

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



EVALUACIÓN IN VITRO DE TRES EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE *Phytophthora infestans* y *Puccinia pittieriana* EN PAPA (*Solanum tuberosum*)

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA

GEOVANNA LISSETH MANOBANDA PILAMUNGA

TUTOR:


ING. AGR. JOSÉ HERNÁN ZURITA VASQUEZ, Mg.

CEVALLOS – ECUADOR

2019

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La suscrita, GEOVANNA LISSETH MANOBANDA PILAMUNGA, portadora de cédula de identidad número: 1804714317-7, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EVALUACIÓN IN VITRO DE TRES EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE *Phytophthora infestans* y *Puccinia pittieriana* EN PAPA (*Solanum tuberosum*)” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mí sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.




GEOVANNA LISSETH MANOBANDA PILAMUNGA

DERECHOS DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: “EVALUACIÓN IN VITRO DE TRES EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE *Phytophthora infestans* y *Puccinia pittieriana* EN PAPA (*Solanum tuberosum*)” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de Ingeniera Agrónoma, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

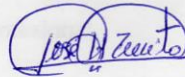
Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



GEOVANNA LISSETH MANOBANDA PILAMUNGA

“EVALUACIÓN IN VITRO DE TRES EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE *Phytophthora infestans* y *Puccinia pittieriana* EN PAPA (*Solanum tuberosum*)”

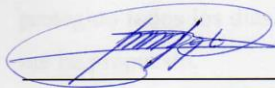
REVISADO POR:



Ing. Mg. Hernán Zurita

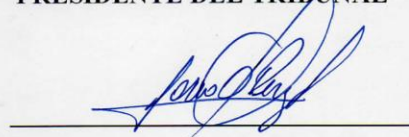
TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN



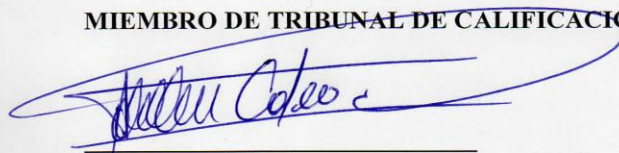
Ing. Mg. Giovanni Velástegui.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ing. Mg. Marco Pérez.

MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Dr. William Calero Cáceres, PHD

MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

FECHA

28/01/2020

28/01/2020

28/01/2020.

DEDICATORIA

A dios por dame la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi vida, mi formación profesional.

A mi motor y motivo de vida, Mi madre por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional, porque gracias a su valentía y esfuerzo soy quien soy.

A Jonh Jairo, mi hermano, mi compañero y amigo de vida, por su lealtad, su amor y su confianza.

A mí ser dé luz, Mi padre porque estoy segura que desde el cielo me ha cuidado y protegido todos los días. Porque me ha dado la fuerza suficiente para lograr todo lo que me he propuesto.

A toda mi familia por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica De Ambato, y de manera especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por haberme dado la oportunidad de enriquecerme en conocimientos mismo que ahora son fortalezas en mi vida profesional.

A mi tutor de tesis, el Ing. Hernán Zurita por haberme guiado en la elaboración de este trabajo de titulación, porque gracias a sus conocimientos, experiencia y paciencia hoy puedo concluir mis estudios con éxito. Quiero también agradecer a la Doc. Marcia Buenaño, al Ing. Jorge Toapanta quienes me brindaron todo su apoyo, depositando su confianza en mí, para trabajar en el Laboratorio y llevar a cabo este trabajo.

A los Profesores con quienes he compartido en el transcurso de estos años de formación profesional, gracias por sus enseñanzas y conocimientos, mismos que me servirán para el transcurso de mi vida como Ingeniería Agrónoma.

A mis amigas, que se han convertido en hermanas en este transcurso de mi vida universitaria Jenny, Jessy y en especial Mi Jane por apoyarme cuando más lo necesito por su lealtad y cariño sincero. A una persona especial quien me ha brindado cariño y apoyo, impulsándome a ser mejor cada día.

A mis amigos, con quienes hemos compartido desde el primer día de vida universitaria y a unos cuantos que se sumaron en el transcurso de ella.

