

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE HONGOS
FITOPATOGENOS”**

INFORME FINAL DE SEMINARIO DE TESIS

Presentado por:

Gody Iveth Alonzo Pineda
Herlinda Magdalena Letrán Mejía
Julia Noemí Sánchez Mazariegos

Para optar al título de

Química Biológica

Guatemala, junio 2009

INDICE

1.	RESUMEN	4
2.	AMBITO DE LA INVESTIGACION	6
3.	ANTECEDENTES	8
3.1	Especies vegetales con actividad fungicida e insecticida	8
3.1.1	<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy (Buganvilia)	8
3.1.2	<i>Carica papaya</i> L. (Papaya)	9
3.1.3	<i>Equisetum giganteum</i> L. (Cola de caballo)	10
3.1.4	<i>Matricaria recutita</i> L. (Manzanilla)	11
3.1.5	<i>Wigandia urens</i> (Ruiz y Pavón) Kunth. var. <i>caracasana</i> (Kunth) D (Chocón)	Gibson 12
3.1.6	<i>Tagetes tenuifolia</i> L. (Flor de muerto)	13
3.2	Hongos fitopatógenos	14
3.2.1	Principales síntomas y signos de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos	14
3.2.2	Identificación de hongos fitopatógenos	14
3.2.3	Mecanismos de infección de los hongos fitopatógenos	16
3.2.4	Supervivencia de Hongos Fitopatógenos	18
3.2.5	Aislamiento del Hongo	19
3.3	Tizón de la zanahoria (<i>Alternaria dauci</i>)	20
3.4	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>)	20
3.5	Marchitez del tomate (<i>Fusarium oxysporum</i>)	21
3.6	Efectos de los plaguicidas sintéticos	21
4.	JUSTIFICACION	24
5.	OBJETIVOS	25
5.1	General	25
5.2	Específicos	25
6.	HIPOTESIS	26
7.	MATERIALES Y METODOS	27
7.1	Universo de trabajo	27

7.2	Metodología	27
7.2.1	Aislamiento del hongo fitopatógeno	27
7.2.2	Identificación del hongo fitopatógeno (cultivo en lámina)	28
7.2.3	Preparación de extractos etanólicos	28
7.2.4	Concentración usando rotavapor	29
7.2.5	Tamizaje de la actividad antimicótica <i>in vitro</i>	31
7.2.6	Inoculación de hongos filamentosos en placa	32
7.2.7	Lectura e interpretación de los resultados	32
7.2.8	Concentración mínima inhibitoria	32
7.3	Materiales	33
7.4	Equipo	34
7.5	Reactivos	35
7.6	Cristalería	35
7.7	Diseño Estadístico	35
8.	RESULTADOS	37
9.	DISCUSION DE RESULTADOS	41
10.	CONCLUSIONES	43
11.	RECOMENDACIONES	44
12.	REFERENCIAS	45
13	ANEXOS	49

1. RESUMEN

En la actualidad el uso indiscriminado de fungicidas químicos es un peligro potencial tanto para el ser humano como para el medio ambiente, ya que contienen productos tóxicos cuyos efectos no se limitan a controlar únicamente a los organismos fitopatógenos, sino también cualquier organismo sensible a estos efectos. Las enfermedades fúngicas que causan daño a las plantas tales como tizón, marchitez y antracnosis constituyen un problema para la producción agrícola, ocasionando pérdidas económicas. La vegetación tropical constituye un inmenso recurso de diversidad biológica cuyo uso ha sido escasamente estudiado. Guatemala cuenta con una amplia variedad de especies vegetales a las cuales popularmente se les atribuye la actividad antifúngica, por lo que el estudio de estas especies constituye una alternativa para combatir dichas enfermedades.

En el presente estudio se realizaron extracciones etanólicas y se prepararon tinturas de seis plantas: *Bougainvillea glabra* Choisy (buganvillea), *Carica papaya* L. (papaya), *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo), *Matricaria recutita* L. (manzanilla), *Wigandia urens* (Ruiz y Pavón) Kunth var. *caracasana* (Kunth) D Gibson (chocón) y *Tagetes tenuifolia* L. (flor de muerto), a las cuales se les atribuye popularmente actividad antifúngica.

Se realizó el tamizaje antifúngico con seis extractos etanólicos y seis tinturas contra la fase miceliar de los hongos: *Alternaria dauci*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*, que son los agentes causales del tizón, antracnosis y marchitez respectivamente, utilizando el método de dilución de Brancato & Golding modificado por MacRae para hongos filamentosos.

Los resultados del tamizaje de la actividad antifúngica de los extractos y sus tinturas, utilizando un punto de corte de 1 mg/ml, demostraron que el extracto etanólico de *M. recutita* presentó actividad significativa ($p=0.06$) contra la fase miceliar de *A. dauci*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, mientras que la tintura de *B. glabra* presentó actividad inhibitoria significativa ($p=0.06$) contra *A. dauci* y *F. oxysporum*; con respecto al resto de los extractos y tinturas que presentaron actividad significativa ($p=0.06$), solamente inhibieron el crecimiento de *A. dauci*.

Se recomienda el estudio de otras especies vegetales de Guatemala, a las cuales se les atribuye popularmente características fungicidas contra hongos fitopatógenos para contribuir al desarrollo de la agricultura orgánica en el país.

2. AMBITO DE LA INVESTIGACION

Los microorganismos fitopatógenos provocan enfermedades en las plantas cultivadas por el hombre, produciendo disminución del rendimiento de las cosechas y grandes pérdidas económicas (1).

En la actualidad se utilizan principalmente productos químicos (fungicidas sintéticos) que ayudan a combatir estas enfermedades, pero el problema de estos productos es el daño que pueden provocar en el medio ambiente y la salud, tanto para los agricultores como para los consumidores (1).

La presente investigación formó parte de un proyecto macro desarrollado en conjunto por el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El proyecto está delimitado a enfermedades fúngicas que afectan a determinadas plantas, tales como los cultivos de tomate en la cual se produce el llamado “marchitamiento” causado por el hongo *Fusarium oxysporum*, los cultivos de zanahoria que son afectados por el hongo *Alternaria dauci* que produce el denominado tizón y las plantas de aguacate afectadas por el hongo *Colletotrichum gloeosporoides* que es el agente causal de la antracnosis.

Una alternativa para contribuir a controlar este problema son los productos derivados de especies vegetales con actividad inhibitoria como las propuestas en este estudio, a mencionar: *Bougainvillea glabra* Choisy, *Carica papaya* L., *Equisetum giganteum* L., *Matricaria recutita* L., *Wigandia urens* (Ruiz y Pavón) Kunth var. *Caracasana* (Kunth) D Gibson y *Tagetes tenuifolia* L., de las cuales se obtienen aceites esenciales y otros compuestos químicos, que se pueden emplear como fungicidas e insecticidas (1). Estudios previos indican que el extracto acuoso y las tinturas derivadas de especies como las anteriormente mencionadas también poseen dichas propiedades, por lo que pueden ser usadas para estos fines (2).

Por lo expuesto anteriormente y dado que Guatemala es un país con vocación agrícola, que cuenta con una variedad de especies vegetales que podrían tener la actividad referida, se hace necesario comprobar las propiedades fungicidas popularmente atribuidas a dichas especies, ya que no han sido comprobadas de manera científica y podrían aplicarse para una agricultura ecológica (2).

La evaluación científica y la comprobación de la actividad inhibitoria de hongos fitopatógenos utilizando los extractos vegetales seleccionados para este estudio, permitió elaborar productos antifúngicos de origen natural, capaces de actuar de manera eficaz y a bajo costo. Esta alternativa podría ser un sustituto de los fungicidas sintéticos utilizados actualmente en el país, disminuyendo así el daño que se ocasiona al medio ambiente, a las cosechas y a los consumidores, además de ser productos que pueden usarse en forma artesanal o producirse industrialmente.

3. ANTECEDENTES

En los últimos años, la sociedad mundial ha priorizado los aspectos ambientales, conduciendo muchas investigaciones hacia el descubrimiento de nuevas materias bioactivas que puedan ser empleadas en el manejo integrado de plagas, con menos efectos negativos al ambiente por tratarse de productos naturales (3).

La producción de sustancias bioactivas o metabolitos secundarios por las plantas ocurre a través de diferentes vías metabólicas, generando gran número de compuestos, muchos de los cuales sólo son detectados en un determinado grupo de plantas y en concentraciones variables. La cantidad y composición de esta clase de compuestos es muy variable y depende del tipo de tejido, edad de la planta, su hábitat y el tipo de suelo. Muchos de estos compuestos son producidos y almacenados en tejidos jóvenes, particularmente en hojas o tejidos productivos como flores y semillas. Numerosos estudios han constatado que muchos de estos compuestos afectan importantes funciones en los vegetales, ya que pueden actuar en la preservación de la integridad de las plantas, contra el ataque de agentes patógenos, como nematodos, bacterias, hongos e insectos (3).

Una cantidad considerable de plantas ofrecen grandes perspectivas para minimizar el efecto de las enfermedades en la producción agrícola, sin agudizar los problemas de contaminación ambiental que amenazan el balance ecológico; a nivel mundial, se han realizado varios trabajos que demuestran la acción antifúngica de algunos extractos vegetales tanto a nivel foliar como a nivel del suelo (3).

3.1 Especies vegetales con actividad fungicida e insecticida

3.1.1 *Bougainvillea glabra* Choisy (Buganvilia)

3.1.1.1 Descripción botánica

Enredadera grande y leñosa con ramas puerulentas o glabras, espinas cortas de 1 cm de largo y ligeramente arqueadas. Hojas alternas y pecioladas de 4-10 cm de largo, anchamente ovaladas a ovalo-lanceoladas. Flores blanco-cremosas de 14 mm de largo; brácteas ovaladas y coloreadas de 2.5-4.5 cm de largo. Fruto pequeño de 7-13 mm de largo, puerulento o glabro, comúnmente estéril (1).

3.1.1.2 Hábitat y distribución

Nativa de Brasil; y ha sido introducida como planta ornamental en jardines y parques en toda Centro América (1). En Guatemala es cultivada como ornamental en todos los lugares excepto en partes muy frías como Quetzaltenango pero puede prosperar al menos en lugares protegidos (1).

