conocen como fitopatógenos y tienen un gran impacto ya que, anualmente, destruyen un tercio de las cosechas producidas. Específicamente, causan la pérdida de cinco alimentos estratégicos: arroz, trigo, maíz, papa y soya, que a nivel mundial son de los más importantes. Si estos cinco cultivos fueran infectados simultáneamente, a tal grado de que toda la planta se perdiera, más del 60% de la población mundial no tendría qué comer (Carreras, et al, 2022).

La antracnosis es causada por el hongo *Colletotrichum spp* y es considerada como la principal enfermedad poscosecha de papaya (*Carica papaya* L.) siendo limitante en países productores como Hawái, México, y en muchas más regiones tropicales, Se han estimado pérdidas poscosecha en el cultivo de papaya de alrededor del 25-40%.(Mora 2009).

El nematodo *Meloidogyne* sp. Es uno de los patógenos más nocivos del tomate y en general de las solanáceas a nivel mundial, debido a que afecta severamente las raíces de estos cultivos (Sikora y Fernández 2005, Bhattarai et al. 2008). Estas afectaciones generan pérdidas a nivel mundial que se estima los \$US 100 billones (Birdet al 2003).

La capacidad de un organismo para adaptarse a diferentes condiciones cambiantes del ambiente depende de la riqueza en su “batería” genética (contenido en el genoma) y a la capacidad de ésta para cambiar y producir otras posibilidades que aumenten la batería genética. (Manzo et al, 2005)

Aunque los organismos de la misma especie comparten más del 95 por ciento de similitud en su genoma, existen diferencias entre unos y otros, lo cual constituye la diversidad genética. De ello surge la necesidad de encontrar métodos más adecuados para el control de hongos fitopatógenos, ya que actualmente el uso indiscriminado de productos químicos, que es el método de control más generalizado, causa grandes daños a la salud humana y al ambiente, así como también propicia la aparición de hongos resistentes. (Manzo et al, 2005)

La capacidad de los organismos fitopatógenos para poder modificarse genéticamente y adaptarse a diferentes condiciones en el ambiente, constituyen un gran problema en la producción (rendimiento y calidad) de alimentos, por tanto se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas y nuevas moléculas que permitan el control efectivo de estos organismos. (Manzo et al, 2005)

JUSTIFICACION

La crisis de contenedores a nivel mundial ha hecho que muchos insumos y alimentos incrementen su valor. Venezuela no escapa de ello, puesto que muchos agricultores importan semillas para la siembra, así como los fertilizantes, herbicidas y demás insumos para poder cosechar y garantizar los alimentos a los ciudadanos. Tenemos una dependencia de agroinsumos que parten desde la misma semilla, fertilizantes y agroquímicos de otros países. (López 2022).

La resistencia a fungicidas (y agroquímicos en general) tiene un costo financiero para productores agropecuarios, para los fabricantes de fungicidas y para toda la sociedad. Asimismo, el surgimiento de la resistencia reduce la disponibilidad de ingredientes activos con diferente modo de acción disponibles en la lucha contra los fitopatógenos, dificultando sobremanera el manejo agronómico de las enfermedades. (Carmona et al. 2017).

La resistencia depende del impacto de las propiedades de cada principio activo fungicida y de la estructura genética de las poblaciones de patógenos, como así también de las prácticas de manejo agronómico seleccionadas para cada patosistema. (Carmona M. et al. 2017).

En consecuencia, para combatir la resistencia, el uso de los fungicidas debe enmarcarse dentro de un programa de manejo integrado de enfermedades en combinación con las buenas prácticas agrícolas que garantizan las estrategias de manejo de resistencia a fungicidas. (Carmona M. et al. 2017).

Los mecanismos de resistencia a los fungicidas es un término que refiere a una reducción adquirida y heredable de la sensibilidad de un hongo a un principio activo antifúngico específico (Beckerman, 2013).

Es decir, la resistencia constituye una propiedad heredable y estable de los organismos fúngicos, por la cual obtienen la habilidad de adaptación a diferentes condiciones agronómicas normalmente adversas, y por lo tanto les permite sobrevivir. Por medio de este proceso de adquisición de resistencia, algunos

individuos de la población fúngica logran sobrevivir, multiplicarse y propagarse, a pesar de haber sido expuestos a la aplicación de un fungicida que normalmente controlaba a esa población (Hobbelen et al., 2014).

El fungicida ejerce una fuerte presión de selección sobre la población de patógenos ya que mata a la población inicial sensible, pero no mata a la población que ha cambiado (o mutante) (Gressel, 2011).

Sobre la base de estos planteamientos, se hace necesaria la búsqueda de nuevas moléculas en la naturaleza que muestren alguna actividad antifúngica o nematocida que permita el control de estos microorganismos (Gressel, 2011).

Objetivos:

Objetivos General

- ❖ Evaluar el efecto de tres extractos vegetales sobre *Colletotrichum spp* y *Meloidogyne spp*, patógenos de plantas

Objetivos Específicos

- ❖ Determinar *in vitro* el efecto de tres extractos acuosos sobre el hongo *Colletotrichum spp*
- ❖ Comparar el efecto de dos concentraciones diferentes de tres extractos acuosos sobre la inhibición de crecimiento del hongo *Colletotrichum spp*
- ❖ Comprobar *in vivo* el efecto de tres extractos acuosos sobre el nematodo agallador *Meloidogyne spp*.

REVISION BIBLOGRAFICA

Marco teórico:

Antecedentes

A continuación se exponen algunos estudios relacionados con la evaluación del efecto de extractos vegetales en diversos agentes fitopatogenos, para generar información que sirva como base a la recomendación de los extractos vegetales como biocontrolador.

María C. Lizcano (2007). Realizo un estudio titulado Evaluación de la actividad antifungica del extracto de tomillo (*ThymusVulgaris*) contra *BotrytisCinerea*, *fusarium Oxysporum* y *sclerotiorum* a concentraciones de 150,250 y 500g/L. Las pruebas realizadas fueron in vitro; se obtuvo un medio de cultivo con los extractos y se evaluó la tasa de crecimiento radical de los hongos, el tratamiento de 500g/L fue el que obtuvo mejores resultados.

Verónica Tayupanta R. (2012). Control in vitro de botrytis (***Botrytiscinérea***), mildiu (***Bremialactucae***) y esclerotinia (***Sclerotiniasclerotiorum***) en lechuga (***Lactua sativa***), usando extractos de cola de caballo (***Equisetum arvense***), ortiga (***Urtica dioica L***), ruda (***Ruta graveolens***) más tomillo (***Thymusvulgaris***). Los factores en el estudio fueron cuatros dosis de cada extractos (50% - 100% - 200% - 500%), aplicando 5ml de cada uno en cajas petri con el medio con el medio de cultivo PDA (papa, Dextrosa, agar/25ml/ caja. Se obtuvo que el extracto de cola de caballo (***Equisetum arvense***), presento la mayor acción fungicida tanto para el hongo ***Botrytiscinera*** como para el hongo ***BremiaLactucae*** a la dosis de 4 (500%), ya que presento el mayor halo de inhibición con promedios de 44 mm y 46,5mm y el extracto de Ruda (***Ruta graveolens***), tuvo mayor acción fungicida sobre el hongo ***SclerotiniaSclerotiorum*** a las dosis 4 (500%), ya que igualmente presento el mayor halo de inhibición con un promedio de 40,75mm.

Bases teóricas

Extractos vegetales:

Un extracto vegetal es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. El carácter especial de los extractos vegetales es que a partir de una misma planta se pueden obtener extractos diferentes con principios activos variados. También depende del solvente empleado para extraer una parte vegetal definida. (*Becerra et al* 2010).

Los extractos vegetales los componen múltiples ingredientes activos de origen natural y actúan bajo diversos modos de acción cuando son usados para el manejo de plagas y enfermedades. (Cock et al 2007).

Modos de acción de los extractos vegetales:

Según Cock et al (2007), los modos de acción son:

- Efecto repelente, se expresa cuando un extracto o sustancia tiene propiedades para que la plaga objeto del manejo se aleje, no llegue y permanezca fuera de la zona de interés en el sistema productivo (cultivo, potrero, establo, entre otros).
- Efecto deterrente, se refiere a la capacidad de una sustancia para evitar que una plaga cumpla su ciclo en una zona tratada, al interferir en su alimentación u ovoposición, sin importar si ésta se encuentra o no en la zona de interés.
- Por otro lado, algunas plantas tienen la capacidad de interferir en el normal desarrollo de otras plantas, este es el llamado efecto alelopático. A pesar de tratarse en su mayoría de efectos no letales, algunos extractos tienen la posibilidad de eliminar insectos (insecticidas), hongos (fungicidas), y bacterias (bactericidas) entre otras actividades biocidas.

