

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Biocontrol de fitonematodos del género *Meloidogyne* utilizando saponinas en cultivos de piña (*Ananas comosus*) en el Ecuador

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Microbiología

JOSÉ IGNACIO YÁNEZ SEGOVIA

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología del Sr. José Ignacio Yánez Segovia ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jennifer Yánez Altuna', is written over a horizontal line.

Mtr. Jeniffer Yánez Altuna
Directora de la Disertación
Quito, 16 de junio de 2023

DEDICATORIA

En memoria de María del Rosario Lizano Paredes

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al personal de AGROCALIDAD, por su apoyo en la realización de la parte experimental de la tesis.

Agradezco a la Mtr. Jeniffer Yáñez, por su incondicional apoyo durante el proceso de elaboración de la tesis, además agradezco su comprensión y gentileza por ayudarme.

A mis pades Giovanna Segovia y Ney Yáñez por acompañarme y tolerarme no solo en este camino, si no durante toda mi crianza y por enseñarme día a día el valor del trabajo y esfuerzo.

A mis hermanos Carolina y Francisco Yáñez que siempre los he visto con gran admiración por su inteligencia y desempeño como doctores, por ser mis ejemplos a seguir y enseñarme lo lejos que se puede llegar con esfuerzo y dedicación, también por enseñarme valores que en un futuro me servirán.

A mi novia Doménica Espín, por haberme acompañado día a día en este camino y también por toda la felicidad y amor que me ha compartido, también por ayudarme a valorarme a mí mismo en los momentos difíciles.

A Juan Fernando Bayas quien se convirtió en mi mejor amigo, por su amistad incondicional durante toda la carrera universitaria que fue un pilar fundamental y apoyo en todo momento.

A Dylon Ramos por ser mi primer amigo de la universidad, por ayudarme a comprender el valor de la disciplina y el esfuerzo con el trabajo constante.

A mis amigos y futuros colegas: Jonattan Tobar, Camila Nuñez, Jerram Pozo, Micaela Yépez, Francisco Vega, Kevin Gallo, Francis Herrera y Stephany Murillo, por haberme dado amistades de por vida y por ser tan buenos conmigo en todo momento.

A mis amigos del colegio, Martín Córdova e Isaac Díaz, por haber construido una amistad de tantos años, por todas las risas y alegrías que traen a mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	8
2.	ABSTRACT	9
3.	INTRODUCCIÓN.....	10
	3.1 Importancia económica	10
	3.2 Patógenos de la piña.....	10
	3.3 Control para nemátodos.....	11
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
	4.2 EXTRACCIÓN DE NEMATODOS.....	15
	4.2.1 EXTRACCIÓN DE NEMATODOS A PARTIR DE SUELO CON EMBUDO DE BAERMAN.....	15
	4.2.2 EXTRACCIÓN DE NEMATODOS A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL	16
	4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE NEMATODOS.....	17
	4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA EN LABORATORIO.....	17
	4.4.1 MONTAJE DE LA UNIDAD EXPERIMENTAL.....	17
	4.4.2 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE TÉ DE SAPONINA.....	18
	4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
	5.1 Identificación morfológica de nemátodos <i>Meloidogyne</i>	22
	5.1.1 Estructuras morfológicas en la cabeza del nematodo.....	23
	5.1.2 Estructura de cola en el nematodo.....	24
	5.2 Resultados de actividad nematicida.....	24
	5.3 Análisis estadístico	27
	5.3.1 Análisis descriptivo exploratorio.	27
	5.3.2 ANOVA.....	27
	5.3.3 Prueba pos hoc – Tukey.....	28
	5.3.4 Dosis letal 50 (DL50).....	29
6.	CONCLUSIONES.....	31
8.	ANEXOS.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conservación en material biológico.....	14
Figura 2. Embudo de Baerman.	15
Figura 3. Proceso de filtrado usando los tamices.	16
Figura 4. Comparación entre la caja mono Petri y el contenedor utilizado.....	18
Figura 5. Pesaje de la saponina para la preparación de la solución stock.	19
Figura 6. Recta de regresión lineal para calcular la dosis letal media (DL50).	21
Figura 7. Cuerpo completo del nematodo macho Meloidogyne.	22
Figura 8. Cabeza nematodo Meloidogyne vivo.....	23
Figura 9. Cabeza del nematodo Meloidogyne.	23
Figura 10. Cola nematodo Meloidogyne.	24
Figura 11. Cola del nematodo Meloidogyne.	26
Figura 12. Diagrama de caja obtenido en SPSS	27
Figura 13. Recta de regresión lineal dosis Letal media (DL50).....	30

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos evaluados. Concentraciones presentes en la solución stock y después de la dilución tras la colocación en la unidad experimental	20
Tabla 2. Promedio del tiempo de muerte de los nematodos, expresados en horas y en minutos.....	25
Tabla 3. Esquema de ANOVA del tiempo de muerte (minutos) obtenida en SPSS.	28
Tabla 4. Prueba de Tukey HSD. Tiempo de muerte (minutos)obtenida en SPSS.	28
Tabla 5. Porcentaje de mortalidad de nematodos. Actividad nematicida en la primera hora de tratamiento	29

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Datos de las mediciones de la dosis alta de saponina. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 2. Datos de las mediciones de la dosis media alta de saponina. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 3. Datos de las mediciones de la dosis media de saponina. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 6. Datos de las mediciones de la dosis media baja de saponina. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 5. Datos de las mediciones de la dosis media baja de saponina. **¡Error! Marcador no definido.**

1. RESUMEN

Uno de los principales productos de exportación de Ecuador es la piña, que genera ingresos netos de \$37 millones en 2021, lo que le convierte en un cultivo de interés para el mercado ecuatoriano los fitonematodos del género *Meloidogyne* tienen un impacto en la industria de la piña, comúnmente conocidos como nematodos agalladores. Los agricultores se ven obligados a usar pesticidas tóxicos, lo que puede tener efectos negativos a largo plazo en la planta, los agricultores, los consumidores y el medio ambiente. Utilizar pesticidas diseñados específicamente para controlar la plaga en cuestión, como las saponinas, que tienen un espectro reducido, es crucial para reducir el impacto ambiental. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia *in vitro* del té de saponina de *Camellia japonica* para combatir los nematodos en los cultivos de piña. Se llevaron a cabo experimentos de laboratorio para evaluar la actividad nematocida del té de saponina sobre los nematodos de la especie *Meloidogyne*, por medio de la evaluación de parámetros como la tasa mortalidad, tiempos de muerte y alteraciones morfológicas. Se evaluaron cinco dosis diferentes de té de saponina (60 mg/mL, 45 mg/mL, 30 mg/mL, 22,5 mg/mL y 15 mg/mL) con tres repeticiones para cada dosis. Los nematodos se expusieron a cada dosis y se realizaron observaciones periódicas hasta que mueran en su totalidad. Los resultados mostraron que el té de saponina de *C. japonica* afectó la viabilidad y la motilidad en comparación con los nematodos del grupo de control. En el análisis ANOVA se observaron diferencias significativas en los diferentes tiempos y con distintas dosis de té de saponina siendo la dosis alta (60 mg/mL) la que presentó acción nematocida total en un periodo de 61 minutos. adicionalmente, la dosis letal media (DL50) fue de 37 mg/mL, que eliminó al 50% de los nematodos en un período de una hora. Este estudio proporciona pruebas iniciales de la actividad nematocida del té de saponina de *C. japonica* sobre los nematodos en condiciones de laboratorio y da paso a investigaciones futuras para optimizar las dosis de saponina para las condiciones económicas de los productores de piña.