3.1.1.3 Usos etnobotánicos y agronómicos

Esta planta se utiliza para afecciones respiratorias como tos. Las brácteas son la parte de la planta mas utilizada y su administración se hace por vía oral. Se recomienda también la flor hervida, administrada por vía oral, para el asma, bronquitis y disentería (2).

3.1.1.4 Farmacología experimental

Estudios antibacterianos demuestran que los extractos acuosa y etanólico de hojas y flores son inactivos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (4). Los extractos etéreos de plantas del género tienen actividad insecticida contra *Sitophilus oryzae* y virus fitopatógenos (rosetas y mosaico del tomate y del tabaco) (5).

3.1.1.5 Química

Las hojas y flores contienen: Flavonoides, glicósidos saponínicos, triterpenos y taninos (6).

3.1.2 *Carica papaya* L. (Papaya)

3.1.2.1 Descripción botánica

Árbol de porte mediano, tronco recto y simple. Hojas palmatilobuladas, grandes, sostenidas por largos pecíolos, glabras, verdes oscuras. Flores dioicas dispuestas en panojas largas y péndulas. Fruto esférico, cilíndrico o periforme de 10-15 cm de largo, anaranjado cuando maduro. Pulpa anaranjada o amarilla (6).

3.1.2.2 Hábitat y distribución

Nativa de laderas bajas de los Andes Orientales, la cuenca amazónica y Centro América en clima tropical húmedo en alturas hasta 1500 msnm (7). Aunque es capaz de crecer en casi todos los suelos siempre que estén bien ordenados, prefiere franco-arenosos, profundos, bien estructurados con altos niveles de materia orgánica y buen drenaje. En Guatemala se cultiva principalmente en las costas atlántica y pacífica (8).

3.1.2.3 Usos etnobotánicos y agronómicos

EL jugo o jarabe del fruto se usa por vía oral contra afecciones digestivas y respiratorias. Se le atribuye propiedad amebicida, antibiótica, fungicida e insecticida (1). Otros usos populares que se le adjudican a esta planta son: Antiparasitaria, antihelmíntica y antipaludismo (6).

3.1.2.4 Farmacología experimental

Estudios antibacterianos demuestran que el extracto de semillas, fruto tierno y maduro son activos contra bacterias gram negativo (7). Un estudio realizado demostró que el extracto etanólico de las hojas tiene efecto antinematodo, antifúngico y antibacteriano. Los extractos etanólicos de hojas son activos contra *E. coli* y *S. aureus* (9). Los extractos acuosos y etanólicos de la raíz y flor presentaron actividad fungicida contra *Dreschlera oryzae* (10).

3.1.2.5 Química

Las hojas contienen alcaloides, taninos (0.5-0.6 %) y glicósidos, no contiene saponinas, la corteza y raíz contienen alcaloides y taninos. Las semillas contienen glucósidos (caricina, carpasemina, sinigrina), una enzima (mirosina), tropaolina y 25 % de un aceite con un bajo valor de yodo. La corteza contiene una pentaalcohol (xilitol) y saponósidos (11).

3.1.3 *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo)

3.1.3.1 Descripción botánica

Planta robusta, perenne, rizomatosa, áspera. Tallo erecto hasta de 3 m de alto, verde, articulado, hueco (experto en los nudos), estriado longitudinalmente, con ramas verticiladas. Las hojas son escamiformes, parcialmente soldadas entre sí formando una vaina alrededor del nudo. Las estructuras reproductoras, esporangios se disponen agrupados en espigas en forma de estróbilos elipsoidales en el extremo de los tallos. La planta carece de olor, y su sabor es astringente y ligeramente amargo o salino (12).

3.1.3.2 Hábitat y Distribución

Algunas de las especies son nativas de Asia y Europa, aunque se han convertido en cosmopolitas y otras son nativas de América desde México hasta Argentina, crecen en lugares húmedos, arenosos y pantanosos, taludes, bordes de caminos pedregales, hasta 2000 msnm. De origen incierto, posiblemente de América del Sur o de Centro América; aunque

otras especies del mismo género son nativas de Europa. Se distribuye desde México hasta Argentina, también se presenta en algunas islas del caribe. En Guatemala se localizan en regiones tropicales y húmedas del país, especialmente en el altiplano central y occidental (11).

3.1.3.3 Usos etnobotánicos y agronómicos

La decocción del tallo y hojas frescas o secas, o el polvo macerado en vino se usan por vía oral para tratar afecciones respiratorias y genitourinarias, arteroesclerosis, diabetes, reumatismo, taquicardia, vértigo, hipertensión, tumores y cáncer (11). En la agricultura orgánica, es muy utilizado como fungicida, especialmente en el control del tizón de la papa y del tomate, cenicilla del guicoy, del pepino y arveja china (2).

3.1.3.4 Farmacología experimental

El extracto tiene actividad moluscosida y antiviral. El polvo de las partes aéreas de *Equisetum arvense* tiene actividad insecticida contra *Equisetum fluviatile* y contra *Aedes aegypti* (5). El extracto acuoso de la planta completa inhibió los cultivos de *S. aureus* (6).

3.1.3.5 Química

Según un análisis realizado se informó la presencia de ácido silícico, azúcares, esteroides, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, taninos, glicósidos, saponinas y ácido aconítico (2).

3.1.4 *Matricaria recutita* L. (Manzanilla)

3.1.4.1 Descripción botánica

Planta herbácea las flores tienen el centro amarillo, formado por varios florones blancos, de olor fragante. El cáliz es hemisférico, compuesto de escamas imbricadas. Flores radiadas. Semillas oblongas, raíz fibrosa. Tallos derechos, lisos, hojas alternas, pecioladas (6).

3.1.4.2 Hábitat y Distribución

Nativa de Europa mediterránea, naturalizada en todo el mundo en clima templado de 600-2400 msnm. En Guatemala se cultivan en varias zonas del país, preferentemente en las zonas templadas pero soleadas hasta 3900 msnm, naturalizada en campos de cultivo de 1,300-2,500 msnm en Alta Verapaz, Chimaltenango, Jalapa, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Solóla y Zacapa (13).

3.1.4.3 Usos etnobotánicos y agronómicos

Las hojas y flores se utilizan para tratar afecciones gastrointestinales, amigdalitis, cefalea, convulsiones, difteria, dismenorrea, gota, histeria, insomnio, lumbago, nerviosismo y reumatismo (1). La planta sembrada puede repeler hasta 90 cm a los nematodos; el macerado acuoso funciona como fungicida y repelente de los insectos (10).

3.1.4.4 Farmacología experimental

El extracto de flores tiene actividad contra organismos fitopatógenos tales como: *Blatta orientali*, *Spodoptera litura*, *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes redikiozevi*, *Rhipicephalus rossicus* y contra nemátodos *Meloidogyne incognita* (5).

3.1.4.5 Química

Las hojas y flores contienen aceite esencial (0.2–0.6%) compuesto por azuleno (26-46%), camazuleno (1-15%), guajazuleno, bisabol, bisabololol, cadineno, colina, cumarinas (herniarina, umbeliferota), farneseno y furfural. Además glucósidos y flavonoides (14).

3.1.5 *Wigandia urens* (Ruiz y Pavón) Kunth var. *caracasana* (Kunth) D Gibson.

(Chocón)

3.1.5.1 Descripción botánica

Arbusto de 2-5 cm de alto, tallo herbáceo con pelusilla blanca. Hojas alternas, tallo acanalado, 5-60 cm de largo; indentado en la base, agujas en el pecíolo, flores sésiles moradas, acampanadas de 1-3 cm de ancho, 5 estambres, cáliz persistente, hispido, estigma en clava, ovarios ovoides sedosos, numerosas panículas terminales de 50.60 cm, cápsula oblongo-cónica de 8 mm de largo, bivalva. Numerosas semillas pequeñas rugosas color café (15).

3.1.5.2 Hábitat y Distribución

Nativo de México a Perú, en Guatemala se encuentra en Alta Verapaz, Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Quiché, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa (15).

3.1.5.3 Usos etnobotánicos

La infusión de hojas y flores se usa para diarrea, inapetencia, indigestión retención urinaria, reumatismo, nerviosismo y tos ferina (16,17,18).

3.1.5.4 Farmacología experimental

El tamizaje antibacteriano demostró que la tintura de la hojas tiene actividad contra *Salmonella typhi*. Se confirma la actividad contra *S. typhi*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. Los mejores solventes son el etanol y acetona. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en disco es de 1.25 mg para *S. pyogenes* y 5 mg para *S. typhi*. (19,20,21).

3.1.6 *Tagetes tenuifolia* L. (Flor de muerto)

3.1.6.1 Descripción botánica

Herbácea anual de 50 a 100 cm. de altura, muy ramificada. Las hojas presentan nervaduras con los bordes dentados y sus flores circulares son de color amarillo (14). Hierba anual muy común, de 1 m de altura, mas o menos, densamente ramificado. Hojas pinnadas lanceoladas. Flores solitarias axilares, color amarillo (6).

3.1.6.2 Origen y distribución

Tiene su origen en México y habita en climas cálido, semiárido, seco y templado. Crece en huertos y en terrenos de cultivo; está asociada a distintos tipos de selva tropical caducifolia, subcaducifolia, bosque espinoso, mesófilo de montaña, de encino y pino (22).

3.1.6.3 Usos etnobotánicos y agronómicos

Extendido empleo medicinal, donde se recomienda para dolor de estómago, parásitos intestinales, “empacho”, diarrea, cólicos, afecciones hepáticas, bilis, vómito, indigestión, dolor de muelas, lavados intestinales y para expulsar gases. El tratamiento consiste en el cocimiento de las ramas, con o sin flores, en sahumero o fritas para aplicar de manera oral o en la parte afectada. Además se dice que sirve para enfermedades de tipo respiratorio como tos, fiebre, gripe y bronquitis (22).

3.1.6.4 Farmacología experimental

Diversos estudios han demostrado que los extractos acuosos de la flor y hoja de *Tagetes erecta* L. tienen actividad antibacteriana, antinematoda y antifúngica (23).