GRACIAS!!. Gracias infinitas a todos quienes contribuyeron con un granito de arena para culminar con éxito mi meta propuesta.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II.....	2
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	3
2.2. CATEGORIAS FUNDAMENTALES.....	8
2.2.1. Importancia del cultivo de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	8
2.2.2. <i>Phytophthora infestans</i>	9
2.2.2.1. Taxonomía.....	10
2.2.2.2. Ciclo de vida.....	10
2.2.2.3. Micelio.....	12
2.2.2.4. Epidemiología.....	12
2.2.2.5. Sintomatología.....	13
3.2.3. <i>Puccinia pittieriana</i>	14
3.2.3.1. Taxonomía.....	15
3.2.3.2. Biología.....	15
3.2.3.3. Forma de propagación.....	16
3.2.3.4. Sintomatología.....	17
3.2.4. Extractos vegetales.....	17
3.2.5. Cabuya blanca (<i>Furcraea andina</i>).....	18
3.2.6. Cabuya negra (<i>Agave americana</i>).....	19
3.2.7. Ashpa quinua (<i>Chenopodium álbum.</i>).....	19
3.2.8. METABOLITOS SECUNDARIOS.....	20
CAPÍTULO III.....	22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
3.1. HIPÓTESIS.....	22
3.2. OBJETIVOS.....	22
3.2.1. Objetivo general.....	22
3.2.2. Objetivos específicos.....	22
CAPÍTULO IV.....	23

MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO (ENSAYO)	23
4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR	23
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES	24
4.3.1. Equipos	24
4.3.2. Materiales.....	24
4.4. FACTORES EN ESTUDIO	26
4.4.1. Extractos vegetales	26
4.4.2. Dosis	26
4.4.3. Enfermedades.....	26
4.5. TRATAMIENTOS	27
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
4.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO	29
4.7.1. Preparación de extractos de plantas	29
4.7.2. Reproducción de los hongos fitopatogenos	29
4.7.3. Siembra de hongos fitopatógenos	30
4.8. VARIABLE RESPUESTA	31
4.8.1. Crecimiento de los hongos en el medio de cultivo	31
4.8.2. Determinación del porcentaje de inhibición	31
4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1. Crecimiento miceliar de los hongos fitopatogenos (<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Puccinia pittieriana</i>).....	32
5.2. Porcentaje de inhibición de los hongos fitopatogenos (<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Puccinia pittieriana</i>).....	35
CAPÍTULO VI.....	38
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	38
6.1. CONCLUSIONES.....	38
6.2. BIBLIOGRAFÍA.....	39
6.3. ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tratamientos investigados.....	27
Tabla 2 Concentraciones para preparar los medios de cultivo.....	30
Tabla 3 Crecimiento miceliar de <i>Phytophthora infestans</i>	33
Tabla 4 Crecimiento miceliar de <i>Puccinia pittieriana</i>	34
Tabla 5: Porcentaje de inhibición de <i>Phytophthora infestans</i>	36
Tabla 6: Porcentaje de inhibición de <i>Puccinia pittieriana</i>	37

RESÚMEN

La investigación se llevó a cabo los Laboratorios de Suelos de Servicio al Público y de Microbiología agrícola y ambiental perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, situada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, a una distancia 20 km al sur de Ambato, con una altitud de 2850 msnm, con el propósito evaluar in vitro el efecto de tres extractos vegetales de ashpa quinua (*Chenopodium álbum*), cabuya negra (*Agave americana*) y cabuya blanca (*Furcraea andina*) para el control de *Phytophthora infestans* y *Puccinia pittieriana* en papa (*Solanum tuberosum*) en dosis del 0%, 0.5%, 1%, 2% y 4% (p/v).

Para la evaluación se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), donde se incluyeron treinta tratamientos y dos testigos comerciales para cada enfermedad, con cuatro repeticiones, se efectuó el análisis PROBIT y se realizaron las pruebas de significación de Tukey al 5%, donde se obtuvieron los siguientes resultados: para la variable de crecimiento de los hongos en el medio de cultivo el extracto más efectivo fue de ashpa quinua al 1% en el control *P. infestans*, presentando un menor crecimiento miceliar de 2.73 cm, mientras que el testigo comercial (metalaxil) reporta un crecimiento miceliar de 2,45 cm y para el control de *P. pittieriana* el extracto de cabuya negra al 4% mostrando un crecimiento miceliar de 1.30 cm, y el testigo comercial (oxicarboxin 75%) obtiene un crecimiento de 0.93 cm. En la variable de determinación del porcentaje de inhibición del extracto de ashpa quinua al 1% presentó inhibición del 92.25 % y el testigo comercial 100%, para *P. pittieriana* el porcentaje de inhibición se vio influenciado por los extractos de Ashpa quinua con 86,25% y cabuya negra con el 82,75% respectivamente, mientras que el testigo comercial reportó 100% de inhibición. Los datos fueron tomados durante 168 horas, en intervalos de 24 horas, para registrar el crecimiento miceliar se midió a lo largo de una línea a partir del halo de crecimiento del microorganismo. Debido a los resultados obtenidos la utilización de extractos vegetales ofrece una alternativa para el control biológico de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de papa.