Palabras clave: té de saponina, *Camellia japonica*, nematocida, *Meloidogyne*, piña.

2. ABSTRACT

One of Ecuador's main export products is pineapple, which generates net income of \$37 million in 2021, which makes it a crop of interest for the Ecuadorian market. Phytonematodes of the genus *Meloidogyne* have an impact on the pineapple industry, commonly known as root-knot nematodes. Farmers are forced to use toxic pesticides, which can have long-term negative effects on the plant, farmers, consumers, and the environment. Using pesticides specifically designed to control the pest in question, such as saponins, which have a narrow spectrum, is crucial to reduce environmental impact. The objective of this study was to evaluate the in vitro efficacy of *Camellia japonica* saponin tea to combat nematodes in pineapple crops. Laboratory experiments were carried out to evaluate the nematicidal activity of saponin tea on nematodes of the *Meloidogyne* species, through the evaluation of parameters such as mortality rate, death times and morphological alterations. Five different doses of saponin tea (60 mg/mL, 45 mg/mL, 30 mg/mL, 22.5 mg/mL, and 15 mg/mL) were evaluated with three replicates for each dose. The nematodes were exposed to each dose and periodic observations were made until they died completely. Results showed that *C. japonica* saponin tea affected viability and motility compared to control group nematodes. In the ANOVA analysis, significant differences were observed at different times and with different doses of saponin tea, the high dose (60 mg/mL) being the one that presented total nematicidal action in a period of 61 minutes. Additionally, the median lethal dose (LD50) was 37 mg/mL, which killed 50% of the nematodes within one hour. This study provides initial evidence of the nematicidal activity of *C. japonica* saponin tea on nematodes under laboratory conditions and opens the way for future research to optimize saponin doses for the economic conditions of pineapple growers.

Keywords: saponin tea, *Camellia japonica*, nematicide, *Meloidogyne*, nematode.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Importancia económica

A nivel mundial la piña es importante para la economía de numerosos países que poseen regiones tropicales aptas para el cultivo de esta fruta. La popularidad de la piña se debe a sus propiedades organolépticas como el sabor agrisulce que le otorgan un alto potencial culinario a nivel gastronómico dentro de diversas culturas (Vera Obando et al., 2017). En un plano local, la piña es uno de los productos más exportados por el Ecuador, en el año 2021 aportó con \$37 millones de dólares en ingresos netos al país (Prado, 2021).

Según Chica (2018), la piña perolera o criolla es la principal variedad de piña cultivada en el Ecuador con una fuerte prevalencia en siete provincias, Los Ríos, El Oro, Guayas, Pichincha, Santo Domingo, Esmeraldas y Manabí. El rendimiento del cultivo representa un total 90.000 toneladas de piña al año (Jumbo, 2022). Debido a la importancia de la piña en el ámbito económico, el control ante plagas y enfermedades es vital para mantener un balance económico en la producción de esta fruta.

3.2 Patógenos de la piña

Dentro de los patógenos que afectan directamente a la industria de la piña en el país se encuentran los fitonematodos del género *Meloidogyne*. Estos organismos, pertenecen al reino Animalia, división Nematoda, clase Secernentea, orden Tylenchida y familia Meloidogynidae. Los nematodos de este género comúnmente se los conoce como nematodos agalladores, reciben su nombre debido a que al ser organismos biotrofos obligados en raíces, producen agallas en este segmento de las plantas, afectando plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Eisenback, 1991). Este tipo de nematodos representan un papel negativo en cultivos de gran importancia económica, tal es el caso que el primer reporte de *Meloidogyne spp.* en cultivos de yuca en al año de 1899 por científico suizo-brasileño Emil Goeldi (Salazar-Antón & Guzmán-Hernández, 2013). El ciclo de vida de *Meloidogyne* consta de tres formas principales, empezando por el huevo, el estado juvenil y por último la forma adulta, cada una de estas etapas de desarrollo es directamente afectada por de otros factores como la temperatura, la

humedad y la planta huésped, en el caso de que existan condiciones favorables de desarrollo, la población tendrá una tasa de crecimiento elevada a partir de dos individuos, no es necesario un ambiente completamente favorable para la supervivencia de los nematodos, ya que pueden entrar en un estado de hidrobiosis que les permite sobrevivir en condiciones desfavorables como una estación seca o un invierno frío (Coyne et al., 2008).

En cuestión a la morfología de los nematodos, es posible señalar que las hembras pertenecen al grupo de endoparásitos sedentarios, las hembras a su vez son globosas y se van a encontrar pegadas a la superficie de la raíz formando quistes. Los machos pertenecen al grupo de endoparásitos migratorios, en su fase infectiva se mueven a través de las partículas de suelo e invaden a la raíz de la planta y allí se ubicará hasta su muerte, los machos a su vez se mantienen vermiformes durante toda su vida (en forma de gusano) (Coyne et al., 2008).

De acuerdo con la definición de Eisenback & Hirschmann (1981), en la región cefálica del nematodo *Meloidogyne* se encuentran dos estructuras principales: el estilete y los nódulos, el estilete se describe como una estructura delgada, rígida y hueca que se extiende desde la boca del nematodo hasta la región esofágica, su función principal es permitir que el nematodo *Meloidogyne* perfora la raíz de la planta huésped y se alimente de ella, esta estructura desempeña un papel crucial en la interacción entre el nematodo y la planta, siendo esencial para su supervivencia y desarrollo, por otro lado Jaravas et al. (2003), define a los nódulos como estructuras anchas y posteriormente redondeadas, y se cree que se encuentran relacionados a la capacidad de penetración y alimentación del nematodo.

3.3 Control para nematodos

La falta de conocimiento sobre opciones de biocontrol para fitonematodos a nivel nacional obliga a los agricultores a colocar pesticidas tóxicos, que a largo plazo pueden afectar a la planta, al agricultor, a quien la consume y al ambiente (National Pesticide Center, 2012). La reducción de efectos desfavorables de los pesticidas artificiales en el medio ambiente se basa en reducir el mal uso de los mismos, similar a los antibióticos, el uso de pesticidas de amplio espectro no sólo

afectará a la plaga en específico, sino que también se ponen en riesgo otros organismos fundamentales del suelo y de la planta (National Pesticide Information, 2018). Es fundamental utilizar pesticidas o agentes biológicos diseñados para controlar la plaga que nos concierne, de esta manera se reducirá el impacto colateral hacia el medio ambiente.