3.1.6.5 Química

La planta completa contiene: Flavonoides, taninos, triterpenos, aceites esenciales (6). Los carotenoides obtenidos de estas flores también se utilizan en la medicina, pues de

ellos se obtiene la luteína, sustancia que actúa como un nutriente antioxidante que protege las células de nuestro cuerpo, en especial aquellas que conforman el tejido de la retina (23).

3.2 Hongos fitopatógenos

Los hongos son pequeños organismos, generalmente microscópicos, que carecen de clorofila y de tejidos conductores. 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. Algunos hongos crecen y se reproducen solo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que le sirven de hospedero durante todo su ciclo de vida, otros requieren de una planta hospedera durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en medios artificiales, y más aún, otros se desarrollan y reproducen tanto en plantas vivas como en materia orgánica muerta (24).

3.2.1 Principales síntomas y signos de enfermedades causadas por hongos

Las enfermedades causadas por hongos producen en sus hospederos una amplia variedad de tipos diferentes de síntomas. Los hongos fitopatógenos pueden producir manchas cloróticas y necróticas, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momias, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas (24).

3.2.2 Identificación de hongos fitopatógenos

Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesario la observación de sus estructuras somáticas y reproductivas. Mediante la técnica de cámara húmeda y/o aislamiento es posible inducir la aparición de estas estructuras. La observación de las características de las estructuras producidas y el uso de claves taxonómicas son necesarias para determinar el género y la especie del hongo patógeno (25).

3.2.2.1 Estructuras vegetativas

3.2.2.1.1 Plasmodio

Se refiere al cuerpo o soma vegetativo de algunos hongos inferiores, el cual está constituido por una masa multinucleada, sin pared celular (25).

3.2.2.1.2 Micelio

La mayoría de los hongos poseen cuerpo filamentosos provisto de pared celular. A los filamentos que constituyen el cuerpo o soma vegetativo se les denomina hifas. Y al

conjunto de todas las hifas se les denomina micelio. Cuando las hifas no presentan septas el micelio es denominado cenocítico o no tabicado y cuando si las tiene se dice que es tabicado (25).

3.2.2.1.3 Esclerotos

Son estructuras de resistencia formados por compactación de hifas. Estos esclerotos pueden tener diferentes formas y tamaños (25).

3.2.2.2 Estructuras Reproductivas

3.2.2.2.1 Clase Oomycetes

Esta clase de hongos sexualmente producen oosporas, las que se originan por la unión de dos gametos diferentes, el oogonio y el anteridio. Estas oosporas son esféricas y de pared gruesa. Estos hongos se reproducen asexualmente producen esporas flageladas, denominadas zoosporas. Estas zoosporas se encuentran contenidas en cuerpos fructíferos denominados zoosporangios (26).

3.2.2.2.2 Clase Zygomycete

Esta clase de hongos Produce esporas asexuales no móviles contenidas en cuerpos fructíferos denominados esporangios. Sexualmente producen esporas denominadas zigosporas (26).

3.2.2.3 Hongos superiores

3.2.2.3.1 Clase Ascomycetes

La clase ascomycetes se caracteriza por poseer micelio tabicado y producir esporas de origen sexual denominadas Ascosporas. Estas ascosporas se producen dentro de sacos llamados ascas. Las ascas pueden encontrarse en forma libre o contenidas en cuerpos fructíferos. Los cuerpos fructíferos pueden ser de dos tipos: Apotecios y Cleistotecios (26).

3.2.2.3.2 Clase Basidiomycetes

La clase basidiomycetes se caracteriza por tener micelio tabicado y reproducirse sexualmente mediante la producción de basidioporas. Estas son producidas exógenamente sobre una estructura llamada basidio. Los basidios pueden ser septados o no (26).

3.2.3 Mecanismos de infección de los hongos fitopatógenos

Centrándonos en los hongos fitopatógenos, el desarrollo de la enfermedad es el resultado de su interacción con las plantas, según una secuencia de etapas denominadas

patogénesis. Algunas de estas etapas, cruciales para el establecimiento de tal patogénesis, son:

3.2.3.1 Unión a la superficie de la planta.

3.2.3.2 Germinación sobre dicha superficie y formación de estructuras de infección.

3.2.3.3 Penetración en el huésped.

3.2.3.4 Colonización de los tejidos del huésped.

Muchos hongos patógenos muestran una especificidad hacia el órgano al cual se unen, de forma que normalmente no atacan a todas las partes de la planta hospedadora; algunos colonizan partes aéreas mientras que otros infectan zonas situadas por debajo del suelo. Los hongos patógenos emplean diferentes mecanismos para unirse a la superficie de la planta hospedadora. En cualquier caso, la penetración del hongo en la planta precisa del contacto y la adherencia de las esporas y/o de la primera hifa que resulta de su germinación (tubo germinativo) a la superficie vegetal. Los mecanismos por los cuales este proceso se consigue han sido poco estudiados. Un posible mecanismo consiste en la excreción por parte del hongo de enzimas tales como cutinasas y esterases que alteran la superficie vegetal facilitando la adherencia (26).

En la mayoría de los hongos, la germinación de las esporas se produce de forma directa, emitiendo uno o varios tubos germinativos. No obstante los hongos zoospóricos germinan de forma indirecta mediante la formación y liberación de zoosporas, o tras la germinación directa de oosporas y zigosporas. El proceso de germinación de las esporas fúngicas se inicia, al igual que en las semillas de las plantas, con la hidratación y aumento de volumen de la espora, la hidrólisis de las reservas energéticas endógenas y la síntesis de proteínas y materiales estructurales de membrana y pared necesarios para la formación y elongación de los tubos germinativos (24).

La germinación de las esporas se ve afectada por una serie de factores endógenos y exógenos. En muchas ocasiones las esporas se encuentran en un estado de dormancia o de reposo metabólico, en el que la germinación se ve impedida por varios factores físicos o bioquímicos propios de la espora. La germinación de las esporas que no se encuentran sujetas a dormición se ve influida por el agua, la temperatura, la luz, la actividad microbiana y los inhibidores y estimulantes de origen diverso. Las esporas se desplazan hacia la zona de penetración, siendo en muchos casos estos movimientos orientados

quimiotácticamente; tal desplazamiento finaliza con el enquistamiento de la espora y su adherencia a la superficie vegetal (24).

Un proceso similar sucede en la elongación del tubo germinativo de muchos hongos fitopatógenos, que manifiesta una orientación en respuesta a estímulos químicos (quimiotropismo) o de contacto superficial (tigmotropismo). El crecimiento orientado del tubo germinativo requiere su adherencia a la superficie del vegetal, lo cual tiene lugar mediante la producción de una matriz extracelular de polisacáridos o glicoproteínas (24).

El siguiente paso en el establecimiento de la infección supone la penetración de los hongos patógenos en sus hospedadores. La penetración puede tener lugar de forma mecánica, por digestión enzimática o a través de aberturas naturales. Dentro de la primera se pueden distinguir a su vez diferentes tipos. Existen algunas especies de hongos que penetran en la planta hospedadora a través de heridas causadas por procesos naturales (caída de hojas, formación de raíces secundarias, etc.) prácticas agrícolas (poda, recolección, etc.) o ataques por insectos (24).

Otros hongos fitopatógenos penetran directamente a través de la superficie intacta de la planta por medio de los tubos germinativos, por medio de apresorios o agregados hifales más complejos que reciben el nombre de cojines de infección. La penetración también puede producirse por digestión enzimática de la cutícula y la pared celular. La producción de cutinasas por parte de determinados hongos juega un papel determinante en la invasión de las plantas, lo que ha quedado demostrado mediante la inhibición de esta enzima con anticuerpos o inhibidores químicos, que ocasionan una reducción de la virulencia del hongo. Por último, algunos hongos penetran en las plantas a través de aberturas naturales como las lenticelas en tallos y frutos y los hidatodos y estomas en las hojas, siendo esta última la ruta más común (26).

La penetración de la cutícula es seguida por un crecimiento subcuticular o intramural, que puede en ocasiones verse interrumpido dando lugar a infecciones latentes. Para el crecimiento activo del hongo tras la invasión del tejido es necesario que se establezca una relación parasitaria continuada con el huésped (infección). A partir de la hifa que penetra en la planta se desarrollan las hifas primarias y varias hifas secundarias filamentosas, que son las encargadas de colonizar el tejido del vegetal por crecimiento intercelular y/o intracelular. La colonización del tejido huésped por crecimiento intercelular

de las hifas ramificadas es propio de los hongos biotrofos (mildius, royas, etc.), mientras que el crecimiento intracelular, que a menudo ocasiona la muerte de las células del huésped mediante la secreción de enzimas pectolíticas y de toxinas, es característico de los hongos necrotrofos que producen manchas (2).

Generalmente se acepta que la producción de enfermedades en plantas por hongos fitopatógenos se debe a la acción individual o combinada de cuatro mecanismos de patogénesis (26).

El primero de ellos es la síntesis y liberación de enzimas degradativas de la pared celular, tales como poligalacturonasas, pectato-liasas, hemicelulasas y celulasas, que en ocasiones son liberadas de forma secuencial. Estas enzimas ocasionan la degradación de sustancias pécticas que unen las paredes celulares en los tejidos parenquimáticos y causan ensanchamiento y degradación de la pared celular y muerte de las células (26).

Un segundo mecanismo consiste en la producción de toxinas por parte del hongo, productos no enzimáticos de bajo peso molecular que interfieren en el metabolismo de la planta o que afectan a la estructura normal del protoplasma. Las toxinas pueden pertenecer a dos categorías diferentes: toxinas huésped-específicas, que son aquéllas que muestran la misma especificidad que el patógeno que las produce, y toxinas huésped-no específicas, cuando la gama de plantas sobre las cuales pueden ocasionar fitotoxicidad no está relacionada con las plantas susceptibles al patógeno, causando síntomas inespecíficos (26).