Tipos de extractos vegetales

➤ Extractos Etanólicos:

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado. (Brewster, 1970).

➤ Extractos acuosos:

Son extractos cuyo solvente es el agua, son menos concentrados que los extractos hidroalcohólicos. No presentan sedimento y su color y aroma son más suaves. Se obtienen inmediatamente a partir de una planta fresca, según el método descrito por (Pérez *et al.* 2002).

➤ Extracción por centrifugación:

Los extractos y aceites obtenidos por este proceso tienen características aromáticas superiores a las conseguidas por extracción por arrastre de vapor. Al no ser un proceso térmico, sus propiedades son más estables, por los antioxidantes naturales presentes. Aun así, la fricción interna de la materia prima provoca un aumento de temperatura no controlable que puede implicar una degradación térmica y un oscurecimiento del extracto. (Bisset, 1994).

Uso de Extractos Vegetales en el sector agrícola.

Los extractos vegetales son preparados que se obtienen de la extracción alcohólica de sustancias fotoquímicas de diferentes productos vegetales, alimentos o condimentos, tienen importantes aplicaciones en el sector agrícola.

Los compuestos fotoquímicos presentes en extractos vegetales son de gran variedad y concentración, por lo que sus beneficios son muchos: pueden servir para combatir plagas y enfermedades en diferentes cultivos, así como también funcionar como estimulantes en el desarrollo, igualmente favorecen su desarrollo vegetativo y la activación de sus ciclos bioquímicos para la producción de sustancias específicas en las plantas.(Félix 2018).

Por otra parte, estos compuestos ayudan, como parte de la estimulación, a la inducción de resistencia en las plantas ante factores bióticos y abióticos (Félix 2018).

Descripción de las plantas:

Cola de caballo (*Equisetum arvense*).

Equisetum es un género de helechos llamados comúnmente “colas de caballo” de distribución mundial y de mayor riqueza en el hemisferio norte. Este género es reconocible por los ejes longitudinalmente surcados con costillas, por lo general, pronunciadas, con hojas verticiladas reducidas a escamas que forman una vaina y por esporofilos agrupados distalmente en unas estructuras a manera de cono, los estróbilos.(Hauke 1969; Mickel et al Smith 2004).

Se reconoce en la actualidad tres especies: *E. bogotense* Kunth, *E. giganteum* L. y la escasamente reportada *E. myriochaetum* Schltdl. & Cham. Existe la posibilidad que ocurran también híbridos (*Equisetum* X *schaffneri* Milde) entre estas dos últimas en las áreas de contacto como sí ocurre en América Central (Hauke 1969; Mickel et al 2004).

El uso de *Equisetum* como planta diurética es conocido en varios países de la región andina, especialmente *E. bogotense* y *E. giganteum* (Navarrete et al. 2006).

La presencia de oleorresinas en esa última es tema de interés farmacológico (e.g. Michielin et al. 2005; Danielski et al. 2007) habiéndose evaluado su caracterización fisicoquímica para control de calidad (Francescato et al. 2011).



Figura 1: Planta de Cola de caballo (*Equisetum arvense*).

Moringa (*Moringa oleífera* L)

Es originaria de la zona de los Himalayas. Como especie comestible se introdujo a América durante el siglo XIX (Falasca et al 2008), o quizá en la época colonial desde Filipinas por los tripulantes de la Nao de China (Olson et al 2011).

Es una de las 13 especies identificadas de la familia Moringaceae, perteneciente al género Moringa. Se identifica por sus hojas pinnadas y su vaina larga y leñosa, que al madurar se abre en tres valvas, la cual contienen las semillas con tres alas (Olson et al, 2011).

Esta planta se consume como alimento por su valor nutricional, y de acuerdo con la medicina ayurvédica (Singh, 2012a) se le atribuyen propiedades para el tratamiento de algunos padecimientos como asma, epilepsia, enfermedades de los ojos y de la piel, fiebre y hemorroides (Sanjay et al, 2015).

La semilla se usa para tratamiento de agua de río con sólidos suspendidos y aguas subterráneas (Aziz, Jayasuriya et al, 2015; Lijesh et al, 2016; Sasikala et al,

2015), y como fuente de aceite para la producción de biodiesel (Mofijur et al., 2014).

En moringa se han identificado proteínas, fibra, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, minerales (Amaglo et al., 2010; Asiedu-Gyekye et al, 2014), metabolitos secundarios (carotenos y tocoferoles) (Amaglo et al., 2010) y algunos metabolitos minoritarios (Müller et al, 2015); esto indica que puede ser materia prima para la industria alimentaria, de alimentos balanceados para animales y de cosméticos (Aney et al, 2009).



Figura 2: Planta Moringa (*Moringa oleífera* L)

Jabillo (*Hura crepitans* L.):

Árbol monoico de 7-8 m de altura, siempre verde o caducifolio, según los climas donde se cultive, con la copa ancha. Tronco y ramas normalmente con espinas cortas. La corteza es gruesa, lisa y de color gris marrón. Contiene un látex muy irritante. Hojas alternas, ovadas o acorazonadas, de 12-20 cm de longitud, con pecíolo de hasta 10-13 cm de longitud. Margen entero o dentado. Nerviación paralela muy marcada. Haz de color verde oscuro y envés algo más pálido. (Hartshorn, 1983).

Se encuentra distribuido en toda la planta: semilla, flor y látex, y está representado por dos toxoalbúminas: hurina y crepitina. Su látex es irritante y puede causar severas reacciones en la piel. (Hartshorn, 1983).



Figura 3: Planta de Jabillo (*Hura crepitans* L.)

Descripción de los fitopatogenos

Hongos:

Según Agrios, (2005); Urbina, (2011), los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes. La mayoría de las 100000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen.

Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los animales, la mayoría de las cuales son enfermedades superficiales de la piel o de sus apéndices. Agrios, (2005);

Se considera que más de 8.000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. Agrios, (2005); Algunos hongos crecen y se reproducen sólo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedante, durante todo su ciclo de vida estos hongos se conocen como parásitos obligados o biótrofos. Agrios, (2005);

Otros requieren de una planta hospedante durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en materia orgánica muerta o bien creciendo y reproduciéndose tanto en materia orgánica muerta como en plantas vivas (como por ejemplo los parásitos no obligados. Agrios, (2005);

Morfología:

La mayoría de los hongos tienen un área o soma vegetativo similar al de las plantas que consta de filamentos microscópicos continuos más o menos alargados y ramificados que tienen paredes celulares definidas. Al soma del hongo se le denomina micelio, y a las bifurcaciones individuales o filamentos del micelio se les denomina hifas. Cada hifa o micelio puede tener un grosor uniforme o pueden terminar en porciones más delgadas o más anchas. (Agrios, 2005).

Las hifas de algunos hongos tienen un diámetro de tan sólo 0.5 μm , mientras que otras tienen un espesor de más de 100 μm . En algunos hongos, el micelio tiene una longitud de tan sólo unos cuantos micrómetros, pero en otros produce filamentos miceliales de varios metros de longitud (Agrios, 2005).

En algunos hongos, el micelio está constituido por células que contienen uno o dos núcleos por célula. En otros, el micelio es cenocítico, es decir, contiene muchos núcleos y está integrado por una célula multinucleada continua y tubular que puede o no ramificarse, o bien puede estar dividido por varias paredes transversales (septos), de ahí que cada segmento represente una hifa multinucleada. (Agrios, 2005).

El crecimiento del micelio se produce en las puntas de las hifas. Algunos de los hongos inferiores carecen de un micelio verdadero y producen un plasmodio multinucleado, amiboideo y desnudo (como en los myxomycetes) o un sistema de filamentos de diámetro más o menos distinto y que varía constantemente, denominado rizomicelio (como en los chytridiomicetes). (Agrios, 2005).

Reproducción de los hongos

Los hongos se reproducen principalmente mediante esporas, las esporas son estructuras reproductoras o especializadas para la propagación del hongo, que constan de una o varias células. Estas estructuras pueden formarse asexualmente (mediante la producción, por el micelio del hongo, de células individuales especializadas las esporas sin intervención de cariogamia o meiosis) o ser el resultado de un proceso sexual (Agrios, 2005).