Las saponinas se presentan como alternativa segura ante el control de plagas, es fundamental destacar que las saponinas poseen un espectro reducido, para reducir el impacto colateral a otros organismos del medio ambiente. La naturaleza química de las saponinas le confieren características que aumentan su actividad superficial, lo que permite su uso como detergente natural y agente estabilizante, características deseadas para elevar la efectividad en el control de nematodos en cultivos de interés (Ahumada et al., 2016).

Existen evidencias del uso local de las saponinas como nematocida en la provincia de Tungurahua, donde se utiliza el suero de quinua (*Chenopodium quinoa*) en diferentes concentraciones para eliminar nematodos del género *Meloidogyne* con una efectividad hasta del 94% en un concentrado del 50% de este suero. Las saponinas pueden ser obtenidas a partir de los residuos de procesos de producción industrial, como en la producción de chocho o en la producción de quinua (Solis, 2017).

En este contexto, este estudio evaluó el efecto del té de saponina obtenido a partir de la flor de *Camellia japonica* para eliminar nematodos del género *Meloidogyne* importante plaga de la piña en el litoral ecuatoriano

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad de la saponina como nematocida de primera línea, para la prevención y tratamiento de infecciones causadas por nematodos en cultivos de piña en Ecuador.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Identificar morfológicamente fitonematodos del género *Meloidogyne* como la principal plaga en cultivos de piña.

- Determinar la dosis adecuada del té de saponina de *Camellia japónica* para su uso como nematicida en cultivos *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio es de tipo experimental donde se investigó los efectos nematocidas que posee el té de saponina obtenido a partir de *C. japonica* en fitonematodos presentes en cultivos de piña. Esta fase del estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Agrocalidad en Tumbaco y en el Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la PUCE, localizados en Quito–Ecuador.

4.1 OBTENCIÓN DE NEMATODOS

Los nematodos se mantuvieron en el material biológico (plantas). La técnica se centra en el uso de plántulas sanas susceptibles al ataque de este patógeno, que serán introducidas en sustrato o suelo contaminado por nematodos. Las plantas infectadas se conservaron en condiciones adecuadas, la temperatura oscilaba entre 17°C y 23 °C durante el día. Los nematodos infectaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), una fuente de alimento constante (raíces de plantas) para sobrevivir y reproducirse (Comunicación personal, Navarrete X, Agrocalidad, 2023). Se realizaron riegos diarios para conservar una humedad adecuada, evitando el exceso de agua y consiguiente pudrición de las raíces. Al cabo de un mes, se comprobó una correcta infección de nematodos por medio la presencia de agallas en las raíces (Senasica, 2020).



Figura 1. Conservación en material biológico. Se aprecian tres ejemplares de tomate *Sheilla Victory*, posterior a la inoculación de concentrado de nematodos.

4.2 EXTRACCIÓN DE NEMATODOS

4.2.1 EXTRACCIÓN DE NEMATODOS A PARTIR DE SUELO CON EMBUDO DE BAERMAN

El embudo o sistema Baerman consta de un embudo de vidrio de tamaño de 15 cm de diámetro una manguera de hule que se ajusta en la parte inferior del embudo, en la parte libre se coloca una pinza de presión de tipo Mohr para regular el flujo de la solución filtrada (Solis, 2017). El sistema se encuentra suspendido en un trípode o soporte universal (Figura 2). Según Esquivel (2013), al embudo de Baerman se añade papel filtro o una bolsa de tela porosa, se ubica 500 ml de agua potable, y se agrega 100 gramos de suelo. Para el tamizaje se instalaron seis embudos y se recolectaron 100 mL de filtrado en un vaso de precipitación de 1000 mL. Para la caracterización morfológica de los nematodos se homogenizó la solución, se procedió a tomar alícuotas de 10 mL con ayuda de una pipeta graduada, se colocó en una caja Petri, y se realizó la observación en un estereoscopio con un aumento de 10x.

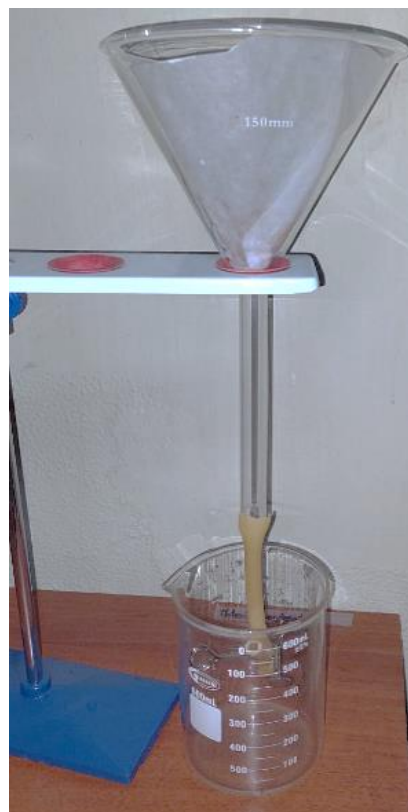


Figura 2. Embudo de Baerman.

4.2.2 EXTRACCIÓN DE NEMATODOS A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL

El protocolo aplicado por Agrocalidad, para extracción de nematodos de raíz y partes vegetales (Stemerding (s.f)), empieza con el lavado con agua potable de todas las raíces o material vegetal, se preparó 10 g de material vegetal cortado en segmentos de medio centímetro, se licuó durante 15 segundos, en dos tiempos con cinco segundos de descanso, se desinfectó los cortes vegetales con suficiente hipoclorito de sodio al 0.5% para cubrir los segmentos. Posteriormente, se recuperó el contenido del licuado en un recipiente plástico y se realizó la homogenización por tres minutos. Esta mezcla se filtra sobre tres tamices de apertura de poros sobrepuestos de abajo hacia arriba en el siguiente orden: 38, 45 y 250 micras (J&G Scientific) (Figura 3).



Figura 3. Proceso de filtrado usando los tamices.

El contenido en los tamices se lava con una ducha y piceta de agua corriente, hasta eliminar todo el cloro excedente en la muestra. El sedimento del último tamiz se ubica en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, donde se realizó la última homogenización de la suspensión y se tomó una alícuota en un vaso de precipitación para realizar la caracterización morfológica de los nematodos.

4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE NEMATODOS

La identificación microscópica de los nematodos *Meloidogyne* machos en estereoscopio es una técnica valiosa para la identificación precisa y relativamente fácil. Las características morfológicas distintivas, como las estructuras existentes en la cabeza del nematodo: el estilete y la estructura de los nódulos, a su vez también se destaca la visualización de la cola (Coyne et al., s.f.).

4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA EN LABORATORIO

La saponina evaluada se presenta en una formulación de polvo mojable y la fórmula concentrada de sapogenina oscila de 25% a 30% (Cycle Bioscience, 2017).