El tercer mecanismo de patogénesis consiste en la producción y liberación de compuestos hormonales, antihormonales y de otro tipo que producen una interferencia en el control normal del crecimiento y desarrollo. Así, se ha observado que en muchos de los síntomas que resultan de la patogénesis provocada por hongos (enanismo, elongación, proliferación celular, etc.) son parecidos a los que se asocian con desarreglos hormonales (26).

3.2.4 Supervivencia de hongos fitopatógenos

Depende ampliamente de las condiciones dominantes de temperatura y humedad en su medio ambiente. Un micelio solo sobrevive dentro de cierto rango de temperatura (-5-30°C) y cuando entra en contacto con superficies húmedas, ya sea que se localicen por fuera de una planta hospedera o en el interior de ésta. Sin embargo, la mayoría de las esporas resisten rangos bastante amplios de temperaturas y humedad, por lo que permite

que el hongo sobreviva a los días cálidos del verano y a las bajas temperaturas de invierno. Sin embargo, las esporas de los hongos requieren también de humedad y temperaturas adecuadas para poder germinar (26).

Además, los hongos inferiores que producen zoosporas requieren de agua libre para la producción, movimiento y germinación de esas estructuras reproductoras. La mayoría de los hongos fitopatógenos necesitan de agentes como el viento, aguas, aves, insectos, otros animales y del hombre para poder diseminarse de una planta a otra e incluso en las distintas partes de una misma planta. Los hongos se diseminan principalmente en forma de esporas. Los fragmentos y las masas de micelio endurecidas, conocidas como esclerocios, también son diseminados por esos mismos agentes, aunque en menor grado (26).

En la mayoría de hongos, la diseminación de las esporas se efectúa en forma pasiva, aunque su liberación inicial en algunos hongos es enérgica. La distancia a la que las esporas son diseminadas varía con respecto al agente de diseminación. Es muy probable que el viento sea el agente más importante en la diseminación de las esporas en la mayoría de los hongos, ya que las transporta a grandes distancias (26).

3.2.5 Aislamiento del hongo

3.2.5.1 De hojas

Se logra mediante la esterilización superficial de la zona infectada con soluciones de cloro o de Rada, separando una pequeña porción del tejido infectado con un escápelo estéril u otro objeto, colocándolo en una caja de petri que contenga un medio nutritivo (25).

Para esto se deben realizar varios cortes de aproximadamente 5-10 mm³ de la hoja infectada, dichos cortes deben contener tejido infectado y tejido al parecer sano. Estos cortes se colocan en una de las soluciones esterilizantes de superficie, lo cual asegura que esas superficies se humedezcan y al cabo de 30-60 seg. los cortes se toman asépticamente uno por uno a intervalos regulares de tiempo (30 ó 60 seg.), a fin de que cada uno de ellos se esterilice a diferentes tiempos. Posteriormente, los cortes se secan con trozos de papel estéril o se pasan por tres cambios de agua estéril, y por último se colocan sobre el medio nutritivo (por lo común, de 3 a 5 por caja de petri) (25).

Los cortes esterilizados en su superficie durante menos tiempo generalmente contienen al patógeno y a varios contaminantes, mientras que los que se han esterilizado durante más tiempo no permiten el desarrollo de cualquier tipo de microorganismos debido

a que han sido destruidos por el esterilizante de superficie. Sin embargo, algunos de los cortes depositados en el esterilizante durante períodos intermedios permitirán que sólo el patógeno se desarrolle y forme colonias puras en el cultivo, ya que se ha permitido que el esterilizante actúe el tiempo suficiente para destruir a todos los contaminantes de superficie, pero no el tiempo necesario para destruir al patógeno, el cual se ha propagado desde el tejido enfermo hasta el tejido sano. Posteriormente, las colonias del patógeno, se resiembran asépticamente para su posterior estudio (25).

3.3 Tizón de la zanahoria (*Alternaria dauci*)

Esta enfermedad aparece durante el verano y el otoño, en ambientes húmedos y cálidos, se presenta primero en forma de pequeñas manchas parduscas, aureoladas de amarillo y diseminadas por el borde de las hojas. Al aumentar el número de las manchas mueren los tejidos intermedios, con lo que se deseca el foliolo completo. La planta aparece como quemada por el sol o por un tratamiento mal efectuado (24).

Los conidios de *Alternaria dauci* tienen septos transversales y longitudinales y se los conoce como dictiosporas, además son pardos y picudos. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar en este último caso a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote (24).

3.4 Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporoides*)

Es una enfermedad común en regiones húmedas y cálidas. Los síntomas varían de hospedero en hospedero, comenzando con pequeñas manchas acuosas que se convierten en lesiones necróticas de forma circular a irregular, de color crema oscuro a negro con bordes amarillos. Estas manchas se van juntando según avanza la enfermedad. Esta enfermedad puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo de la planta y es más común en las partes jóvenes y suculentas de los tallos y los pecíolos. El hongo que causa la antracnosis subsiste de una temporada a otra en residuos de plantas infectadas y en la semilla.

El hongo *Colletotrichum gloeosporoides* produce conidios incoloros, de una sola célula ovoides, cilíndricos y en ocasiones encorvados. Las masas de conidios son de color rosado. Los acervos son subepidérmicos y brotan a través de la superficie de los tejidos de la planta tienen forma de disco y cojín y son cerosos con conidioforos simples, cortos y erectos. El hongo es favorecido por las temperaturas y el tiempo húmedo. Sus conidios son liberados y se diseminan solo cuando los acérvulos se encuentran húmedos y son generalmente

diseminados por la lluvia, transportados por el viento o al entrar en contacto con los insectos otros animales herramientas, etc. (24).

3.5 Marchitez del tomate (*Fusarium oxysporum*)

El marchitamiento causado por *Fusarium* es una de las enfermedades más prevalentes y dañinas del tomate siempre que estas plantas se cultiven intensivamente. Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan en un ligero aclaramiento de las nervaduras de los folíolos jóvenes más externos, después de lo cual ocurre la epinastía de las hojas senescentes ocasionada por el debilitamiento de los pecíolos. Cuando las plantas son infectadas en la etapa de plántula, es frecuente que se marchiten y mueran poco después de haber aparecido los primeros síntomas. Las plantas adultas en el campo pueden marchitarse y morir repentinamente en caso de que la infección sea severa y el clima sea favorable para el patógeno (24).

El micelio de *F. oxysporum* es incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones adquiere una tonalidad rosa pálido o algo púrpura. Este patógeno produce tres tipos de esporas asexuales. Microconidios, que tienen de una a dos células, son las esporas que el hongo forma con más frecuencia en el interior de los vasos de las plantas hospedantes. Macroconidios, que son las esporas típicas de *Fusarium* y el último tipo de espora son las clamidosporas, que están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y son esporas redondas que se forman Terminal o intercaladamente en el micelio más viejo o en los macroconidios del hongo. El patógeno es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectados que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas (24).

3.6 Efectos de los plaguicidas sintéticos

Un plaguicida puede conceptuarse como “contaminante” cuando se aplica una concentración de su formulación, incluyendo aquellos productos provenientes de la síntesis de estos, así como los coadyuvantes y los llamados “ingredientes inertes”, o sus productos de degradación que puedan producir más daños que beneficios (27).

En la mayoría de los casos, la reacción que ocurre al aplicar un plaguicida para controlar una población de organismos considerada como plaga, no se realiza de acuerdo al esquema mental de intenciones, el cual indica que un plaguicida debe actuar únicamente sobre la plaga y no sobre la plaga más el ambiente (27).

Por lo general, se trata de sustancias con poder tóxico, cuyos efectos no se limitan a controlar los organismos que han alcanzado en un momento dado el estatus de plaga, sino también cualquier organismo sensible a estos efectos que se encuentran en el ambiente y llegan a tener contacto directo o indirectamente con los ingredientes contenidos en la formulación empleada o alguno de sus productos de degradación (26).

Los plaguicidas tienen la capacidad de producir cuatro tipos de intoxicaciones en los organismos: sobreagudas (de minutos u horas de evolución), agudas (de días), subagudas (de semanas) y crónicas (de meses o años) (28).

El uso de plaguicidas de reconocida peligrosidad, así como el mal uso de estos productos en general, viene dejando secuelas negativas, muchas veces de carácter irreversible, tanto en el ser humano mismo como en el ambiente. Entre estas pueden citarse:

- 3.6.1 Problemas de contaminación en diversos sustratos (suelo, agua, aire).
- 3.6.2 Intoxicaciones en humanos a corto, mediano y largo plazo.
- 3.6.3 La destrucción de hábitats silvestres, así como efectos tóxicos sobre animales domésticos.
- 3.6.4 Cambios en la velocidad de descomposición de la materia orgánica en el suelo, del crecimiento microbiano, de la biomasa del suelo y en la biodiversidad del mismo, así como en los ciclos de nutrimentos en el suelo como el del nitrógeno y el proceso de nodulación.
- 3.6.5 Alteraciones en las proporciones entre elementos en el suelo que puedan afectar la disponibilidad de estos para las plantas.
- 3.6.6 Destrucción catalítica de la capa de ozono (28).

Una investigación realizada por la Academia Nacional de Ciencias de los EE.UU. reveló que únicamente existen datos toxicológicos suficientes para 10% de los ingredientes activos comercializados como plaguicidas; para 52% la información es incompleta y para los 38% restantes no hay información toxicológica disponible (28).

A manera de ejemplo puede citarse el caso interesante de la adición de piridina en una de las formulaciones comerciales de paraquat. El Centro Nacional de Control de

Intoxicaciones venía registrando problemas de intoxicaciones laborales con este herbicida con síntomas atípicos que comprometían el sistema nervioso central y otros órganos (dolores de cabeza, insomnio, nerviosismo, debilidad muscular, náuseas, vómitos y fatiga). Posteriormente se hizo la relación de este problema con las concentraciones de piridina utilizadas en el paraquat como agente nauseoso. En este caso específico, el formulador informó que utilizaba 500 ppm de piridina en la formulación comercial de este producto. Ahora bien, conociendo que el límite máximo de exposición ocupacional establecido por la ACGIH para piridina es de 5 ppm (100 veces menor) es muy probable que los efectos tóxicos determinados fueron causados por esas altas concentraciones (28).