En los hongos inferiores, las esporas asexuales se forman en el interior de un saco denominado esporangio y se diseminan en el momento en que se rompe esta estructura o a través de una abertura que posee. Algunas de esas esporas se mueven mediante flagelos y se les denomina zoosporas (Agrios, 2005).

Otros hongos producen esporas asexuales denominadas conidios, que se desprenden de las células terminales o laterales de hifas especializadas denominadas conidióforos (Agrios, 2005)

En algunos hongos, las células intercalares o terminales de una hifa se alargan, están rodeadas por una pared densa y se separan para formar clamidosporas. En otros grupos de hongos, las esporas asexuales (conidios) se forman en el interior de estructuras de pared gruesa denominadas picnidios. (Agrios, 2005).

La reproducción sexual, o los procesos que se asemejan a ella, se presentan en la mayoría de los grupos de hongos. En algunos de ellos, un par de células (gametos) de tamaño y forma semejante se fusionan y producen un cigoto, denominado zigospora. (Agrios, 2005).

En otros grupos, los gametos son de tamaño distinto y al cigoto que forman se le denomina oospora. En algunos hongos, no se forman gametos definidos, y en lugar de ello un micelio se fusiona con otro micelio compatible (Agrios, 2005).

La fusión de los núcleos sexuales del cigoto produce un núcleo diploide ($2n$). Por lo común, las primeras divisiones de este núcleo son meióticas, de ahí que el hongo contenga núcleos haploides ($1n$) durante todo su ciclo de vida, excepto en el momento en que se han fusionado los núcleos genéticos (Agrios, 2005).

Sin embargo, en algunos grupos de hongos, en particular en los basidiomicetos y en menor grado en los ascomicetos, las células de todo el micelio o de ciertas partes de él contienen un par de núcleos haploides, los cuales se mantienen separados en el interior de la célula. A dicho micelio se le denomina dicariótico, pero se comporta de manera bastante semejante a como lo hace un micelio diploide (en el que ambos núcleos se mantienen fusionados) (Agrios, 2005).

En la mayoría de los hongos, los gametos masculino y femenino se forman en un mismo micelio (como es el caso de los hongos hermafroditas). Cuando los gametos masculinos fecundan a los femeninos del mismo micelio, el hongo se le denomina homotálico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los gametos masculinos fecundan únicamente a los gametos femeninos de otro micelio sexualmente compatible, por lo que se dice que el hongo es heterotálico (Rivera, 2007).

Tipos de hongos:

- ***Colletotrichum spp***

Es uno de los géneros patógenos de plantas más importantes y de mayor distribución en el mundo ya que ataca especialmente cultivos de regiones tropicales y subtropicales. (Manners et al., 2000).

La sintomatología se presenta en las hojas, pecíolos y/o tallos. Inicialmente las hojas afectadas presentan puntos rojizos, las lesiones crecen en forma irregular y se unen entre sí ocasionando necrosis total de la hoja (Negrete et al 1997).

En cuanto a las condiciones predisponentes, tenemos que la enfermedad se ve favorecida durante los periodos de invierno por lluvias intensas y fuertes con alta humedad relativa, ocasionando en muy poco tiempo brotes epidémicos severos que comprometen casi toda la planta en desarrollo (Melotto et al. 2000).

La severidad de la antracnosis ha llevado a los productores a realizar aplicaciones exageradas de fungicidas, causando contaminación ambiental, un aumento en los costos de producción y en algunos casos el abandono total del cultivo ante el fracaso de ésta práctica (Melotto et al. 2000).

El agente causal de antracnosis *Colletotrichum* sp, ha tomado gran importancia en cultivos a nivel mundial, intentándose desarrollar sistemas que modelen los procesos de infección y mecanismos de resistencia bioquímica para tener mayor conocimiento que sustente el manejo del patógeno. (Rodríguez et al, 2000).

Nematodos fitopatógeno

Los nematodos son un grupo diverso de organismos, parásitos y de vida libre. Generalmente son encontrados en todo el mundo (Coyne et al, 2007).

Es difícil o imposible ver a los nematodos en el campo, sus síntomas no suelen ser específicos, y por eso el daño que ocasionan suele ser atribuido a algún otro patógeno. Los nematodos reducen la producción agrícola aproximadamente un 11% a nivel mundial, ocasionando pérdidas de millones de toneladas anuales (Agrios, 2004).

Los nematodos fitoparásitos generalmente tienen una longitud que va de los 300-1000 micrómetros. Las hembras de algunos géneros pierden su forma de gusano o vermiforme al llegar a la etapa adulta, tomando forma de pera, limón, esférica o de riñón (Coyne et al., 2007).

En algunas especies existe un dimorfismo sexual definido, con hembras y machos bien diferenciados. Los sistemas reproductores están bien desarrollados: los nematodos hembras tienen de uno a dos ovarios y un útero que termina en una

vulva; los nematodos machos tienen un testículo, una vesícula seminal y termina en un orificio común con el intestino (Agrios, 2004).

Los nematodos fitoparásitos difieren de los nematodos que se alimentan de bacterias y hongos, por poseer una estructura especializada para alimentarse denominada estilete. Este es usado para inyectar enzimas dentro de las células vegetales y los tejidos, para luego extraer su contenido (Coyne et al., 2007).

Estos pueden constituir rápidamente una población a partir de uno o dos nematodos. La reproducción se realiza por la copulación de hembras y machos, anfimixis, pero puede darse por partenogénesis, hermafroditismo, pseudofertilización

en la cual se da una falsa fertilización del óvulo, y los nematodos intersexos, cuando un individuo tiene ambos órganos reproductivos, pero solo uno es funcional. Muchas especies carecen de machos (Agrios, 2004).

Todos los nematodos fitoparásitos pertenecen al filo Nematoda. La mayoría del género de los parásitos pertenece al orden Tylenchida, pero unos cuantos pertenecen al orden Dorylaimida y Aphelenchida (Agrios, 2004).

Importancia de los nematodos fitopatogenos

En la producción de alimentos hay factores que a menudo se combinan dando lugar a la disminución de la producción agrícola y es preciso cuantificar los principales factores limitantes de la producción, entre los cuales se incluyen los nematodos fitopatógenos. (Talavera, 2003).

Teniendo en cuenta la amenaza de los nematodos en relación a otras plagas y enfermedades, es un reto de enorme beneficio la cuantificación de los problemas nematológicos a través del reconocimiento, la mejora de los procedimientos de campo y laboratorio (Talavera, 2003).

Desde el punto de vista agrícola, los nematodos sedentarios son frecuentemente responsables de reducciones en la productividad de muchas cosechas. (Sanz-Alfárez., *et al.* 1995).

Aunque todos los nematodos pueden ejercer cierto impacto en la producción agrícola, los nematodos fitopatógenos constituyen el grupo más importante por su acción patogénica. Por ende, facilitan la entrada de otros agentes patógenos de suelo que pueden incrementar el daño en muchas plantas generando la disminución de la producción agrícola. (Agrios, 1997).

Hábitos alimenticios:

Los nematodos parásitos pueden separarse en parásitos aéreos (aquellos que se alimentan de partes aéreas de las plantas) y parásitos de raíces y tubérculos (aquellos que se alimentan de las partes subterráneas de la planta). Se dividen en tres grupos principales por su comportamiento alimenticio y movilidad: endoparásitos migratorios que son nematodos móviles que se alimentan dentro del tejido de las raíces (Coyne et al., 2007).

Los endoparásitos sedentarios los cuales una vez tienen un sitio de alimentación dentro de la planta, dejan de moverse y se alimentan solamente de una locación. Y los ectoparásitos, que se alimentan desde afuera de la planta (Coyne et al., 2007).

Nematodo de agalla (*Meloidogyne spp*):

El género *Meloidogynespp* agrupa a los nematodos formadores de agallas radicales y comprende a más de 90 especies descritas. La palabra *Meloidogyne* es de origen griego y significa hembra con forma de manzana (Perry et al, 2009).

Son un grupo polífago de importancia económica, altamente adaptados como parásitos obligados, están distribuidos cosmopolitamente y parasitan cada especie de planta superior (Perry et al, 2009).

Típicamente se reproducen y alimentan en células modificadas dentro de la raíz de la planta, donde ellos inducen pequeñas o largas agallas (Perry et al, 2009).