4.4.1 MONTAJE DE LA UNIDAD EXPERIMENTAL

El ensayo *in vitro* para la evaluación de la efectividad de saponina requirió de la manipulación correcta de los nematodos, para seleccionarlos individualmente identificarlos, y posterior administración del producto. Para realizar la pesca de los nematodos se utilizaron dos herramientas principales, un estereoscopio y una pipeta automática de 1-10 μL . Una vez el nematodo se encontraba en la punta de la pipeta, fue transferido a un vidrio de reloj que actuó como una caja Petri de plástico a escala reducida (30 mm) (Figura 4). El contenedor ayudó a simplificar el recuento de nematodos al ser un área de búsqueda pequeña en comparación con una caja Petri de 80 mm. Esta característica brindó una gran ventaja al momento de colocar el té de saponina, puesto que los nematodos transferidos se dispersaron por una superficie menor. Con el propósito de facilitar el recuento en los intervalos de tiempo correctos, se reagrupó a los nematodos en un solo campo de visión.

La unidad experimental fue el vidrio de reloj con 10 nematodos en 1 mL de agua corriente, donde se administraron las diversas dosis del té de saponina.

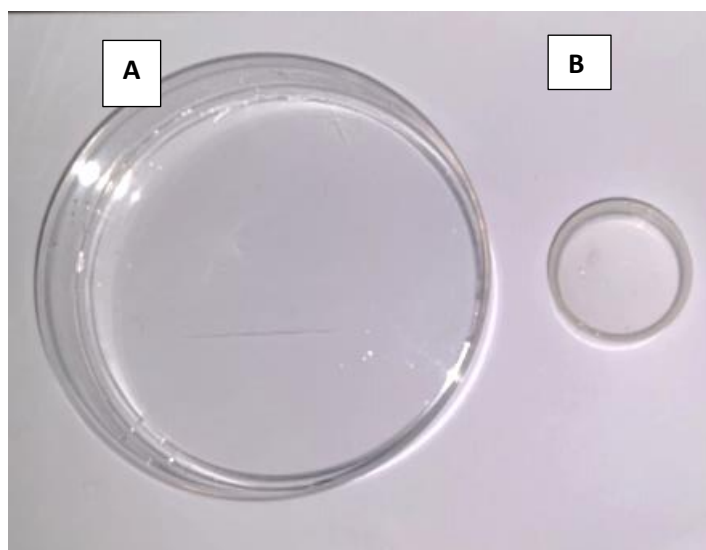


Figura 4. Comparación entre la caja mono Petri y el contenedor utilizado. Caja Petri (A) de 80 mm junto al vidrio de reloj (B) de 30 mm.

4.4.2 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE TÉ DE SAPONINA

La dosis alta propuesta por Adomaitis y Skujienė (2020) fue disminuida de 150 mg/mL a 120 mg/mL por diluciones. El uso de dosis muy altas resulta en la formación de una capa gelatinosa en la superficie de la unidad experimental, esta capa gelatinosa, impide la respiración de los nematodos y afecta la medición precisa de la actividad nematocida (Comunicación personal, Llumiquinga P, INIAP, 2023).

Puesto que el promedio de tiempo de muerte de los nematodos entre la dosis media baja (60 mg/mL) y baja (30 mg/mL) era significativamente distante, se optó por incluir una quinta dosis que se ubicaría entre las dos anteriores ya mencionadas. Los tratamientos evaluados fueron cinco dosificaciones de saponina: Alta (120 mg/mL), Media alta (90 mg/mL), Media (60 mg/mL), Media baja (45 mg/mL) y Baja (30 mg/mL).

Para la preparación de las dosificaciones del té de saponina, se utilizó un preparado de una solución madre conocida como solución stock, misma que se preparó mediante la dilución de las dosis de té de saponina en 20 mL de agua

destilada, para lo cual se pesó las dosis para 20 usos de 1 mL cada uno (Figura 5), Se utilizó agua destilada con el fin de garantizar una mayor pureza de la solución.



Figura 5. Pesaje de la saponina para la preparación de la solución stock.

Para añadir la dosificación de saponina a la unidad experimental, se toma 1 mL de solución stock, y se adiciona a 1 mL de agua resultando así en una relación 1:1. La concentración de saponina disminuye y para determinar la concentración final es preciso aplicar la ecuación de la dilución:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

V_1 : el volumen inicial de la solución stock o solución madre

C_1 es la concentración inicial de la solución stock

V_f es el volumen final de la solución diluida

C_f es la concentración final de la solución diluida.

Tabla 1. Tratamientos evaluados. Concentraciones presentes en la solución stock y después de la dilución tras la colocación en la unidad experimental

Dosis de té de saponina	Concentración stock mg/mL	Concentración diluida
Alta	120	60
Media alta	90	45
Media	60	30
Media baja	45	22.5
Baja	30	15

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la organización del experimento se utilizó un diseño completo al azar, en el cual se compararon los datos de recuento de nematodos al inicio y al final del tratamiento los datos serán analizados mediante estadística descriptiva. Previo al análisis ANOVA se realizó un análisis descriptivo exploratorio, con la finalidad de probar una hipótesis de prueba donde se analice el siguiente postulado: “A mayor la dosis del té de saponina, menor el tiempo de acción nematicida”, de esta manera es posible visualizar gráficamente el comportamiento de las dosificaciones alta y baja con respecto al tiempo de acción nematicida.

El análisis de varianza (ANOVA) determinó las diferencias significativas entre los tiempos de acción nematicida de cada tratamiento, y las pruebas pos hoc para determinar el mejor, dichos análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS. Con un nivel de significancia de 0.05. (Bhandari, 2021). Si el valor de la significancia es menor a 0.05, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, por ende, existe evidencia estadística que respalda la existencia de una diferencia significativa entre los grupos o variables que se están comparando y no es probable que haya ocurrido por azar (Kiernan, 2014).

Por último, se establecerá la DL50, la cual es la cantidad de la dosis de una sustancia (té de saponina) necesaria para matar a la mitad de un conjunto de organismos (fitonematodos) después de un tiempo determinado (Universidad de Granada, 2019). El cálculo de la DL50 (dosis letal 50) se realizó utilizando la ecuación de la recta obtenida a partir de los datos de porcentaje de actividad

nematicida y la dosis de saponina. En el eje X se representa el porcentaje de actividad nematicida, mientras que en el eje Y se representa la dosis de saponina (Figura 6). Se utilizó la ecuación de la recta para reemplazar el porcentaje de actividad del nematicida por 50 y se calculó la dosis de saponina correspondiente en el eje X. Este valor calculado representa la cantidad de saponina necesaria para que los cultivos evaluados tengan una actividad nematicida del 50%.