4. JUSTIFICACION

Los microorganismos fitopatógenos provocan enfermedades en las plantas cultivadas por el hombre. Las afecciones como el “marchitamiento” producido por el hongo *F. oxysporum*, el tizón causado por *A. dauci* y la antracnosis provocada por *C. gloeosporioides* son enfermedades que causan hasta un 50% de pérdidas económicas en la horticultura.

Actualmente las enfermedades fúngicas son combatidas con productos químicos (fungicidas sintéticos) que tienen costos elevados, que pueden provocar daño a nivel ambiental y de salud tanto para los agricultores como para los consumidores.

Diversos estudios realizados en varias partes del mundo demostraron que los aceites esenciales, las tinturas y extractos de algunas especies vegetales tienen actividad antifúngica e insecticida, por lo que pueden aplicarse al control de hongos fitopatógenos.

En una encuesta Nacional expertos en producción orgánica indicaron que las plantas: Baganvillia, chocón, cola de caballo, manzanilla, flor de muerto y papaya, tienen actividad antifúngica, que ha sido usada únicamente de manera empírica y artesanal.

Es necesario comprobar de manera científica la actividad fungicida atribuida a estas especies vegetales, para su óptimo aprovechamiento en la agricultura orgánica.

La evaluación y comprobación científica de la inhibición de, *A. dauci*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* contribuyó a los estudios para la elaboración de productos antifúngicos de origen natural, de menor impacto en el medio ambiente y la salud de consumidores y agricultores, que pueden ser preparados a costos relativamente bajos.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Demostrar la actividad inhibitoria de los extractos etanólicos de *Bougainvillea glabra*, *Carica papaya*, *Equisetum giganteum*, *Matricaria recutita*, *Tagetes tenuifolia*., *Wigandia urens* var. *caracasana*, sobre hongos fitopatógenos.

5.2 Específicos:

5.2.1 Aislar hongos fitopatógenos *A. dauci* *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* a partir de plantas infectadas según la metodología Agrios.

5.2.2 Identificar y caracterizar adecuadamente los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *A. dauci* y *C. gloeosporioides*.

5.2.3. Demostrar por medio de un procedimiento estandarizado la actividad inhibitoria de los extractos vegetales propuestos en este estudio sobre los hongos fitopatógenos *A. dauci*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*.

5.2.5 Realizar el tamizaje de la actividad biocida de los extractos etanólicos elaborados.

5.2.6 Determinar la Concentración inhibitoria minima (CIM) de los extractos activos.

6. HIPOTESIS

Los hongos fitopatógenos *Alternaria dauci*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* son inhibidos por lo menos por uno de los extractos etanólicos o tinturas de: *Bougainvillea glabra*, *Carica papaya*, *Equisetum giganteum*, *Matricaria recutita*, *Tagetes tenuifolia* y *Wigandia urens*.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

Plantas usadas para combatir enfermedades fitopatógenas

7.1.1 Muestra: Extractos etanólicos de las siguientes especies vegetales

7.1.1.1 *Bougainvillea glabra*

7.1.1.2 *Wigandia urens* var. *caracasana*

7.1.1.3 *Equisetum giganteum*

7.1.1.4 *Tagetes erecta*.

7.1.1.5 *Matricaria recutita*

7.1.1.6 *Carica papaya*

7.2 Metodología

7.2.1 Aislamiento del hongo fitopatógeno

Las cepas de los hongos en estudio fueron aisladas de las plantas infectadas a razón tomate, zanahoria y aguacate, el aislamiento se realizó en cajas de agar Sabouraud y PDA bajo condiciones adecuadas, por medio de la técnica establecida (Anexo 1). Se realizaron los aislamientos necesarios hasta obtener cepas puras, libres de contaminantes. Para identificar a los hongos se realizaron cultivos en lámina, para analizar y verificar las estructuras de reproducción con las cuales se pueden identificar.

Para realizar el aislamiento se procedió con los siguientes pasos:

7.2.1.1 Recolectar la planta infectada

7.2.1.2 Hacer cortes del borde de la lesión y colocarlos en una solución de cloro al 10% durante diferentes tiempos.

7.2.1.3 Utilizar pinzas estériles para trasladar los cortes

7.2.1.4 Poner los cortes de tejidos secar en papel filtro estéril para eliminar el exceso de cloro.

7.2.1.5 Colocar los cortes en caja de petri que contiene medio de cultivo.

7.2.1.6 Colocar los corte en medios de cultivo adecuados (Sabouraud o PDA).

7.2.1.7 Observar el crecimiento del patógeno en la parte central del corte.

7.2.1.8 Obtener un cultivo puro del patógeno mediante el resembrado de una porción de él en otra casa que contenga medio de cultivo (24).

7.2.2 Identificación del hongo fitopatógeno (Cultivo en lámina)

Para la adecuada identificación de hongos microscópicos es necesario observar la relación de las estructuras y el micelio. Esto se consigue mediante la observación microscópica de dichas estructuras por medio de preparaciones en fresco y teñidas con azul de lactofenol, sin embargo con el uso de preparaciones directas de cultivos se lastiman dichas estructuras, por lo que se hace difícil su identificación.

La técnica de cultivo en lámina dió como resultado preparaciones con el mínimo de manipulación y el máximo de conservación de las estructuras fúngicas de *A. dauci*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* (28,29).

Para realizar la identificación del hongo se procedió con los siguientes pasos:

7.2.2.1 Cortar cuadros de 1 cm cuadrado de agar Sabouraud.

7.2.2.2 Desempacar el material estéril y colocar el cuadro de agar sobre el portaobjetos, usando técnicas asépticas.

7.2.2.3 Inocular el hongo en cada lado de los cuadros de agar sabouraud.

7.2.2.4 Cubrir el agar inoculado con el cubreobjetos estéril.

7.2.2.5 Añadir 8 ml de agua destilada estéril a la caja que contiene el inóculo.

7.2.2.6 Incubar a 25°C de 3-4 días.

7.2.2.7 Levantar cuidadosamente el cubreobjetos con una pinza y colocarlo sobre una superficie blanca, teniendo el cuidado de colocar la cara que contiene el cultivo hacia arriba.

7.2.2.8 Descartar el cuadro de agar con el asa y colocar el portaobjetos sobre una superficie blanca con el cultivo hacia arriba.

7.2.2.9 Colocar una gota de azul de lactofenol sobre un portaobjetos limpio y colocar encima el cubreobjetos.

7.2.2.10 Remover el exceso de colorante y sellar la preparación con esmalte de uñas transparente (28,29).

7.2.3 Preparación de extractos etanólicos y acuosos por percolación.

La percolaciónn consiste en hacer pasar el disolvente a través de la droga vegetal hasta su extracción completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva de la droga con el disolvente siempre renovado. En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de

un grifo en la parte inferior, para regular el flujo de disolvente. La capa de droga debe ser 5 veces el diámetro medio del equipo según la Farmacopea Alemana (30-34).

A continuación se presentan los pasos para preparar los extractos:

7.2.3.1 En un percolador previamente limpio y seco, colocar un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.

7.2.3.2 Pesar la cantidad de materia vegetal a utilizar de acuerdo al tamaño del percolador.

7.2.3.3 Humedecer el material vegetal con el disolvente a usarse para la extracción utilizando un vaso de precipitar.

7.2.3.4 Transferir el material al percolador y agregar disolvente hasta cubrir el material vegetal.

7.2.3.5 Dejar reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, esto dependerá del material vegetal (18-24 horas).

7.2.3.6 Abrir la llave de la parte inferior y dejar gotear el líquido a una velocidad adecuada.

7.2.3.7 Recoger el líquido en un erlemeyer, añadir suficiente disolvente extra, según se requiera, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.

7.2.3.8 Presionar fuertemente el material sólido que ha quedado, y el líquido obtenido.

7.2.3.9 Preparar a partir de la solución obtenida extractos o tinturas, los primeros, el líquido obtenido (menstruo) se concentra en rotavapor o un equipo similar y se repite la operación hasta que se agote la droga con el disolvente recuperado; las tinturas solo se ajustan a volumen en función de la concentración deseada (1:5, 1:8 o 1:10) (30-34).

7.2.4 Concentración usando rotavapor:

La concentración representa la etapa siguiente al proceso de extracción. El proceso de concentración busca aumentar el contenido de sólidos totales en el extracto con la finalidad de: Alcanzar un determinado contenido de residuo seco, reducir producir extractos blandos y recuperar el disolvente. Los extractos también pueden ser concentrados para la extracción en contracorriente con disolventes no miscibles, con miras a la fabricación de extractos purificados o el aislamiento de sustancias puras (30,32,33,35).

El equipo necesario para la concentración con recuperación de disolventes es el evaporador rotatorio, cuyo funcionamiento se basa en los siguientes principios: (1) Se coloca la muestra en un balón de evaporación a 40°C que rota a una velocidad constante produciendo una película que aumenta la superficie de evaporación; (2) con la ayuda de una

bomba se genera un vacío entre 30 y 300 mbar que facilita la evaporación sin necesidad de aumentar la temperatura; (3) el vapor del disolvente es condensado en el refrigerante que esta conectado a un sistema de enfriamiento que luego se colecta en un balón colector (30,32,33,35).

Los pasos a seguir son los siguientes:

- 7.2.4.1 Verificar que estén conectadas todas las conexiones eléctricas.
- 7.2.4.2 Colocar el balón colector y fijarlo con la llave respectiva
- 7.2.4.3 Revisar el nivel de agua del baño de calentamiento.
- 7.2.4.4 Encender el baño y mantener la temperatura entre 50-60°C, dependiendo del equipo puede haber pérdidas de 10-20°C entre el baño de calentamiento y el interior del balón de evaporación, en todo caso el balón de evaporación no deberá tener una temperatura mayor de 40°C.
- 7.2.4.5 Revisar que la llave de alimentación del refrigerante esté cerrada.
- 7.2.4.6 Colocar el balón con la muestra y sujetar al vástago con la llave correspondiente.
- 7.2.4.7 Encender el botón que permite girar el balón que contiene la muestra a una revolución adecuada.
- 7.2.4.8 Conectar un sistema de enfriamiento o por lo menos de circulación de agua del chorro.
- 7.2.4.9 Encender la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.
- 7.2.4.10 Apagar la bomba de vacío Cuando haya iniciado la destilación,
- 7.2.4.11 Encender la bomba de vacío cuantas veces sea necesario hasta que se haya agotado el disolvente del balón de evaporación o ya no destile ningún líquido, lo que querrá decir que el vacío de nuestra bomba no es suficiente para evaporar la mezcla de disolventes contenida en el balón de evaporación (30,32,33,35).