Después del primer descubrimiento en raíces de melón en invernaderos de Inglaterra, *Meloidogynesspp.*, fue reconocido como un importante patógeno en numerosos hospederos de plantas alrededor del mundo. Al final del siglo XIX, el reconocimiento de la importancia económica de *Meloidogynesspp.*, motivó a la realización de muchos estudios detallados sobre la morfología de los nematodos (Perry et al, 2009).

Aunque contribuciones adicionales en la morfología de todas las etapas en el ciclo de vida de *Meloidogynesspp.* fueron hechas por Nagakura (1930), el estudio más significativo en este aspecto fue realizado por Chitwood (1949), quien reveló que *Meloidogynesspp.* Comprende diferentes especies (Perry et al, 2009).

El nematodo se fija en las raíces y provoca la aparición de células gigantes que forman una agalla. Esta estructura dificulta la absorción de elementos del suelo. Los síntomas ocasionados por el ataque de este nematodo son similares a los producidos por deficiencias nutricionales e invasión de hongos del suelo (Agrios, 2004).

Frecuentemente las discusiones sobre *Meloidogynesspp.*, se concentran en las cuatro mayores especies: las tres especies tropicales, *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*, y la especie de clima templado, *M. hapla*. Cada una tiene un extenso rango de hospederos y están distribuidas alrededor del mundo (Perry et al, 2009).

Estas cuatro especies comprenden el 99% de todas las especies identificadas de una colección de 662 aislamientos de 65 países (Perry et al, 2009).

Taxonomía

Reino:	Animalia
Filo:	Nematoda
Clase:	Secernentea
Orden:	Tylenchida.
Familia:	Heteroderidae.
Generic:	Meloidogyne.
Generic:	Meloidogyne.Meloidogyne spp.

Habitat:

Según Perry et al (2009), las poblaciones de *Meloidogynespp.* de mayor importancia económica son habitantes de suelos agrícolas. En regiones tropicales, donde la temperatura no varía grandemente entre estaciones, *Meloidogynespp.*, puede reproducirse constantemente en la presencia de un hospedero y humedad favorable en el suelo.

Con suficiente aireación en el suelo y una adecuada humedad necesarios para el movimiento y la infección, suelos arenosos o bien estructurados y drenados, combinados con un régimen apropiado de irrigación o suficiente lluvia, favorece la reproducción del nematodo. *Meloidogynespp.*, es encontrado en suelos arenosos o franco arenosos (Taylor et al, 1983).

Otros factores como el pH y la salinidad del suelo pueden afectar la densidad de la población del nematodo, pero en general, si los hospederos del nematodo pueden desarrollarse satisfactoriamente en condiciones donde el pH del suelo y la salinidad no sean las adecuadas para *Meloidogynespp.*, la reducción de la población de *Meloidogynespp.* Será insignificante (Taylor et al, 1983).

La mayoría de la población se encuentra generalmente de los 5 a 30 centímetros debajo de la superficie del suelo, decreciendo su densidad hasta 1 metro de profundidad (Taylor et al, 1983).

Reproducción:

El estado citogenético del género *Meloidogynespp.* es complejo pero importante en el entendimiento de la biología y evolución de estos nematodos. Tienen tres modos de reproducción: anfigimixis, autogimixis y allogimixis. Únicamente un pequeño número de especies se reproduce por anfigimixis; es decir con la fusión obligatoria de los gametos del macho y de la hembra (Perry et al, 2009).

La mayoría de especies de *Meloidogynespp.* Se reproducen por partenogénesis (autogimixis y allogimixis). Durante la maduración del oocito, las especies apomíticas experimentan sólo una división mitótica. No existe la meiosis en esta división mitótica partenogenética obligatoria. En especies autogíticas, los oocitos experimentan una división por meiosis (Perry et al, 2009).

Cuando hay presencia de machos, el espermatozoide y el huevo se fusionan. Sin embargo, sin la presencia de un núcleo del espermatozoide, el núcleo del segundo cuerpo polar se fusiona con el pronúcleo del huevo y restaura el estado diploide. Por lo tanto, especies autogíticas son facultativamente partenogenéticas (Perry et al, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ubicación

El ensayo se llevo a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la UNELLEZ sede Guanare, situada en la carretera nacional vía Biscucuy, exactamente en la parroquia San Juan De Guanaguanare, sector mesa de cavaca, municipio Guanare del estado Portuguesa, Venezuela. A la cual le corresponden las coordenadas $4^{\circ}10'91.5''E$ $10^{\circ}02'06.1''N$ UTM Huso 19.

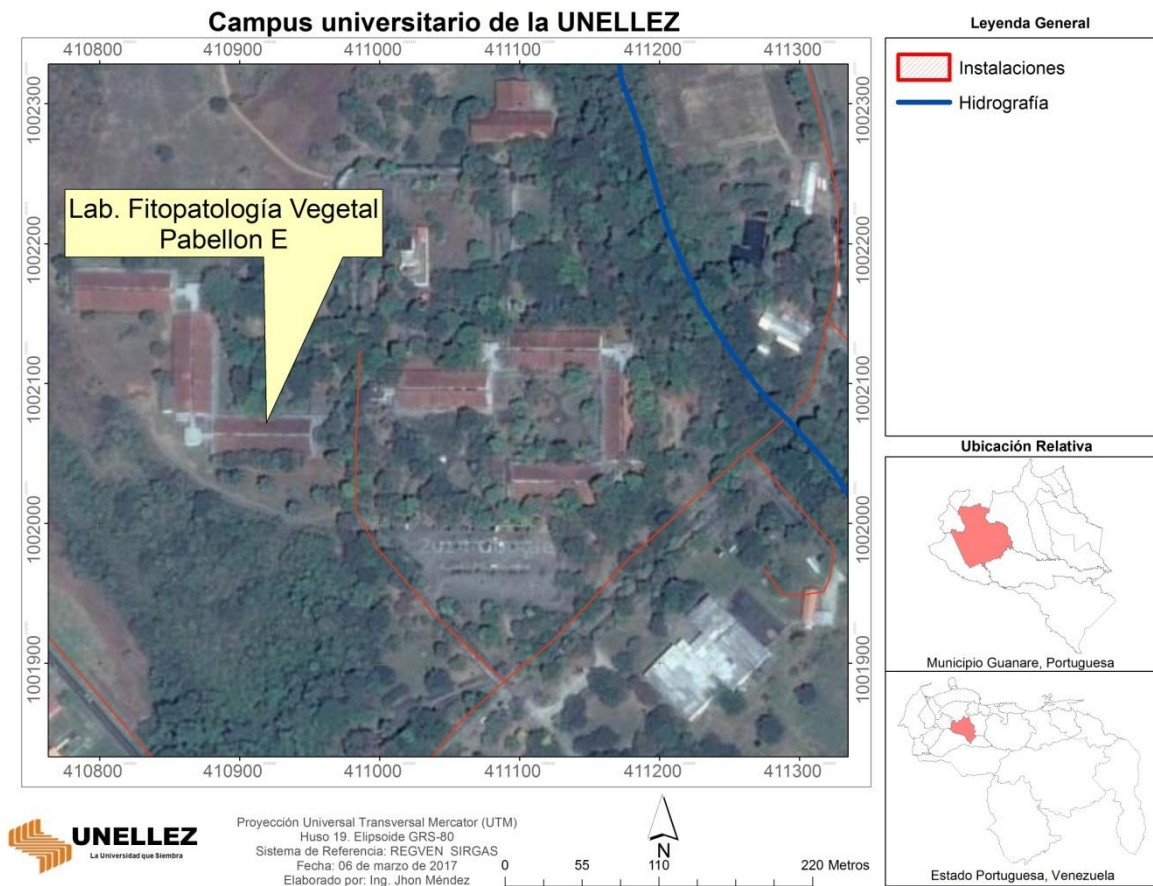


Figura 4: Imagen satelital del campus universitario UNELLEZ Guanare

Fuente: Laboratorio de cartografía, realizado por Ing. (Jhon Méndez, 2017)

Materiales y equipos

- . Capsulas de Petri
- . Medios de cultivo (AM o PDA Y AN)
- . Extractos (Moringa, Jabillo, Cola de caballo)
- . Gasas
- . Beaker 1000ml
- . Fiolas de 1000ml
- . Balanza
- . Microscopio
- . Papel parafilm
- . Plancha de calentamiento y agitación
- . Licuadora
- . Autoclave
- . Lápiz y cuaderno de nota
- . Mechero
- . Vial
- . Tubos de ensayo
- . Marcador

DISEÑO METODOLÓGICO

Con el fin de dar cumplimiento a los objetivos planteados, las actividades se cumplieron en 2 fases:

I. Fase de campo

II. Fase de laboratorio

I-. FASE DE CAMPO

1-. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

1.1-. Recolección de las muestras:

Las muestras vegetales para la preparación de los extractos se colectaron dentro de las instalaciones del campus universitario.