PALABRAS CLAVES: Crecimiento miceliar, Dosis, Extractos vegetales, inhibición

SUMMARY

The research was carried out in the Soil Laboratories of Public Service and Agricultural and Environmental Microbiology belonging to the Technical University of Ambato, Faculty of Agricultural Sciences, located in the Cevallos canton, Tungurahua province, at a distance 20 km south Ambato, with an altitude of 2850 meters above sea level, with the purpose of evaluating in vitro the effect of three plant extracts of ashpa quinoa (*Chenopodium album*), black cabuya (*Agave americana*) and white cabuya (*Furcraea andean*) for the control of *Phytophthora infestans* and Potato *Puccinia pittieriana* (*Solanum tuberosum*) in doses of 0%, 0.5%, 1%, 2% and 4% (p / v).

For the evaluation a completely randomized design (DCA) was applied, where thirty treatments and two commercial controls were included for each disease, with four repetitions, the PROBIT analysis was performed and the 5% Tukey significance tests were performed, where the following results were obtained: for the fungal growth variable in the culture medium, the most effective extract was 1% ashpa quinoa in the *P. infestans* control, presenting a lower mycelial growth of 2.73 cm, while the control commercial (metalaxyl) reports a 2.45 cm mycelial growth and for the control of *P. pittieriana* the 4% black cabochon extract showing a 1.30 cm mycelial growth, and the commercial control (75% oxycarboxin) obtains a growth of 0.93 cm In the variable of determination of the percentage of inhibition of the extract of ashpa quinoa 1% presented inhibition of 92.25% and the commercial control 100%, for *P. pittieriana* the percentage of inhibition was influenced by the extracts of Ashpa quinoa with 86.25 % and black cabuya with 82.75% respectively, while the commercial witness reported 100% inhibition. Data were taken for 168 hours, at 24-hour intervals, to record the mycelial growth was measured along a line from the growth halo of the microorganism. Due to the results obtained, the use of plant extracts offers an alternative for the biological control of phytopathogenic fungi that cause potato diseases.

KEY WORDS: Mycelial growth, Dose, Plant extracts, Inhibition.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum L.*), constituye uno de los rubros más significativos a nivel de Ecuador, su importancia radica en ser una fuente de alimentación diaria así como de ingresos económicos para las familias campesinas, este cultivo se establece en alturas comprendidas entre 2700 a 3400 msnm a lo largo del callejón interandino dentro de las provincias mayormente productoras están, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua (Bolaños 2015). Sin embargo este cultivo es muy susceptible a contraer enfermedades, afectando de esta manera al rendimiento y calidad del producto por ende ocasionando grandes pérdidas económicas, razón por la cual se han realizado programas de investigación para conocer los diversos factores limitantes de la producción, generando soluciones para llevar un manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo de papa (Pumishacho y Sherwood 2002).

Dentro de las enfermedades más importantes que ataca al cultivo está el denominado tizón tardío ocasionado por *Phytophthora infestans*, considerada una de las enfermedades más devastadoras de la papa a nivel mundial, cuyos síntomas se manifiestan mediante lesiones necróticas a nivel de hojas y tallos, ocasionado la muerte de los tejidos y atacando también a los tubérculos puesto que en condiciones de humedad los esporangios presentes en hojas y tallos se trasladan hacia el suelo para infectar los tubérculos. El patógeno sobrevive en forma de micelio ya sea en tubérculos, plantas voluntarias, tubérculo semillas para posteriormente infectar al cultivo (Pérez y Forbes 2008). Roya (*Puccinia pittieriana*), presenta hendiduras cloróticas en el haz de los folíolos y en el envés aparecen pústulas de color marrón rojizo afectando a todas las variedades de papas, la humedad relativa y la luz influyen para el desarrollo de la enfermedad, misma que tiene importancia económica en la zona papera de Ambato (Torres 2002).