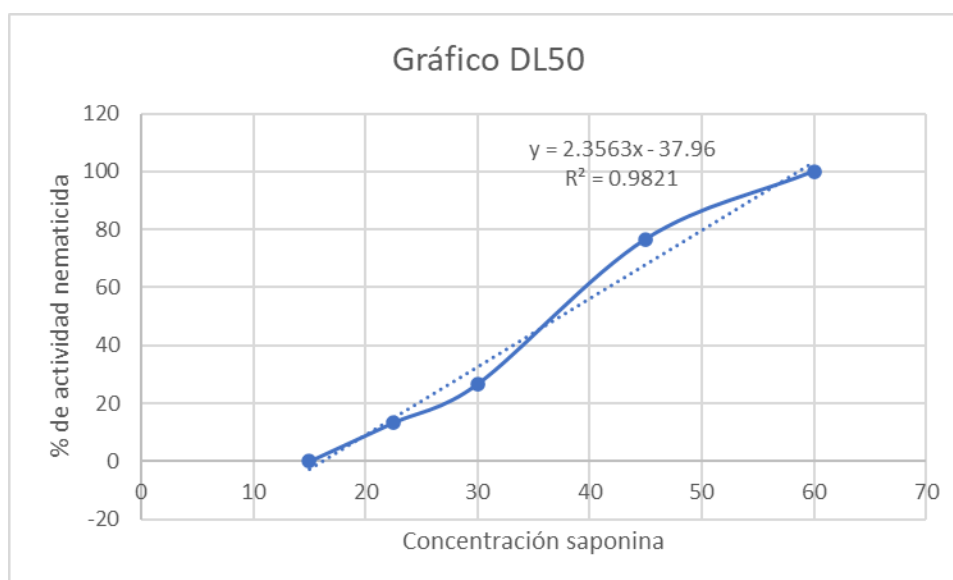


Figura 6. Recta de regresión lineal para calcular la dosis letal media (DL50).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación morfológica de nematodos *Meloidogyne*

Los nematodos machos adultos del género *Meloidogyne* se pueden identificar a través de características distintivas que incluyen la forma de la cola, el estilete y los nódulos. La cola es redondeada y cónica, el cuerpo es cilíndrico y alargado, el estilete es una estructura en forma de tubo ubicada en la parte anterior del cuerpo (Ferraz & Brown, 2002), los nematodos obtenidos a partir de los procesos de extracción descritos son consistentes con lo que describe Ferraz y Brown, (2002). Eisenback y Hirschmann (1981), hacen hincapié en la importancia de la observación de la cabeza y el estilete para la identificación del género *Meloidogyne*.



Figura 7. Cuerpo completo del nematodo macho *Meloidogyne*. Foto tomada con un microscopio invertido OLYMPUS IX53PIF, aumento 250 x.

Al momento de la observación del nematodo, Eisenback (2002) recomienda poner atención en cuatro características enfocadas a la identificación del género *Meloidogyne*. Indica que estos nematodos son largos y delgados, con un estilete difícil de distinguir, junto con una cola corta, ligeramente redonda y puntiforme. A su vez los nematodos de este género presentan un movimiento sinuoso bastante particular, dichas características van acorde con lo observado en la figura 7. Se necesita de análisis molecular o un especialista taxonómico para identificar la especie de los nematodos del género *Meloidogyne*.

5.1.1 Estructuras morfológicas en la cabeza del nematodo

En el estudio, se midieron las longitudes de los estiletes en ejemplares de *Meloidogyne*, los resultados mostraron que el estilete del nematodo tenía una longitud de 13.82 μm (Figura 8), estos hallazgos son consistentes con los datos reportados por Jaravas et al. (2003)



Figura 8. Cabeza nematodo *Meloidogyne* vivo. Medición del estilete 13.82 μm . Foto tomada con un microscopio invertido OLYMPUS IX53PIF, aumento 300 x.

Según Jaravas et al. (2003), el estudio anteriormente mencionado, se observó que *M. incognita* posee longitudes del estilete que oscilaban entre 10 μm y 14 μm , lo cual concuerda con las observaciones en la (Figura 8) y sugiere que se trata de un nematodo del género *Meloidogyne* spp. Otro indicador estudiado fue la existencia de los nódulos, las cuales son estructuras que se encuentran próximas al estilete de los nematodos *Meloidogyne* (Figura 9).

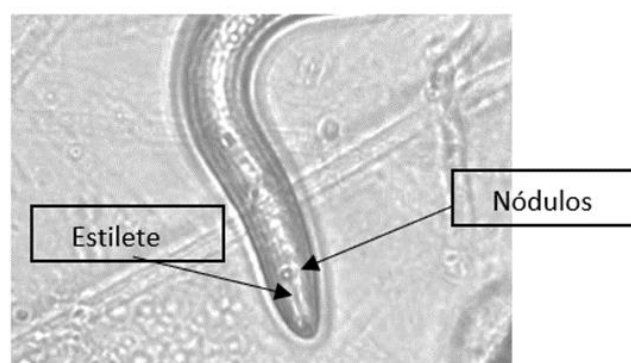


Figura 9. Cabeza del nematodo *Meloidogyne*. Se detalla la presencia de nódulos y estilete, foto tomada con un microscopio invertido OLYMPUS

IX53PIF, aumento 300 x.

Los nematodos *Meloidogyne* comparten características similares con otros nematodos fitoparásitos, y son los nódulos, que se encuentran presentes próximos al estilete, dichos nódulos se utilizan como indicativo de que se está observando a un nematodo fitopatógeno, tomando en cuenta otras características como la cola, longitud del estilete y forma del cuerpo, se puede identificar a un nematodo de este género.

5.1.2 Estructura de cola en el nematodo

Según Ferraz & Brown (2002), la cola es corta y ligeramente redondeada en la punta en los nematodos del género *Meloidogyne*, esta característica se encuentra relacionada a la capacidad de los nematodos a moverse a través del suelo y buscar plantas hospederas, dicha descripción concuerda con lo observado en el estero microscopio (Figura 10), donde se puede apreciar una estructura puntiforme y ligeramente redondeada en todos los especímenes observados.



Figura 10. Cola nematodo *Meloidogyne*. Se detalla la forma redondeada y puntiforme de la cola, foto tomada con un microscopio invertido OLYMPUS IX53PIF, aumento 300 x.

5.2 Resultados de actividad nematicida

En el presente estudio, el té de saponina utilizado, demostró ser un nematicida altamente efectivo en ensayos *in vitro*, para comprender en detalle la base de este éxito, es necesario examinar tanto las propiedades fundamentales de las saponinas. Durante la evaluación de los diferentes tratamientos de saponina, se observó que la dosis alta mostró un tiempo de acción nematicida de aproximadamente una hora (Anexo 1), mientras que la dosis más baja presentó un

tiempo de acción considerablemente más prolongado (Anexo 5), cercano a un día (Tabla 2).

Tabla 2. Promedio del tiempo de muerte de los nematodos, expresados en horas y en minutos.