1.2-. Muestreo del suelo y raíces para extracción de nematodos:

Para la extracción de los nematodos (*Meloidogynespp*) se procedió a colectar raíces y suelo de plantas de tomate (*Lycopersiconesculentum Mill*) afectadas con el patógeno, las raíces presentaban abultamientos o crecimientos exagerados (hiperplasias e hipertrofias) conocidas como agallas.



Figura 5: Muestreo en campo del suelo y raíces para extracción de nematodos.

1.3-. Manipulación y traslado de las muestras:

Se previó todo lo concerniente al manejo adecuado de las muestras con el fin de preservar las mismas. Las muestras vegetales para la preparación de los extractos fueron colectadas considerando solo tejido sano, en el caso del jabillo se colectaron semillas, para la moringa se colectaron las vainas para posteriormente obtener las semillas y en el caso de la cola de caballo se colectó tejido foliar, las muestras fueron envasadas e identificadas.

Las muestras de tejido enfermo, agallas, tejido foliar y suelo para la extracción de los nematodos, se recolectaron y se depositaron en bolsas plásticas, etiquetadas y cerradas adecuadamente, con la información básica, la cual se etiquetó externamente a la bolsa plástica con la muestra. Es importante señalar que las muestras de raíces se introdujeron en bolsas individuales debidamente identificadas y cerradas. Todas las muestras vegetales y de suelo fueron colocadas en una cava con hielo hasta su traslado al laboratorio de Fitopatología para su posterior procesamiento.

II. Fase de laboratorio

1-. Procesamiento de las muestras

1.1-. Aislamiento del hongo:

Esta técnica consistió en lavar las muestras colectadas con agua corriente del chorro, se tomó la muestra con una pinza de metal, se colocó sobre papel absorbente estéril para cortar el tejido que se llevó a desinfección, fue necesario contar con tres tapas de capsulas de Petri previamente esterilizadas, la primera con cloro al 3%, la segunda y tercera con agua destilada estéril (ADE), una vez desinfectado el tejido fue colocado sobre papel absorbente estéril, se cortaron los bordes para eliminar restos de cloro y se cortaron trozos de tejido de aproximadamente 5mm², posteriormente el tejido fue sembrado en capsulas contentivas con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, acidificado (PDAa).

1.2-. Multiplicación del Patógeno:

Una vez obtenidas las colonias puras del hongo se procedió con la ayuda de una aguja de disección estéril a cortar un pequeño disco de aproximadamente 5mm y se trasladó a una capsula con medio de cultivo PDAA, las capsulas fueron selladas con papel parafilm e identificadas y observadas durante su crecimiento (Fig.6)

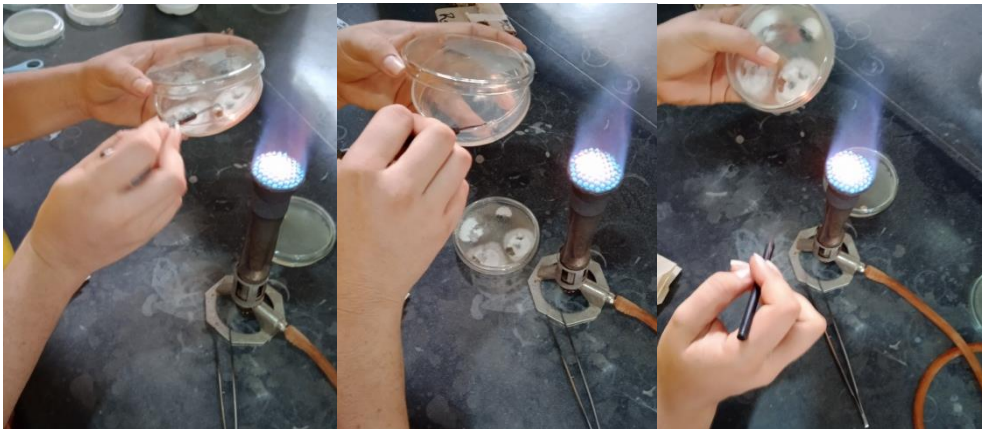


Figura 6: Multiplicación del hongo *Colletotrichum* spp en medio de cultivo PDA

2-. Extracción de nematodos del suelo:

En el laboratorio de Fitopatología mediante el empleo del método de flotación en azúcar (modificado por Pérez et al, 2007) se procesaron las muestras de suelo.

Actualmente esta técnica, es utilizada rutinariamente en muchos laboratorios, debido especialmente a que es efectiva para extraer huevos, estados inmóviles, formas inactivas y nematodos muertos. Además es un método rápido, que permitirá procesar y leer gran cantidad de muestras en pocas horas, solo es importante destacar que dicho método por medio del estrés osmótico que se produce en la solución, pudiese matar o distorsionar los nematodos, por lo tanto es necesario enjuagarlos con suficiente agua para ayudar a la recuperación de los mismos.

Los pasos que se emplearon para poder llevar a cabo esta metodología fueron los siguientes:

- Se pesaron 100 gramos del suelo al que previamente se le eliminaron residuos de raíces, piedras y otros desechos, se mezclaron con 2 litros de agua, a continuación se agitó la solución durante 2 min y se dejó reposar por 1 minuto.
- Luego se trasvasó la solución a través de los tamices de 100, 200 y 325; seguidamente se recolectó el sedimento que reste en el tamiz de 200 y se mezcló con el sedimento del tamiz de 325.
- Sucesivamente se procedió a trasvasar el sedimento a un tubo de centrifuga con la menor cantidad de agua y centrifugar a 1750 rpm por 5 minutos, (a través de este proceso se espera que los nematodos queden sedimentados en el suelo). Al cumplirse los 5 minutos se retiró el tubo de la centrifuga y se descartó el exceso de agua, el cual fue sustituido por una solución saturada de azúcar a una concentración 454 gramos por litro (g/l) de agua.
- Luego, el tubo con la solución saturada de azúcar se llevó nuevamente a la centrifuga y se centrifugó a 1750 rpm, por espacio de 2 minutos (en este proceso los nematodos quedaran suspendidos o flotando en la suspensión de azúcar)
- Posteriormente se recolectó el excedente de la solución saturada de azúcar en un punto fijo del tamiz de 325.
- Seguidamente se lavó rápidamente el área donde se dispuso la solución azucarada, los nematodos recuperados se verterán en un cilindro pequeño donde se enrasará hasta 10 ml. seguidamente se podrá realizar la observación en el microscopio, que permitió determinar la presencia de nematodos en la muestra evaluada, concluyendo así la extracción de nematodos de la muestra de suelo.

2.1-. Extracción de nematodos en raíces:

El protocolo de extracción de nematodos que se llevó a cabo fue a través de la metodología de macerado y filtrado, el cual se ejecutó en el Laboratorio de Fitopatología (adaptación del método de Pérez y Suarez, 2007) utilizado en el sub-proyecto de Fitopatología. (Fig 7)

Las muestras de raíces se seleccionaron y lavaron con agua corriente, eliminando así la tierra adherida sin eliminar las raicillas secundarias. Luego las raíces fueron cortadas en trozos de 1 a 2 cm de longitud, se tomaron y pesaron 25 gramos de la muestra, seguidamente se vertieron las raíces en una licuadora (Oster) se licuaron 3 veces por un periodo de (5 segundos) separados en intervalos de (5 segundos), seguidamente la solución se filtró a través de una batería de tamices de 100-200-325 micras (μ), del tamiz de 325 μ con la ayuda de una piseta con agua destilada se colectó la solución con nematodos en tubos para centrifuga (Dynac), para ser sometidos al proceso de centrifugación a 1750 rpm por 5 minutos, (en este proceso los nematodos quedan sedimentados en el fondo).