7.2.5 Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

Los hongos son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento máximo de 7 – 28 días en medios artificiales específicamente diseñados. El tamizaje de la actividad antimicótica consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de un hongo, determinada en condiciones estándar con una concentración previamente determinada (36-41).

7.2.5.1 Preparación de medio de cultivo

7.2.5.2 Preparar tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud

7.2.5.3 Esterilizar durante 15 min 121°C, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 mL del extracto de planta a probar (dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL.

7.2.5.4 Verter en cajas de petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para verificar esterilidad.

7.2.5.5 Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso (35-40).

7.2.5.6 Preparación de inóculo

7.2.5.7 Preparar medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes:

Dextrosa	0.6 g
NaSO ₄	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Peptona	0.3 g
Agar-Agar	6.0 g

7.2.5.8 Agregar a 300 mL de agua, disolver, verter 6 mL en tubos con tapón de rosca esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 horas 25°C para descartar contaminación.

7.2.5.9 Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días)

7.2.5.10 Agregar a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla.

7.2.5.11 Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar 1 minuto en agitador y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer.

7.2.5.12 Llevar la suspensión a 100 esporas/ μ l = 1×10^5 esporas/mL (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración (35-40).

7.2.6 Inoculación de hongos filamentosos en placa

7.2.6.1 Abrir cuatro agujeros en las cajas con agar-planta a diferentes concentraciones, con una campanilla de Durhan de 5 mm de diámetro en forma equidistante.

Tomar 30 μ l de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27°C por 14 días.

7.2.6.2 Hacer 4 repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud como control negativo (36-41).

7.2.7 Lectura e interpretación de los resultados

7.2.7.1 Medir el diámetro de la colonia del hongo en mm.

7.2.7.2 Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.

7.2.7.3 Interpretar los resultados tomando como positivo los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%. (36-41).

7.2.8 Concentración mínima inhibitoria (CIM)

Consiste en la cuantificación mínima de un extracto, fracción o compuesto (originado de una droga vegetal) que previene el crecimiento visible de microorganismos, es decir, que ha demostrado su actividad en un prueba de tamizaje previo. Para su realización se emplean diluciones seriadas del extracto y concentraciones constantes del microorganismo y se evalúa el crecimiento del microorganismo en un ensayo estandarizado similar el que sirvió de tamizaje.

7.2.8.1 Procedimiento:

7.2.8.1.1 Preparación de Agar-Planta

7.2.8.1.2 Preparar tubos con 3.6, 3.8, 4 mL de agar Mueller-Hinton.

7.2.8.1.3 Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar a 50°C y agregar la solución del extracto disuelto (concentración de 10 mg/mL) en una caja cuadrilata de la siguiente manera:

3.6 mL de agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 1.0 mg/mL

3.8 mL de agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 0.5 mg/mL

3.9 mL de agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 0.25 mg/mL

7.2.8.1.4 Dejar un cuadrante con 4.0 mL de agar como control negativo.

7.2.8.1.5 Dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.

7.2.8.1.6 Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

7.2.8.2 Preparación del inóculo:

7.2.8.2.1 Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Muller Hinton inclinado, incubar 36°C durante 24 horas.

7.2.8.2.2 Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya, incubar a 36°C durante 48 horas.

7.2.8.2.3 Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua solución salina estéril (dilución 1: 100).

7.2.8.3 Demostración de la CIM.

7.2.8.3.1 Inocular tres estrías en cada uno de los cuadrantes de la caja.

7.2.8.3.2 Dejar reposar durante 5-10 minutos e incubar.

7.2.8.3.3 Incubar a 36°C por 24 horas.

7.2.8.4 Interpretación de resultados:

7.2.8.4.1 Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

7.2.8.4.2 Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

7.2.8.4.3 Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

7.3 Materiales

7.3.1 Cepa de cultivo puro del hongo fitopatógeno *A. dauci*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*.

7.3.2 Agar Muller-Hinton

7.3.3 Asa de nicromo

7.3.4 Autoclave

7.3.5 Cajas de petri cuadriplate

7.3.6 Caldo tripticasa soya

7.3.7 Etanol al 50%

7.3.8 Incubadora a 36°C

7.3.9 Pipetas automáticas

7.3.10 Puntas azules de 200 µl

7.3.11 Puntas amarillas de 1000µ

7.3.12 Refrigeradora

7.3.13 Solución salina isotónica

7.3.14 Tubos de tapón de rosca de 15 mL

7.3.15 Cajas de petri de vidrio estériles, que contengan un soporte de vidrio, un portaobjetos y un cubreobjetos.

7.3.16 Cajas de petri con agar sabouraud. Cultivo de *A. dauci*, *C. gloeosporoides*, *F. oxisporum*

7.3.17 Azul de Lactofenol

7.3.18 Asa de nicromo

7.3.19 Pinzas estériles.

7.3.20 Algodón

7.3.21 Papel filtro

7.3.22 Agitador

7.3.23 Cajas de petri simples

7.2.24 Campanillas de Durham

7.3.25 Papel parafilm

7.3.26 Pipetas automáticas

7.3.27 Regla graduada en mm

7.3.28 Viales

7.3.29 Asa de nicromo

7.4 Equipo

7.4.1 Campana de flujo laminar.

7.4.2 Incubadora a 27°C y 37°C

7.4.3 Balanza analítica

7.4.4 Autoclave

7.4.5 Rotavapor

7.4.6 Percolador de acero inoxidable

7.4.7 Agitador de tubos

7.4.8 Refrigeradora

7.4.9 Cámara de Neubauer

7.5 Reactivos

7.5.1 Disolvente orgánico (hexano, pentano o xileno)

7.5.2 Agar Sabouraud

7.5.3 Agar-Agar

7.5.4 Alcohol al 50%

7.5.5 Dextrosa

- 7.5.6 Etanol al 50%
- 7.5.7 Fosfato diácido de potasio
- 7.5.8 Peptona
- 7.5.9 Sulfato de sodio
- 7.5.10 Caldo tripticasa soya
- 7.5.11 Solución salina

7.6 Cristalería

- 7.6.1 Balón de 1000 mL
- 7.6.2 Vaso de precipitación
- 7.6.3 Matraces
- 7.6.4 Tubos de tapón de rosca 15 mL

7.7 Diseño Estadístico

Actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre hongos fitopatógenos

Variedades de hongo: 3

Tratamiento: 6 especies (extracto etanólico)

Metodología descriptiva.

7.7.1 Ensayo inhibición

Tamizaje: Placa (agar-planta)

Diseño casi experimental: Totalmente al azar con 4 réplicas por extracto (se inoculará 4 veces cada uno de los hongos en las 6 plantas).

Se deben hacer 4 repeticiones para un nivel de significancia $\alpha = 0.10$ (según la tabla de probabilidades de la distribución binomial).

7.7.2 Análisis

Como la respuesta es inhibición o no (binomial). Prueba de hipótesis binomial.

p = probabilidad de éxito (inhibición)

q = probabilidad de fracaso (crecimiento o no inhibición)

50% 0.50 p = q para la prueba de hipótesis y si $p > q$ quiere decir que si hay efecto.

Ho: $p \leq 0.5$ (no tiene efecto)

Ha: $p > 0.5$ (si tiene efecto)

Si de las 4 repeticiones todas son éxito: Ho se rechaza (sí hay efecto significativo con $p = 0.06$).

Con los extractos que dieron efecto se debe realizar CIM con diluciones (concentraciones), el procedimiento estadístico es el mismo para cada dilución.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención de extractos

Se prepararon seis extractos etanólicos y seis tinturas a partir de especies vegetales, a las que popularmente se les atribuye propiedades antifúngicas, las que fueron seleccionadas por medio de una base de datos recolectados por expertos en agricultura orgánica. En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos, calculado con base en los gramos de extracto obtenido y el peso de material seco.

Tabla 1. Porcentaje de actividad de extractos vegetales evaluados en el estudio.

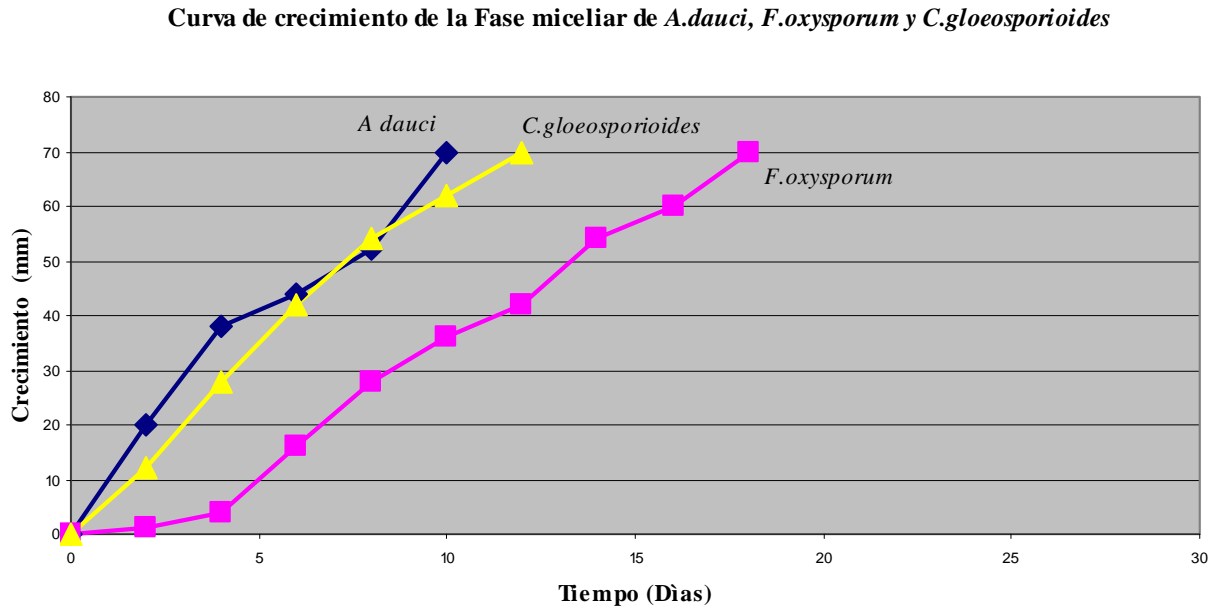
Planta	Parte	Peso	Rendimiento
<i>Bougainvillea glabra</i>	Flor	48.79 g	17.42 %
<i>Carica papaya</i>	Hoja	39.00 g	15.6 %
<i>Equisetum giganteum</i>	Hoja	23.45 g	15.61%
<i>Matricaria recutita</i>	Flor	46.83 g	15.61%
<i>Wigandia urens</i>	Hoja	40.36 g	14.81%
<i>Tagetes tenuifolia</i>	Hoja y flor	56.82 g	23.52 %

Fuente: Datos experimentales

8.2 Validación del método

Se utilizó el método de Brancato & Holding modificado por MacRae (39), obteniéndose una curva de crecimiento donde el desarrollo máximo de los hongos evaluado tuvo una media de 13 días.