Dosis de té de saponina	Promedio tiempo de muerte del 100% de nematodos	
	Horas	Minutos
Alta	1	61
Media alta	1: 12 min	72
Media	1: 42 min	102
Media baja	9	547
Baja	21	1260

Según Guzman y Carazo (2014), las saponinas se caracterizan por ser moléculas anfifílicas, estas moléculas presentan una porción hidrófila, con afinidad hacia el agua, y una porción hidrófoba, con repulsión hacia el agua, esta configuración les confiere la capacidad de interactuar selectivamente con los lípidos y grasas presentes en la superficie del nematodo ya que la parte hidrófila con cargas positivas pueden interactuar con las cargas negativas de la superficie del nematodo. Riddle et al. (1997) reporta que la superficie del nematodo es polianiónica, lo cual indica que presenta una carga negativa debido a la presencia de grupos fosfato cargados negativamente en su estructura superficial. Cuando las saponinas entran en contacto con la superficie polianiónica del nematodo, las cargas negativas presentes en la superficie y las propiedades hidrófilas de las saponinas dan lugar a interacciones electrostáticas (Nagpal & Gusain, 2022),.

Las saponinas afectan a la integridad de la superficie del nematodo al interactuar con los lípidos presentes en dicha superficie, lo que ocasiona su disrupción (Figura 11), Según Topalović et al., (2019), si la membrana se encuentra comprometida, el nematodo se verá expuesto a factores externos que imposibilitan su supervivencia ya que esta es su capa protectora en su entorno.

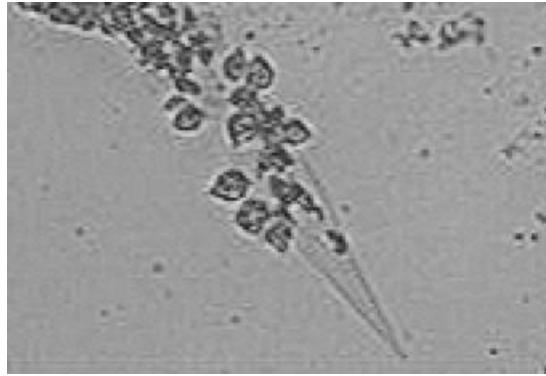


Figura 11. Cola del nematodo *Meloidogyne*. Se detalla la disrupción de la membrana.

Siddall (2004), coloca al filo *Nematoda* dentro del grupo de animales denominado *Pseudocoelomata* ya que los nematodos poseen un pseudoceloma, en los nematodos funciona como una cavidad que desempeña un papel en la circulación de nutrientes, la eliminación de desechos y la locomoción gracias fluido de la cavidad pseudocelómica. La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, (s.f.) asocia al fluido mencionado con el aparato respiratorio y circulatorio del nematodo, ya que al carecer de aparato circulatorio como tal, las funciones relacionadas con el transporte de nutrientes y oxígeno las realiza el fluido de la cavidad pseudocelómica.

La perforación de la superficie del nematodo resulta en la pérdida de componentes internos esenciales para su supervivencia, provocando la liberación del fluido de la cavidad pseudocelómica al entorno externo. La perforación de la superficie del nematodo resulta en la pérdida de componentes internos esenciales para su supervivencia, provocando la liberación del fluido de la cavidad pseudocelómica al entorno externo. El fluido pseudocelómico es vital, ya que proporciona nutrientes esenciales y moléculas clave para la digestión, metabolismo y regulación de diversos procesos biológicos. La disminución en la disponibilidad de este fluido debilita significativamente al nematodo, afectando sus capacidades relacionadas con la alimentación, reproducción y supervivencia en general.

5.3 Análisis estadístico

5.3.1 Análisis descriptivo exploratorio.

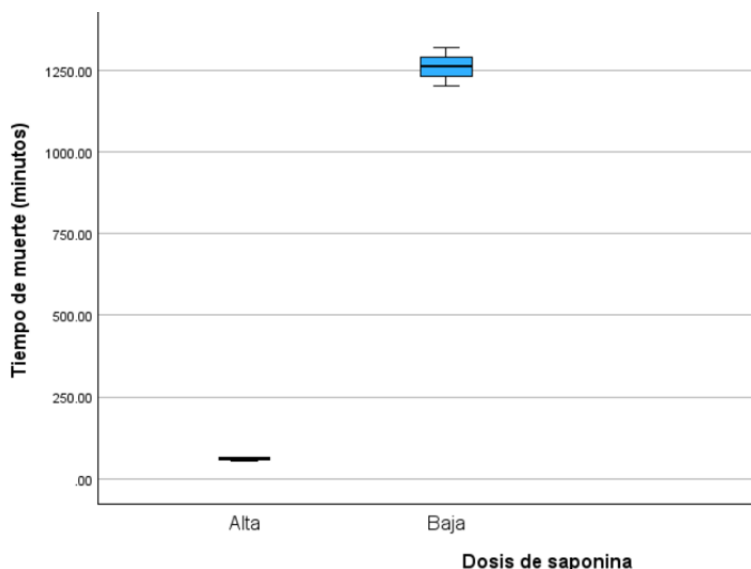


Figura 12. Diagrama de caja obtenido en SPSS. Se detalla relación entre el tiempo de muerte de los nematodos en minutos y la dosis de saponina.

El análisis descriptivo exploratorio reveló que el tiempo de acción nematocida es menor en las dosis altas de té de saponina, indicativo de que la dosis alta tiene un efecto más rápido y eficiente en la mortalidad de los nematodos. Se observó que el tiempo de acción nematocida es mayor en la dosis baja de té de saponina. Aunque haya mayor tiempo de acción nematocida completa en los tratamientos de la dosis baja, la efectividad de la saponina es buena a pesar del mayor tiempo empleado. Este ensayo corrobora la importancia de tomar en cuenta tanto la dosis como el tiempo de acción al evaluar la efectividad de la saponina como nematocida en cultivos *in vitro*.

5.3.2 ANOVA

El valor de significación obtenido en el ANOVA (Tabla 3), indica que es menor a 0.05, lo que permite rechazar la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. La hipótesis alternativa dicta que al menos uno de los tratamientos tiene

un efecto significativo sobre los tiempos de muerte de los nematodos, y la diferencia observada no se debe al azar o al error experimental (Kiernan, 2014).

Tabla 3. Esquema de ANOVA del tiempo de muerte (minutos) obtenida en SPSS.

	Suma de cuadrados	de gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	3214851.733	4	803712.933	994.448	<.001
Dentro grupos	8082.000	10	808.200		
Total	3222933.733	14			

5.3.3 Prueba pos hoc de Tukey

El valor de la significancia obtenido en la prueba que engloba a la dosis alta, media alta y media es mayor a 0.05 (Tabla 4), se acepta la hipótesis nula, que dicta que no hay diferencias significativas dentro de los tiempos de muerte de los nematodos. Se pudo observar, estadísticamente que la dosis media tiene un tiempo de acción nematocida que tiene la posibilidad de ser similar con la dosis alta y media alta. La dosis alta es la mejor y la baja la peor, en cuanto al tiempo de acción de la saponina.

Tabla 4. Prueba de Tukey HSD. Tiempo de muerte (minutos) obtenida en SPSS.

Dosis de saponina	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	
Alta	3	61.3333			a
Media alta	3	72.3333			a
Media	3	102.0000			a
Media baja	3		546.6667		b
Baja	3			1260.0000	c
Sig.		0.448	1.000	1.000	

La media de los grupos en subconjuntos homogéneos se muestra.

a. Utiliza el tamaño de muestra de la media armónica = 3.000.