Transcurrido los 5 minutos se retiró el tubo de la centrifuga y descarto el sobrenadante, procediendo a sustituirlo con una solución saturada de azúcar, (concentración de 454 gramos de azúcar/litro de agua) se agito rápidamente con una varilla de vidrio, y se llevó nuevamente el tubo a la centrifuga por 2 minutos. (En este procedimiento los nematodos quedan suspendidos o flotando en la solución de azúcar). Posteriormente se recolectó el excedente (solución saturada de azúcar) en un punto fijo del tamiz de 325 lavando rápidamente el área donde se vertió la solución azucarada, lavando el exceso de la misma, se recuperaron los nematodos en un cilindro de 10 ml, enrazado hasta obtener 10 ml. La solución se colocó en viales de vidrio y se realizaron las observaciones en microscopio (Leica),

Al obtenerse los 10 ml de la solución madre resultante del proceso de extracción contenida en viales se procedió a tomar 6 ml de esta solución de la cual

se realizó el conteo de nematodos en base a ese volumen. El resultado de nematodos/ml se multiplico por el volumen de la solución original recuperada de la extracción, para conocer la cantidad de nematodos total en la solución madre, las cuales se corroboraron con 5 réplicas de conteo. Luego del total de nematodos de la solución madre mediante el uso de una pipeta se extrajeron 2 ml del inoculo con el fin de tener un aproximado de 20 nematodos por cada repetición.



Figura 7: Proceso de extracción de nematodos en las raíces.

2.2-. Preparación de las unidades experimentales

Para comprobar el efecto de los extractos sobre el nematodo agallador *Meloidogyne spp*, se procedió a esterilizar suelo en estufa durante dos periodos de tres horas a 180°C, una vez enfriado, se procedió a la siembra de semillas de tomate en vasos plásticos numero 77, a tal efecto se sembraron dos semillas de la variedad Santa Clara y se colocaron bajo techo. (Fig 8)



Figura 8: Germinación de las semillas y sobre de semillas certificadas

3-. Preparación de los extractos vegetales

3.1-. Colecta del material vegetal:

El material vegetal empleado consistió en semillas de moringa (*M. oleífera*L.), semillas de jabillo (*H. crepitans*L.) y tallos de cola de caballo (*E. arvense*) recolectadas en las áreas verdes del campus universitario, se etiquetaron y trasladaron al laboratorio de fitopatología para su procesamiento.

.3.2-. Preparación de los extractos acuosos de moringa (*M. oleífera L.*), jabillo (*H. crepitans L.*) y Cola de caballo (*E. arvense*)

Para la obtención de los extractos acuosos se siguió la metodología utilizada por Widmer y Laurent (2006), (Fig 9) descrita a continuación:

- El material vegetal fue descortezado y despulpado manualmente para liberar las semillas, las cuales se deshidrataron por 24 horas al medio ambiente y por 42 horas a una temperatura controlada de 40°C en un horno de secado (estufa). Se pesaron 20 gramos de semillas, las cuales fueron colocadas en un erlenmeyers de 500 ml de capacidad, el cual contenía 100 ml de agua destilada.
- El material vegetal de cada una de las plantas en estudio se vertieron en una licuadora (Oster) con 100 ml de agua destilada. Luego cada una de las especies se licuó tres veces por periodos de 15 segundos con intervalos de 5 segundos consecutivamente. Posteriormente las soluciones obtenidas se colocaron cada una en fioles de 500 ml.
- Cada uno de los concentrados obtenidos y dispensados en fioles fueron tapados con papel de aluminio y llevados a esterilización en autoclave (Tipo olla marca Allamerican) durante 45 minutos a 121°C y una atmósfera de presión (15 lbp).

- Cumplido el tiempo de esterilización, se procedió a filtrar el líquido a través de gasa estéril, así de este modo se separaron los residuos sólidos de la parte líquida que fue colocada en fioles estériles.
- A continuación se redujo el volumen del líquido filtrado por medio de calentamiento con un mechero hasta obtener 20 ml, el extracto obtenido se procesó mediante centrifugado (Dynac), a 5000 rpm durante 10 minutos, esto con el fin de eliminar los sólidos remanentes.
- El sobrenadante se colocó en contenedores de vidrio (viales) y se procedió a esterilizar nuevamente durante 20 minutos a 121°C y una atmósfera de presión. Luego estos extractos obtenidos se almacenaron en nevera a $\pm 8^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su empleo.



Figura 9: Pesado y preparación de los extractos.

4-. Determinación in vitro del efecto de los extractos acuosos sobre el hongo *Colletotrichum spp*

Para determinar el efecto de cada uno de los extractos sobre el crecimiento del hongo *Colletotrichum spp*, se procedió a preparar el medio de cultivo PDAa y se mezcló con cada extracto, se dispuso en capsulas de Petri y se dejó solidificar para posteriormente sembrar un disco de aproximadamente 5mm de diámetro contentivo del micelio del hongo a evaluar. (Fig 10)



Figura 10: preparación de PDA y PDA con los extractos

4.1-. Comprobación del efecto de dos concentraciones diferentes de los extractos acuosos sobre la rata de crecimiento del hongo *Colletotrichum spp*

Se procedió a preparar dos concentraciones diferentes de cada uno de los extractos 1 y 5%, una vez preparado el medio de cultivo PDAA se mezcló con cada concentración según los cálculos siguientes:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Extracto al 1%

$$1 \times 1\text{ l} = 100 \times V_2 \quad V_2 = 1 \times 1 / 100 = 0,01 \text{ l} = 10\text{ ml}$$

Extracto al 5%

$$5 \times 1\text{ l} = 100 \times V_2 \quad V_2 = \frac{5}{100} = 0,05 \text{ l} = 50\text{ ml}$$

Seguidamente con la ayuda del reverso de una pipeta Pasteur debidamente esterilizada, se procedió a cortar discos de 5mm de diámetro del medio con el micelio del hongo *Colletotrichum spp*, (Fig 11) Una vez dispensada la mezcla de PDAA y extracto vegetal y dejado solidificar el medio, se procedió a sembrar en el

centro de la capsula de Petri con la ayuda de una aguja de disección un disco de agar con micelio del hongo, se selló con papel parafilm y se dejó incubar sobre el mesón del laboratorio a 25 ± 1 °C, a partir de las 24 horas de crecimiento se procedió a tomar la medición del diámetro de la colonia hasta el momento en que el testigo completase o llenase la capsula de Petri



Figura 11: Siembra del Hongo en capsulas con PDA y los extractos.

4.1.1-. Distribución de los tratamientos (in vitro):

Cuadro 1. Tratamientos aplicados en condición de laboratorio (fase *in vitro*).

TRATAMIENTO	DESCRIPCION
T0	SOLO <i>Colletotrichum spp</i>
T1	Extracto de Moringa 1% + <i>Colletotrichum spp</i>
T2	Extracto de Cola de Caballo 1% + <i>Colletotrichum spp</i>
T3	Extracto de Jabillo 1% + <i>Colletotrichum spp</i>
T4	Extracto de Moringa 5%+ <i>Colletotrichum spp</i>
T5	Extracto de Cola de Caballo 5%+ <i>Colletotrichum spp</i>
T6	Extracto de Jabillo 5%+ <i>Colletotrichum spp</i>

4.2-. Comprobación del efecto de dos concentraciones diferentes de los extractos acuosos en la sobrevivencia y desarrollo de las agallas causadas por *Meloidogyne spp*

Con el fin de comprobar la efectividad de los extractos de moringa (*Moringa oleífera L*) , jabillo (*Hura crepitans L.*), y cola de caballo (*Equisetum arvense*) en concentraciones de 1 y 5 %, se procedió a inocular en plantas de tomate, a tal efecto, con la ayuda de una pipeta se tomaron 2 ml de una solución con nematodos la cual tenía una concentración aproximada de 10 nematodos/ml, se evaluaron de igual manera dos condiciones, una primera condición donde se aplicó en primer lugar la solución de nematodos y a las 24h se aplicó el tratamiento en cada una de sus concentraciones, y una segunda condición o momento donde se aplicó en primer lugar el tratamiento con cada una de las concentraciones de los extractos y posteriormente el inoculo con el nematodo(Cuadro 2). Una vez aplicados los tratamientos, las plantas se mantuvieron bajo techo y con los cuidados y labores pertinentes. (Fig 12)



Figura12: Inoculación de nematodos y aplicación de extractos a las plantas.

4.2.1 Distribución de los tratamientos (in vivo):

Cuadro 2. Tratamientos aplicados en condición de laboratorio (fase *in vivo*).