Gráfica 1 Curva de crecimiento fase miceliar de los hongos: *A. dauci*, *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*:



8.3 Tamizaje de la actividad antifúngica

Se determinó la actividad antifúngica para la fase miceliar de los hongos *A. dauci*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* obteniéndose actividad positiva para los extractos etanólicos *B. glabra*, *C. papaya*, *M. recutita*, *W. urens* y *T. tenuifolia*. Así mismo actividad positiva para las tinturas de *B. glabra*, *C. papaya* y *M. recutita* (Tabla 2).

Tabla 2. Tamizaje antifúngico de los extractos seleccionados contra fase miceliar de *A. dauci*, *F. oxysporum* y *C. gloeosporoides*, con un nivel de significancia $\alpha=0.10$ y $p=0.06$.

Planta	Extracto/Tintura	A. dauci	F. oxysporum	C. gloeosporoides
<i>Bougainvillea glabra</i>	Extracto	-	-	-
<i>Bougainvillea glabra</i>	Tintura	+	+	-
<i>Carica papaya</i>	Extracto	+	-	-
<i>Carica papaya</i>	Tintura	+	-	-
<i>Equisetum giganteum</i>	Extracto	-	-	-
<i>Equisetum giganteum</i>	Tintura	-	-	-
<i>Matricaria recutita</i>	Extracto	+	+	+
<i>Matricaria recutita</i>	Tintura	+	-	-
<i>Tagetes tenuifolia</i>	Extracto	-	+	-
<i>Tagetes tenuifolia</i>	Tintura	-	-	-
<i>Wigandia urens</i>	Extracto	-	-	-
<i>Wigandia urens</i>	Tintura	-	-	-

(+) Actividad positiva a una concentración 1 mg./ml

(-) Actividad negativa a una concentración 1 mg./ml

Fuente: Datos experimentales

8.4 Concentración inhibitoria minima

Fue determinada la concentración inhibitoria mínima para los extractos y tinturas que presentaron actividad positiva contra la fase miceliar de los hongos evaluados como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. CIM de los extractos activos a 1 mg contra *A. dauci*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*

Planta	Extracto/Tintura	<i>A. dauci</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
<i>Bougainvillea glabra</i>	Tintura	0.25 mg/ml.	0.50 mg/ml.	-
<i>Carica papaya</i> .	Extracto	0.12 mg/ml.	-	-
<i>Carica papaya</i> .	Tintura	0.12 mg/ml.		
<i>Matricaria recutita</i>	Extracto	0.02 mg/ml.	0.12 mg/ml.	0.12 mg/ml.
<i>Matricaria recutita</i>	Tintura	0.12 mg/ml.	-	-
<i>Wigandia urens</i>	Extracto	0.12 mg/ml.	-	-

Fuente: Datos experimentales

9. DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente estudio fue determinada la actividad de seis plantas utilizadas popularmente en Guatemala contra los hongos fitopatógenos: *A. dauci*, *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*, los cuales fueron obtenidos mediante el aislamiento de material vegetal infectado según la metodología de Agrios (24).

El ensayo antifúngico se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Brancato & Golding modificado por MacRae *et al.* para hongos filamentosos en esta investigación. Se evaluó la actividad contra los hongos *A. dauci*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, en su fase miceliar, utilizando extractos obtenidos por concentración y tinturas.

Se realizó una curva de crecimiento para evaluar el comportamiento de los hongos utilizados en este estudio, durante un período de 21 días, con la finalidad de estandarizar el tiempo máximo de crecimiento de cada uno, obteniéndose una media de 10 días.

Las plantas utilizadas en este estudio fueron: *Bougainvillea glabra* (flor), *Carica papaya* (hoja), *Equisetum giganteum* (flor), *Matricaria recutita* (flor), *Wigandia urens* (hoja) y *Tagetes tenuifolia* (hoja y flor), que fueron seleccionadas en base a una encuesta nacional realizada por profesionales con experiencia en producción orgánica, la cual indicó que dichas plantas presentaron actividad antifúngica al ser preparadas popularmente.

El porcentaje de rendimiento obtenido para las especies vegetales de este estudio puede observarse en la Tabla 1, de acuerdo a estos resultados la especie *Tagetes tenuifolia* presentó el mayor rendimiento.

De las treinta y seis diferentes formulaciones que se prepararon utilizando las especies vegetales analizadas, nueve presentaron actividad en el tamizaje, lo que corresponde a un 25%. Se determinó la actividad antifúngica de los extractos y tinturas, estableciendo previamente un punto de corte de 1 mg/dl. Los resultados del tamizaje demostraron que la fase miceliar del hongo *A. dauci* fue significativamente susceptible ($p=0.06$) a los extractos etanólicos de *C. papaya*, *M. recutita*, *W. urens* y a las tinturas de *B. glabra*, *M. recutita* y *C. papaya*, mientras que la fase miceliar de *C. gloeosporioides* fue significativamente susceptible ($p=0.06$) al extracto de *M. recutita*; y finalmente la fase miceliar de *F. oxysporum* fue significativamente susceptible ($p=0.06$) al extracto etanólico de *M. recutita* y a la tintura de *B. glabra* (Tabla 2).

Se determinó la CIM para los extractos y tinturas que presentaron actividad antifúngica, realizando diluciones seriadas para cada uno de ellos y como se observa en la Tabla 3, el extracto etanólico de *M. recutita* presentó actividad contra los tres hongos evaluados, a concentraciones tan bajas como 0.02 mg/ml contra la fase miceliar de *A. dauci* y 0.12 mg/ml para las fases miceliars de *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*; así mismo la tintura de esta especie presentó actividad contra la fase miceliar de *A. dauci* en una concentración de 0.12 mg/ml.

Estudios anteriores han demostrado que *M. recutita* tiene compuestos biológicamente activos con propiedad antifúngica tales como: el α – bisabolol y los espiroéteres (43,44). En este estudio *M. recutita* se preparó en dos formas diferentes: Extracto etanólico y tintura, presentando ambas actividad fungicida. Sin embargo los resultados demostraron que el extracto etanólico fue más efectivo que la tintura; esto puede deberse a que en esta preparación los principios activos se encuentran en una mayor concentración.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la CIM, la especie vegetal *B. glabra* en su preparación de tintura demostró actividad contra las fases miceliars de *A. dauci* y *F. oxysporum* a una concentración de 0.25 mg/ml y 0.50 mg/ml respectivamente. Mientras que *C. papaya* (extracto y tintura), *W. urens* (extracto) también evaluadas en la CIM, presentaron actividad contra la fase miceliar de *A. dauci* a una concentración de 0.12 mg/ml para ambas especies.

Se observó que la fase miceliar de *A. dauci* fue susceptible a un número mayor de especies vegetales en comparación con los otros dos hongos evaluados, ya que no hubo crecimiento cuando se enfrentó contra las tinturas de *M. recutita*, *B. glabra* y *C. papaya* y a los extractos de *M. recutita*, *C. papaya* y *W. urens*.

La actividad antifúngica que presentaron las plantas evaluadas en este estudio es importante ya que estas al ser preparadas en forma artesanal constituyen una forma alternativa y eficaz contra el crecimiento de los hongos fitopatógenos. Por lo tanto se confirma científicamente que las preparaciones populares tienen componentes activos que inhiben el crecimiento de hongos miceliars.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El extracto etanólico de *M. recutita* inhibió la fase miceliar de *Alternaria dauci*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*.
- 10.2 El extracto etanólico de *M. recutita*, presentó una CIM de 0.02 mg/ml contra la fase miceliar de *Alternaria dauci*.
- 10.3 La tintura de *B. glabra* inhibió significativamente ($p=0.06$) el crecimiento de *Alternaria dauci* y *Fusarium oxysporum* en sus fases miceliales.
- 10.4 La fase miceliar de *Alternaria dauci* fue inhibida significativamente ($p=0.06$) por el extracto y tintura de *C. papaya* y el extracto etanólico de *W. urens*.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar nuevas investigaciones enfrenteado *M. recutita* contra otros hongos fitopatógenos, para conocer su espectro de inhibición.
- 11.2 Continuar con la investigación de la actividad contra hongos fitopatógenos de otras especies vegetales usadas en la agricultura orgánica.
- 11.3 Experimentar en cultivos enfermos el uso de formulaciones a base de *M. recutita*.