Medias con letra similar son significativamente iguales ($p > 0,05$)

En el presente estudio, se empleó la prueba post hoc de Tukey para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias

de los diferentes tratamientos evaluados. La prueba de Tukey, ampliamente utilizada en estudios de comparación múltiple, permitió identificar y distinguir los grupos que presentaron diferencias significativas en relación con los tratamientos de saponina administrados. Siguiendo los principios de significancia estadística, la prueba pos hoc indicó la presencia de diferencias significativas entre los grupos comparados. Esta metodología, aplicada previamente por Klaus y Noss (2016) en un estudio de restauración de humedales, fue utilizada de manera análoga en este estudio para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos de saponina.

5.3.4 Dosis letal 50 (DL50)

Se utilizaron datos del porcentaje de actividad nematocida (Tabla 5), ya que todos los tratamientos resultan en una mortalidad total, pueden complicar la determinación precisa de la DL50 porque no es posible afirmar que algún tratamiento sea ineficaz en términos de porcentaje de mortalidad. Considerando que la DL50 se utiliza para medir el potencial de envenenamiento de organismos o en este caso, el efecto nematocida a corto plazo (Gessler, 2010) , es apropiado tomar como referencia el tiempo más corto en el cual se observó un efecto nematocida total.

Tabla 5. Porcentaje de mortalidad de nematodos. Actividad nematocida en la primera hora de tratamiento

Concentración saponina mg/mL	R1	R2	R3	PROM.(%)
15	0	0	0	0
22.5	10	10	20	13
30	30	10	40	27
45	80	70	80	77
60	100	100	100	100

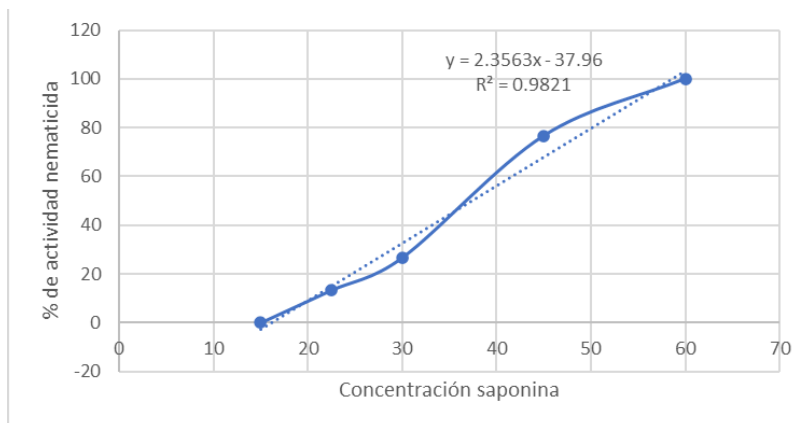


Figura 13. Recta de regresión lineal de Dosis Letal media (DL50). Relación entre % actividad nematocida y concentración de saponina, ecuación de la recta ($y = 2.3563x - 37.96$)

La dosis más alta logró un 100% de actividad nematocida en la primera hora de aplicado el tratamiento mientras que la dosis más baja no mostró actividad nematocida.

Las diferencias en el porcentaje de nematodos muertos durante el primer intervalo de tiempo permiten estimar la DL50 después de una hora de tratamiento con saponina. Al realizar un enfoque en el tiempo más corto de exposición y al encontrar una dosis letal del 50% durante ese período, obtenemos una indicación de la eficacia de la saponina como nematocida a corto plazo, cabe destacar que la alta mortalidad en todos los tratamientos puede limitar la precisión del estimado de la DL50.

Para realizar el cálculo de la DL50, se reemplazó el valor de y en la ecuación de la recta por 50 (Figura 13). Para obtener la concentración de saponina correspondiente a la DL50 de 37 mg/mL, que representa la dosis necesaria para lograr el 50% de la actividad nematocida después de que el tratamiento haya actuado por una hora.

6. CONCLUSIONES

1. El té de saponina ha demostrado ser una opción viable y eficaz para el control de nematodos en cultivos *in vitro*, todos los tratamientos demostraron ser efectivos, pero presentan diferencias en los tiempos para lograr una acción nematicida completa.
2. Las características enfocadas a la identificación del género *Meloidogyne*, el cuerpo (alargado y delgado), el estilete, los nódulos y la cola corta, ligeramente redonda y puntiforme, son suficientes para la identificación del género de estos organismos.
3. La prueba de comparación múltiple de Tukey reveló que los tratamientos de dosis media, media alta y alta no presentaron diferencias significativas entre sí en términos de su efecto nematicida, estos resultados sugieren que la dosis media del té de saponina tiene el potencial de lograr una efectividad comparable a las dosis altas, lo que podría ser beneficioso en términos económicos.
4. La DL50 del té de saponina de *Camellia japonica* para el control de nematodos en cultivos *in vitro* fue 37 mg/mL, ya que, elimina al 50% de los nematodos en una hora, estos resultados indican la alta eficacia nematicida de la saponina y respaldan su potencial uso como una opción efectiva y rápida para el control de nematodos.
5. Para conocer los efectos de la efectividad del té de saponina como alternativa para el control de nematodos, se recomienda realizar estudios en campo para evaluar el comportamiento del compuesto ante factores externos como temperatura, humedad, luminosidad, entre otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benítez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico . In *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas* (Vol. 45, pp. 438–469). scieloco .
- Coyne, D. L., Nicol, J. M., Traducción, C.-C., & Verdejo-Lucas, S. (n.d.). *Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio*. Retrieved December 1, 2022, from www.iita.org
- Denys Chica. (2018). Manejo agronómico del cultivo de piña (*Ananas comosus*), variedad MD2 en el Ecuador. *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO*.
- Eisenback, J. (2002). *Identification Guides for the Most Common Genera of Plant-Parasitic Nematodes*.
- Ferraz, L., & Brown, D. (2002). *An Introduction to Nematodes: Plant Nematology*.
- Guzman, A. H., & Carazo, V. J. H. (2014). *Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala*.
- Eisenback, J. & Hirschmann, H. (1981). *Identification of meloidogyne species on the basis of head shape and, stylet morphology of the male*. *Journal of nematology*.
- Jaravas, N., Triviño, Z., & Suarez, I. (2003). *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood 1949 y *Meloidogyne arenaria* (Neal 1889) Chitwood 1949: Nematodos de las nudosidades radiculares en Guayaba (*Psidium guajava* L.) c.v manzana en Montería, Córdoba. *Temas Agrarios*, 8, 15. <https://doi.org/10.21897/rta.v8i2.615>
- Jumbo, B. (2022, February 10). *La exportación de piña ecuatoriana superó el nivel de los últimos 5 años* . *Revista Líderes*. <https://www.revistalideres.ec/lideres/exportacion-pina-ecuatoriana-crecimiento-mercados.html>