TRATAMIENTO	DESCRIPCION
T1	Nematodos
T2	Nematodos + Jabillo 1%
T3	Nematodos + Cola de caballo 1%
T4	Nematodos + Moringa 1%
T5	Jabillo 1% + Nematodos
T6	Cola de caballo 1% + Nematodos
T7	Moringa 1% + Nematodos
T8	Nematodos + Jabillo 5%
T9	Nematodos + Cola de caballo 5%
T10	Nematodos + Moringa 5%
T11	Jabillo 5% + Nematodos
T12	Cola de caballo 5% + Nematodos
T13	Moringa 5% + Nematodos

5-. Diseño experimental

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento, aplicando la T de Student para muestras independientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

1-. Determinación *in vitro* del efecto de tres extractos acuosos sobre el hongo *Colletotrichum spp*

El cuadro 3 y el grafico 1 nos muestran los valores promedios de crecimiento del hongo *Colletotrichum spp* sobre el medio PDAA con cada uno de los extractos vegetales objetos de estudio

Cuadro 3. Crecimiento promedio de la colonia de *Colletotrichum spp* en cada uno de los tratamientos

TRATAM	D1	D2	D3	D4	D5	D6
T0	0	1,78	3,07	3,8	4,42	5,61
TMO	0	1,2	2,35	3,16	3,83	4,63
TCC	0	1,4	2,63	3,78	4,42	5,14
TJAB	0	1,71	3,11	4,09	4,84	5,56

T0= testigo; TMO= moringa; TCC= cola de caballo; TJA= jabillo

En el grafico 1, podemos apreciar que el tratamiento que mostro un mayor efecto en la inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum spp*, fue el extracto de moringa (*Moringa oleífera L*), seguido de los extractos cola de caballo (*Equisetum arvense*), y jabillo (*Hura crepitans L.*) respectivamente, este comportamiento se mantuvo durante los seis días de medición de la colonia, es decir, desde el punto de vista estadístico moringa (*Moringa oleífera L*) resulto superior al resto de los tratamientos.

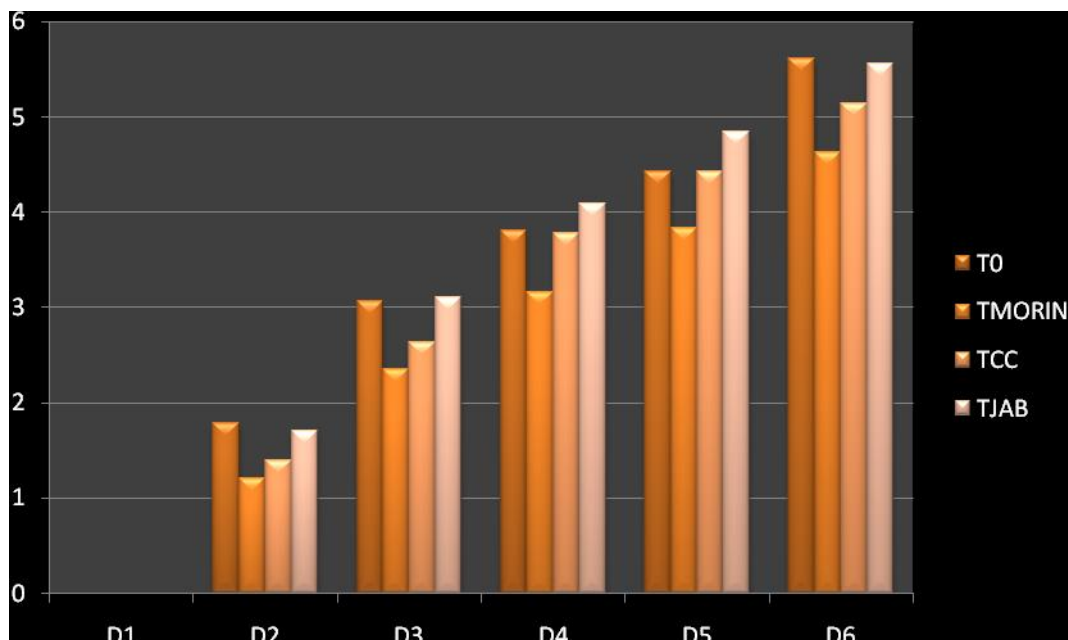


Grafico 1. Crecimiento diario promedio de la colonia de *Colletotrichum spp* en cada uno de los tratamientos

La evaluación de extractos vegetales sobre la inhibición de patógenos a nivel *in vitro* es la primera fase que indica el potencial prometedor de una planta para ser usada en tratamientos pre y poscosecha.

Hernández et al., 2007 citado por Duarte et al., 2021 señalan que en condiciones *in vitro* los extractos inhiben el crecimiento del patógeno, así como la esporulación y germinación de esporas, de modo que ayudan a controlar las enfermedades de diferentes productos agrícolas.

En base a los resultados, podemos señalar que existe una similitud con los resultados obtenidos por Holguin (2016) quien logro controlar el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. Quitoense, con extractos acuosos de moringa

De igual manera Barrios y Herrera (2022) sugieren que el tratamiento de Moringa presenta potencial para ser incorporado en los programas de control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano

Sin embargo difieren con los resultados presentados por Restrepo y Martinez (2021) quienes reportaron que el extracto de moringa no presento efecto antifungico en el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en platano.

2-. Comprobación del efecto de dos concentraciones diferentes de tres extractos acuoso sobre la rata de crecimiento del hongo *Colletotrichum spp*

Los cuadros 4, 5 y 6, nos muestran los valores promedios (medias) de cada tratamiento en cada una de sus concentraciones (Fig 13), en el cuadro 4 se puede apreciar la comparación de los valores medios de los tratamientos 1 y 4 correspondientes a moringa (*Moringa oleífera L*), al 1 y 5 % respectivamente, de igual manera nos muestra el valor del estadístico F, el cual nos indica que existe una significancia entre estos tratamientos, esto es, el tratamiento moringa tuvo un efecto en la inhibición del crecimiento de la colonia de *Colletotrichum spp* al compararse con el testigo, al observar los valores de las medias entre las concentraciones se aprecia que la mayor concentración (5%) resulto superior a la menor concentración (1%)



Figura 13: Mediciones finales del crecimiento del hongo.

Cuadro 4. Comparación de medias del crecimiento de la colonia de *Colletotrichum spp* en el tratamiento moringa (*Moringa oleífera L*), concentraciones 1 y 5 %

Estadísticos de grupo					
	Grupos	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Tratamientos_1_4	1%	42	3,0619	1,86010	,28702
	5%	42	2,0167	1,35789	,20953

Significancia (F)= 0,04*

Seguidamente se muestran los cuadros 5 y 6, en los cuales se puede apreciar los valores medios de crecimiento para la colonia de *Colletotrichum spp* en los tratamientos cola de cola (*Equisetum arvense*) y jabillo (*Hura crepitans L.*) (1 y 5 %), los valores de F nos indican valores no significativos (ns) para ambos tratamientos, esto significa que estadísticamente no existen diferencias al compararse con el tratamiento testigo, esto es, no hubo efecto de los tratamientos en la inhibición del crecimiento de la colonia de *Colletotrichum spp*

Cuadro 5. Comparación de medias del crecimiento de la colonia de *Colletotrichum spp* en el tratamiento Cola de caballo concentraciones 1 y 5 %

Estadísticos de grupo					
	Grupos	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Tratamientos_2_5	1%	42	3,0095	2,00388	,30920
	5%	42	2,9929	1,88943	,29155

Significancia (F)= 0,969 ns

Cuadro 6. Comparación de medias del crecimiento de la colonia de *Colletotrichum spp* en el tratamiento Jabillo concentraciones 1 y 5 %

Estadísticos de grupo					
	Grupos	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Tratamientos_3_6	1%	42	3,2286	2,12423	,32778
	5%	42	3,2167	1,96704	,30352