12. REFERENCIAS

1. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala, Fieldiana: Botany. 24(5):453p.
2. Tejeda MS. Estudio Etnobotánico de las plantas medicinales de 6 comunidades del municipio de San Juan Chamelco del departamento de Altaverapaz. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, facultad de Agronomía) 2003. (p.90, 91, 349, 350, 351)
3. D. Alcalá de Marcano, N. Vargas y A. Pire. “Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento miceliar in Vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicota*”. Scielo, Octubre 2005. 15 julio 2008. <http://www.scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037878182005000400001&ing=es&nr=iso>
4. Cáceres A. *et al* Actividad Antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones. Guatemala. Cuaderno de Investigación DIGI 4-90. 1990. 20p.
5. Grainge M, Ahmed S. Handbook of Plants with pest-control properties. New York. John Wiley & Sons. 1998 (p.52, 121, 179).
6. Guerrero MG. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña. 2da. ed. San Salvador. Editorial Universitaria. 1994. (p.124, 125, 173,180, 181, 224, 379).
7. Morton JF. Fruits of Warm Climates. Winterville. Creative Resources Systems Inc. 1987. (p.336, 346).
8. Standley PC, Williams LO, Flora of Guatemala, Fieldiana: Botany. 24(7):148. 1961.
9. Rodríguez H. Plantas plaguicidas en Costa Rica. San José Costa Rica. Editorial Universidad Nacional Heredia. 2001. (p.54, 112).
10. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala. Editorial Universitaria. 1996. (p.101,102,140, 141, 249, 250, 299, 300).
11. Roque JM. Flora Medicoguatemalteca. Guatemala. Tipografía Nacional. Tomo I. 187p.
12. Nash DL, Williams LO. Flora of Guatemala, Fieldiana: Botany; 1976; 24(12):390,594.
13. Tyler VE. The Honest Herbal. New York. 3ra Ed. Pharmaceutical Products Press. 1993. 83p

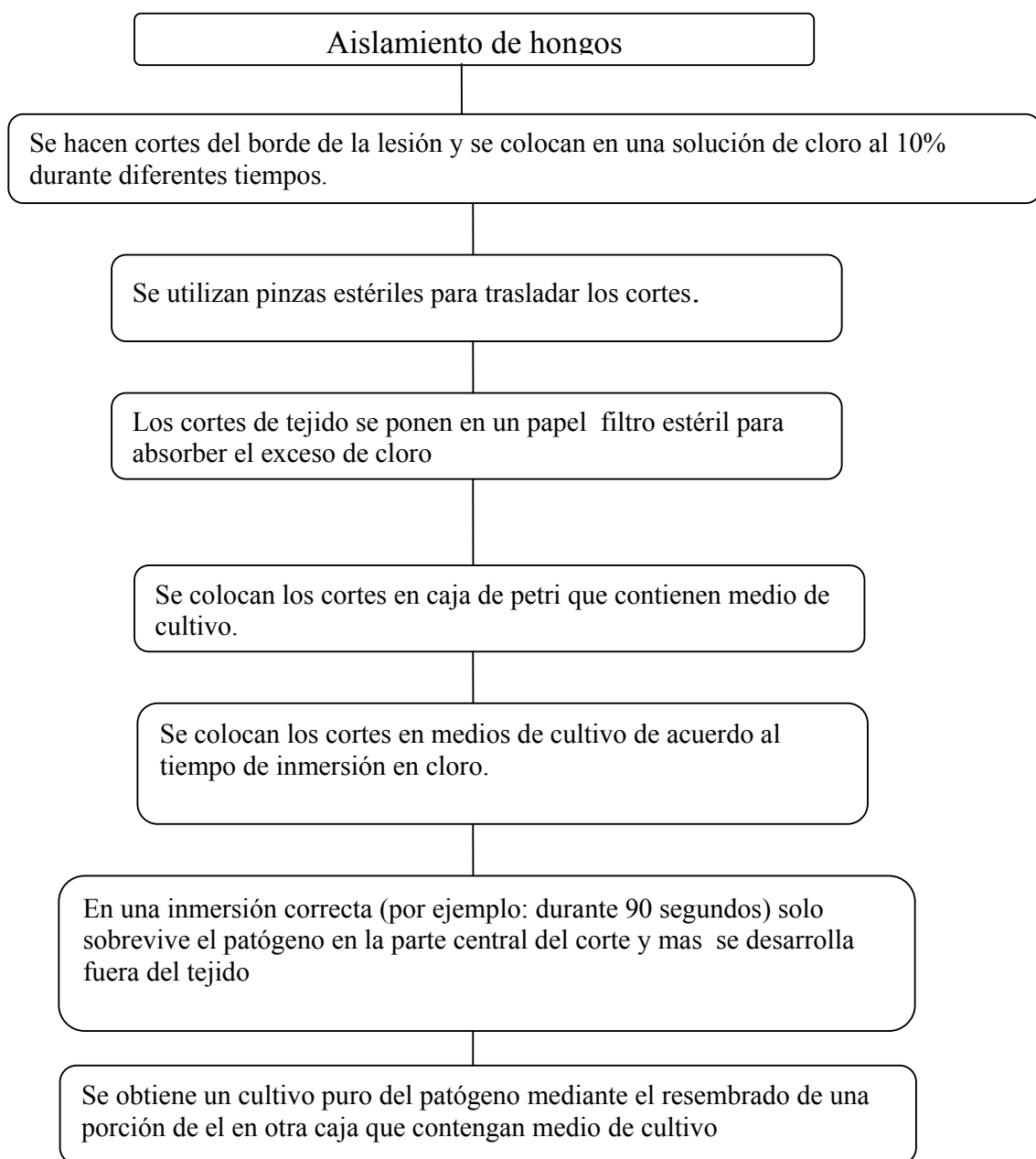
14. Gibson DN. Flora of Guatemala, Fieldiana: Botany 1980. 24(8):(p.109-111, 202, 215p).
15. Aguilar JI. Relación de unos aspectos de la flora útil de Guatemala. Guatemala. Ministerio de Agricultura de Guatemala. 1986. (p348-375)
16. Díaz JL. Uso de las Plantas Medicinales de México. México. IMEPLAM. 1976. 320p.
17. Instituto Indigenista Nacional. Aspectos de la medicina popular en el área rural de Guatemala. Guatemala. Guatemala Indígena. 1971. 8:(8,124,248,5729).
18. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle América. Springfield. Charles C. Thomas Publisher. 1981. 1420p.
19. Fletes JL. Confirmación de la acción antibacteriana in vitro de 4 plantas de flora silvestre guatemalteca (Tesis). Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. 1990. 75p.
20. Cáceres A, Samayoa, B. Tamizaje de la actividad antibacteriana de las plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Cuaderno de Investigación No. 6:89. Dirección General de Investigación USAC. Guatemala 138p.
21. Turner BL. "The Compositae of Mexico. Tageteae and Anthemideae" Phytologia Memoirs. 1996. 6(10):(p.51-69).
22. De Padua LS, Lugod GC and Pancho JV. Medicinal Plants Vol 3. Phillipines. University Philis. Tech. Bull. Lon Banos. 1981. (p.63,66).
23. Chi Manzanero BH, Flores P y Rivera R. "Cempasúchil: fuente importante de carotenoides", Revista Ciencia y Desarrollo, julio/agosto del 2002, vol. XXVIII, núm. 165. (p.20-25)
24. Agrios GN. "Manual de Enfermedades de las Plantas". Impreso en México. Editorial Limusa. S.A.. 1991. (p.201-218)
25. Singleton L., Mihail J. y Rush Charles M. Methods for Research on Soilborne Phytopatrogenic Fungi. 2da. Ed. APS Press. Washington, E.E. U.U. 1993.
26. Alexopoulos CJ. Introducción a la Micología" Omega Barcelona España. 1985
27. Cáceres E. Producción de Hortalizas. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José Costa Rica. 1980. (p 264-265)
28. García JE. Introducción a los Plaguicidas. San José Costa Rica. (p.1997. 149-151, 182, 184, 187, 190-191).

29. Toriello MC, Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos. Métodos de laboratorio. UNAM. 2002. (p.18,32)
30. Larone D. Medically Important Fungi. A guide to identification. Washington DC. 2002. (p.304-305)
31. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega. 2000. 515p.
32. Medinilla B. Manual de Laboratorio de Farmacognosia. Guatemala:USAC. 1996. 38p.
33. Real Farmacopea Española 2da. Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2002. 2801p.
34. Sharapin, N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 2000 (35-49p).
35. Brancato FP & Holding NS. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. J. Mycol. 45:848-863p.
36. Burlingame EM & Reddish GP. Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. J. Lab. Clin. Med. 1973. 14:649-653p.
37. Cáceres A et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. J. Ethnopharmacol. 1993. 40:207-213p,
38. Cáceres A et al. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. J. Ethnopharmacol. 1998. 62:195-202p.
39. Mac Rae WD et al. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. J. Ethnopharmacol. 1998. 22:143-172p.
40. MacCarthy P et al. Antifungal activity of meridine. A natural product from the marine sponge. J. Nat. Prod 1992. 55:1644-1668p.
41. Vanbrenseghem R. De Vroey VR & Takashio M. Production of macroniconidia by *Microsporium ferrugineum* OTA 1922. Sabouraudia 1970. 7:252-56p.
42. Emilia Mellado, Manuel Cuenca-Estrella y Juan Luis Rodríguez-T u d e l a Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos Unidad de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Ctra. de Majadahonda-Pozuelo. 28220 Madrid. España 2004.

43. Di Fabio Amanda, Dalmau M. “Manzanilla una contribución para el mejoramiento de la calidad” V Congreso Nacional de Recursos naturales aromaticos y medicinales. 11: 27-32 1993.
44. Raal A, Arak E, Orav A, Ivask K. “Comparison of essential oil content of *Matricaria recutita* L. from different origins” Departamento de Farmacia, Universidad de Tartu. *Ars Pharmaceutica*, 44:2; 159-165, 2003.

13. ANEXOS

Anexo 1: Según Agrios GN. “Manual de Enfermedades de las Plantas” (p.201-218)



Gody Iveth Alonzo Pineda

Autora

Herlinda Magdalena Letrán Mejía

Autora

Julia Nohemi Sánchez Mazariegos

Autora

Lic. Armando Cáceres

Asesor

M.Sc. Margarita Paz de Ramírez

Revisora

M.Sc. Vivian Matta de García

Directora de Escuela

Oscar Cobar Pinto Ph.D

Decano