- Kiernan, D. (2014). *Chapter 5: One-Way Analysis of Variance*. Open SUNY Textbooks.
- Klaus, J., & Noss, R. (2016). Specialist and generalist amphibians respond to wetland restoration treatments: Amphibian Response to Fire. *The Journal of Wildlife Management*, 80. <https://doi.org/10.1002/jwmg.21091>
- Nagpal, R., & Gusain, M. (2022). Chapter 25 - Synthesis methods of quantum dots. In Y. B. T.-G. Al-Douri Nanotubes and Quantum Dots-Based Nanotechnology (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials* (pp. 599–630). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85457-3.00006-2>
- National pesticide center. (2012). *Pesticidas: ¿Cuál es mi riesgo?*
- National pesticide information. (2018). *Pesticidas y el medio ambiente*.
- Prado., J. (2021). Informe Mensual. *Boletín de Cifras, Julio*(Julio), 25.
- Salazar-Antón, W., & Guzmán-Hernández, T. de J. (2013). Efecto de poblaciones de *Meloidogyne* sp. en el desarrollo y rendimiento del tomate . In *Agronomía Mesoamericana* (Vol. 24, pp. 419–426). scielo .
- Senasica. (2020). Manual de técnicas de preservación de nematodos fitopatogenos. *Senasica, Agricultura Sana Para El Bienesta*.
- Siddall, M. E. (2004). Invertebrates.—R.C. Brusca and G. J. Brusca. 2003. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. xix + 936 pp. ISBN 0–87893–097–3. \$109.95(cloth). *Systematic Biology*, 53(4), 664–666. <https://doi.org/10.1080/10635150490472968>
- Solis, V. J. N. (2017). “El plaguicida orgánico de los residuos del lavado de la quinua (*Chenopodium quinoa*) y los nemátodos en cultivo en papas (*Solanum tuberosum*) en el cantón Quero. *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO*.
- Steve, G. (2010). Advanced Placement Environmental Science APES Smithtown High School East Advanced Placement Environmental Science APES Smithtown High School East. *Advanced Placement Environmental Science APES 2010*, 1–2.

- Topalović, O., Elhady, A., Hallmann, J., Richert-Pöggeler, K. R., & Heuer, H. (2019). Bacteria isolated from the cuticle of plant-parasitic nematodes attached to and antagonized the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Scientific Reports*, 9(1), 11477. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47942-7>
- Universidad de granada. (2019). *Concepto, Historia y alcance de la Toxicología*. Toxicología. <https://www.ugr.es/~ajerez/proyecto/t2-13.htm#:~:text=La DL50 se obtiene trazando,que corresponde a la DL50>.
- Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. (n.d.). Lección 16. Nematodos. Generalidades y Clasificación. Orden Rhabditida. *Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*.
- Vera Obando, N. Y., Maicelo Quintana, J. L., Heredia, E. G., & Oliva Cruz, S. M. (2017). Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de piña (*Ananas comosus*) en Amazonas, Perú . In *Scientia Agropecuaria* (Vol. 8, pp. 79–84). scielo .

8. ANEXOS

Anexo 1. Datos de las mediciones de la dosis alta de saponina.

Dosis	Repetición	Tiempo	Muertos
Alta	1	30 min	1
Alta	1	40 min	4
Alta	1	50 min	7
Alta	1	54 min	10
Alta	2	30 min	2
Alta	2	40 min	3
Alta	2	50 min	6
Alta	2	64 min	10
Alta	3	30 min	2
Alta	3	40 min	4
Alta	3	50 min	7
Alta	3	66 min	10

Anexo 2. Datos de las mediciones de la dosis media alta de saponina.

Dosis	Repetición	Tiempo	Muertos
Media Alta	1	30 min	2
Media Alta	1	40 min	3
Media Alta	1	50 min	6
Media Alta	1	60 min	8
Media Alta	1	75 min	10
Media Alta	2	30 min	3
Media Alta	2	40 min	3
Media Alta	2	50 min	4
Media Alta	2	60 min	7
Media Alta	2	71 min	10
Media Alta	3	30 min	2
Media Alta	3	40 min	3
Media Alta	3	50 min	5
Media Alta	3	60 min	8
Media Alta	3	70 min	10

Anexo 3 . Datos de las mediciones de la dosis media de saponina.

Dosis	Repetición	Tiempo	Muertos
Media	1	30 min	0
Media	1	40 min	1
Media	1	50 min	1
Media	1	60 min	3
Media	1	70 min	5
Media	1	80 min	7
Media	1	90 min	7
Media	1	102 min	10
Media	2	30 min	0
Media	2	40 min	1
Media	2	50 min	1
Media	2	60 min	1
Media	2	70 min	3
Media	2	80 min	5
Media	2	90 min	8
Media	2	108 min	10
Media	3	30 min	1
Media	3	40 min	2
Media	3	50 min	2
Media	3	60 min	4
Media	3	70 min	6
Media	3	80 min	8
Media	3	96 min	10

Anexo 6 . Datos de las mediciones de la dosis media baja de saponina.

Dosis	Repetición	Tiempo	Muertos
Media Baja	1	30 min	0
Media Baja	1	1 hr	1
Media Baja	1	2 hrs	2
Media Baja	1	3 hrs	2
Media Baja	1	4 hrs	5
Media Baja	1	5 hrs	6
Media Baja	1	6 hrs	6
Media Baja	1	7 hrs	6
Media Baja	1	8 hrs	7
Media Baja	1	9:15 hrs	10
Media Baja	2	30 min	0
Media Baja	2	1 hr	1
Media Baja	2	2 hrs	3
Media Baja	2	3 hrs	3
Media Baja	2	4 hrs	4

Media Baja	2	5 hrs	4
Media Baja	2	6 hrs	5
Media Baja	2	7 hrs	5
Media Baja	2	8 hrs	6
Media Baja	2	9:20 hrs	10
Media Baja	3	30 min	0
Media Baja	3	1 hr	2
Media Baja	3	2 hrs	2
Media Baja	3	3 hrs	4
Media Baja	3	4 hrs	5
Media Baja	3	5 hrs	5
Media Baja	3	6 hrs	7
Media Baja	3	7 hrs	7
Media Baja	3	8 hrs	8
Media Baja	3	8:45 hrs	10

Anexo 5 . Datos de las mediciones de la dosis media baja de saponina.

Dosis	Repetición	Tiempo	Muertos
Baja	1	30 min	0
Baja	1	1 hr	0
Baja	1	2 hrs	0
Baja	1	4 hrs	2
Baja	1	8 hrs	6
Baja	1	16 hrs	8
Baja	1	20:15 hrs	10
Baja	2	30 min	0
Baja	2	1 hr	0
Baja	2	2 hrs	1
Baja	2	4 hrs	3
Baja	2	8 hrs	5
Baja	2	16 hrs	9
Baja	2	22:30 hrs	10
Baja	3	30 min	0
Baja	3	1 hr	0
Baja	3	2 hrs	0
Baja	3	4 hrs	2
Baja	3	8 hrs	6
Baja	3	16 hrs	8
Baja	3	21 hrs	10