Significancia (F) = 0,979 ns

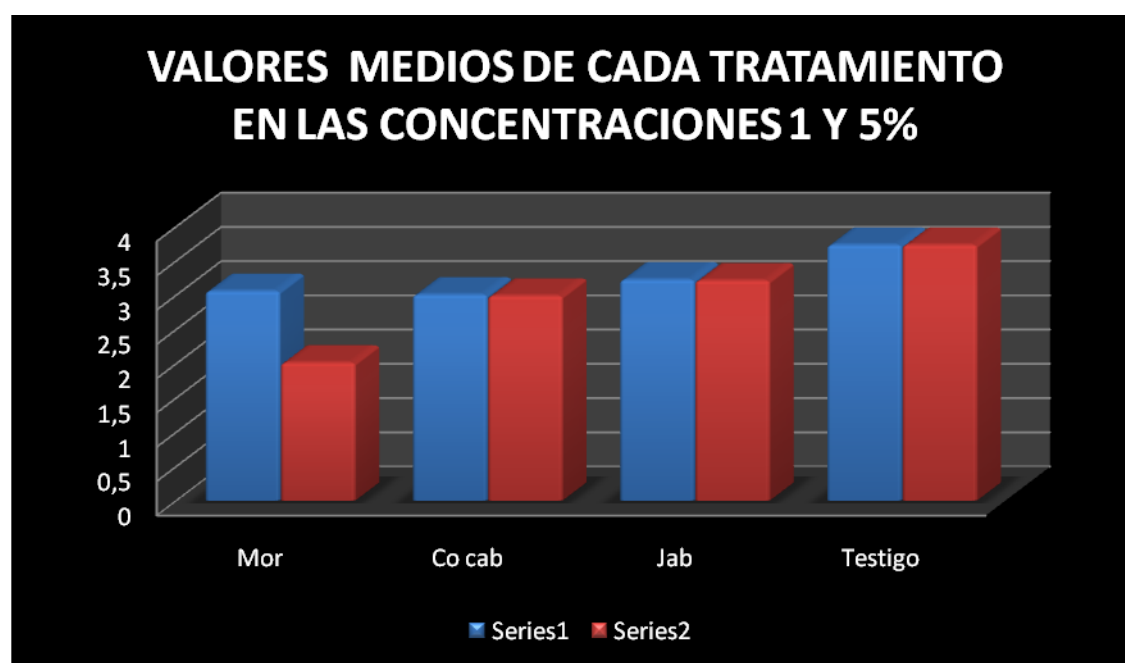


Grafico 2, valores medios de cada tratamiento en las concentraciones 1 y 5%

Estos resultados muestran similitud con los reportados por Holguin (2016), quien encontró que la mayor concentración (15%) del extracto de moringa tuvo mejor efecto en la inhibición del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. quitoense, en plántulas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.).

De igual manera Morales (2017), en evaluaciones *in vitro* del extracto de hoja de moringa, reporto que la mayor concentración usada (10%) resulto con efecto antifungico ante el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

3- Comprobacion in vivo del efecto de tres extractos acuosos sobre el nematodo agallador *Meloidogyne spp*

El cuadro numero 7, nos muestra los valores promedio del efecto de los extractos acuosos sobre el nematodo agallador *Meloidogyne spp*, (Fig 14). Se puede apreciar que solo en los tratamiento T3, T4, T5, T10, y T11 se desarrollaron agallas, el resto de los tratamiento no mostro el desarrollo de síntomas, de igual manera, al apreciar el comportamiento del tratamiento testigo (To) observamos que el nematodo no tuvo la capacidad patogénica esperada, es decir, no se presento el desarrollo de nódulos en las raíces.

Cuadro 7. Promedio de agallas en las raíces una vez aplicados los tratamientos

	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Promedio
T1	0	0	-	-	0
T2	0	0	0	0	0
T3	1	1	2	2	1.5
T4	3	5	-	-	2.0
T5	1	1	0	0	0.5
T6	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0
T8	0	0	0	0	0
T9	0	0	0	0	0
T10	1	0	0	-	0.25
T11	2	0	-	-	0.5
T12	0	0	0	0	0
T13	0	0	0	-	0

Desde el punto de vista estadístico no se pudo realizar una comparación válida debido a que el testigo no mostró el desarrollo de agallas por efecto del nematodo, dada esta situación podemos inferir que la presión del inoculo no fue la adecuada, es decir, la concentración de nematodo fue muy baja como para que se pudiesen desarrollar las agallas.



Figura 14: conteo de agallas en las raíces de las plantas de tomate.

CONCLUSIONES

- El extracto con mejor comportamiento en cuanto a la inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum spp* fue *Moringa oleífera* L.
- La concentración correspondiente al 5% resulto con mejor efecto sobre el patógeno *Colletotrichum spp*
- No se logro demostrar el efecto de los extractos sobre el nematodo *Meloidogyne spp*

RECOMENDACIONES

- Emplear otros órganos de las plantas en la preparación de los extractos.
- Aumentar la concentración de los extractos.
- Realizar análisis fitoquímicos a los extractos.
- Enfrentar estos extractos con otros tipos de hongos.
- Aumentar la concentración de nematodos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agrios, G. 1989. Fitopatología. Trad. del Inglés por Manuel Guzmán Ortiz. México: Limusa. p. 147, 663- 673
- Barrios M, I. y Herrera Q, J. 2022. Comparación de la eficacia antifúngica del extracto de Moringa (Moringa Oleífera Lam) frente a fungicidas químicos y biológicos comerciales para el control de Sigatoka Negra (Mycosphaerella Fijensis variedad Difformis Morelet) en el municipio de Carepa Antioquia. Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD Escuela De Ciencias Agrícolas, Pecuarias Y Del Medio Ambiente Turbo – Antioquia.
<https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/50841/jlherreraq.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cock N. y J. Jiménez. 2007. Los Extractos Vegetales De Uso Agrícola: Solución Eficaz Y Sostenible Para El Manejo Integrado De Cultivos.
- Chen, J. (2007). Extractos estandarizados de hierbas medicinales chinas: estudio de caso del danshen (Salvia miltiorrhiza Bunge). J. FoodDrug Anal., 347 – 364
- Chirinos, J. 2009. Uso de extractos naturales como una alternativa Ecológica para el control de enfermedades en plantas. INIA divulga. Septiembre-diciembre. 40-42p.
- Giraldo, S., & Bernal, M. (2015). Descripción del uso tradicional de plantas Medicinales en mercados populares de Bogotá, D.C. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, 73-80.
- Gonzalez, A. (2004). Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas Amazónicas Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

González A. j 2013. Área de Cultivos Hortofrutícolas Y

Forestales. *Sclerotium rolfsii*, un patógeno de judía que produce
daños de forma ocasiona.

Holguin O, N. 2016. Evaluación in vitro de actividad inhibitoria de extractos de
Moringa oleífera Lam. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *Quitoense*, en
plántulas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.). UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MANIZALES INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
Y BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL MAESTRÍA EN
MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL MANIZALES.

<https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/1486/1/N%C3%A9stor%20Fabio%20Holgu%C3%ADn%20Osorio.pdf>

Jiménez M, Arrellanes 2015. Usos potenciales en la agricultura, y Medicina.

Morales M, F. 2017. EVALUACIÓN DE DOSIS CRECIENTE DEL
EXTRACTO DE MORINGA (*MORINGA OLEIFERA*)
SOBRE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*, CONDICIONES DE CAMPO
Y LABORATORIO. Universidad Técnica de Machala

[http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10530/1/DE00004_TRABAJO
DETITULACION.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10530/1/DE00004_TRABAJO_DETITULACION.pdf)

Manzo S. M, Blondy, C y Andrew J. 2005. Hongos patógenos: enemigo Versátiles.

.

Morales M, F. 2017. EVALUACIÓN DE DOSIS CRECIENTE DEL EXTRACTO
DE MORINGA (*MORINGA OLEIFERA*) SOBRE *MYCOSPHAERELLA*
FIJIENSIS, BAJO CONDICIONES DE CAMPO Y LABORATORIO.

Universidad Técnica de Machala.
http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10530/1/DE00004_TRABAJO_DETITULACION.pdf

Restrepo R, W y Martínez S, J. 2021. Evaluación del efecto antifúngico del extracto de moringa (*Moringa Oleifera* Lam.) para el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella Fijiensis* Morelet) en el cultivo de plátano, Municipio de Turbo- Antioquia.
<https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/42716/werestrepopor.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rodríguez, M.G, Sánchez, L., Arocha, Y., Peteira, B., Solórzano E., Rowe J. Identificación y caracterización de nematodo *Meloidogynemayaguensis* por Cuba. #3 Reunión Anual de la Organización de Nematólogos de los Trópicos Americanos.: 6.

Santana, R. (2014). Evaluación de Métodos de Extracción y Dosis de Aplicación de cola de caballo (*Equisetum arvense*) para el Control Ecológico de roya (*Pucciniasp.*) en el cultivo de cebolla blanca (*Alliumfistulosum*). Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

Silvia C. 2014. Uso de extractos vegetales Acuosos como estrategia alternativa para el control poscosecha de manilana frutícola, agente responsable de la podredumbre morena de los frutales de corozo

Walder, R. (1997). Actividad anti-VIH de extractos de flores de *Calendulaofficinalis*. . *BiomedPharmacother*, 176-180.