García et al. (2017) menciona que a causa de estas pérdidas se ha implantado el control químico de manera excesiva, sin tomar en cuenta los efectos de residualidad, contaminando agua, suelo, plantas, animales y seres humanos. Carreño et al. (2007) proponen mecanismos de control biológico al uso indiscriminado de fungicidas razón por la cual se busca alternativas ecológicas mediante el control botánico que consiste en el uso de extracto o subproductos de origen vegetal favorables para la inhibición en el desarrollo del patógeno mostrando una reducción en la severidad de la enfermedad.

En la actualidad el control de hongos fitopatógenos necesita de la aplicación de técnicas alternativas, pues el manejo tradicional con agroquímicos sintéticos ha generado que el patógeno presente resistencia al ingrediente activo como respuesta a la aplicación de las altas dosis y aplicaciones continuas, ocasionando grandiosas pérdidas económicas (Guerrero et al. 2007). Dentro del marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa el uso de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades, cuyas ventajas radican en su bajo costo, no ser contaminantes del ambiente y sobre todo su efectividad, estudios realizados demuestran que los compuestos vegetales poseen propiedades fungicidas, insecticidas, nematocidas, bactericidas y repelentes, debido a la presencia de metabolitos secundarios, estas plantas presentan estrategias de defensa contra patógenos. Por otra parte dentro del uso de extractos vegetales así como residuos de ciertas plantas han mostrado un efecto inhibitorio sobre otras especies dando paso a una actividad alelopática, consiguiendo bajar la dependencia de los productos de síntesis química, logrando una mayor calidad en los alimentos agrícolas (Celis et al. 2009)

Abushaala1 et al. (2017) señalan que la aplicación de extractos de plantas inhibe el crecimiento de patógenos, ya que dentro de su composición bioquímica contienen metabolitos que muestran efectos antifúngicos. Para la elaboración de productos naturales que sean eficientes y estables se han realizado estudios probado formulaciones botánicas comerciales, en conjunto con extractos vegetales y con microorganismos de control biológico para estudiar las interacciones. Se ha demostrado también, la capacidad de algunos extractos vegetales en la inducción de síntesis de enzimas propias de la planta huésped y fortalecer así su respuesta defensiva ante el ataque de patógenos (Villa et al. 2014).

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Martínez et al. (2010) en su investigación titulada “Actividad antifungica in vitro de extractos polares de plantas del genero *baccharis* sobre fitopatógenos” demostraron que *Baccharis latifolia* presenta una actividad inhibitoria frente a dos fitopatógenos *Aspegillus niger* y *Phytophthora palmivora*, Se puede considerar en especial el extracto etanólico BLE a 20 mg/mL que inhibe a los dos hongos en un 65,8% y 98,8% respectivamente, por otro lado, *Baccharis genistelloides* (50 mg/mL) presenta inhibición alrededor del 50% solamente frente a *Aspergillus niger*, señalando así que los extractos tienen un gran potencial como controladores de hongos fitopatógenos, ya que las plantas, en su evolución han desarrollado mecanismos de defensa contra insectos, hongos, bacterias y otros organismos nocivos y los metabolitos secundarios producidos por ellas constituyen una de esas barreras.

Álvarez et al. (2011) evaluaron tratamientos alternativos para el manejo de tizón tardío de la papa causado por *Phytophthora infestans*, se estudió la respuesta de sensibilidad in vitro del patógeno al bioinsumo de fique (*Furcraea gigantea Vent*), comparándolo con los productos comerciales Ridomil- Gold y Curzate, con concentraciones de 10, 100, 1.000, 10.000, 100.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ adicionadas la medio de cultivo. La sensibilidad del patógeno se determinó por medio del crecimiento radial de las colonias de *P. infestans*, utilizando discos de micelio de 1,1 cm de diámetro del patógeno, y colocados en cajas Petri, cada unidad experimental tuvo un periodo de incubación de 8 días a una temperatura promedio de 18 °C. El efecto del bioinsumo permitió demostrar que al enmendar el medio de cultivo con 75.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración de *Furcraea gigantea vent* inhibe totalmente el crecimiento micelial de *P. infestans* in vitro. Se caracterizó fisicoquímicamente al jugo

de fique, determinado la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides y saponinas.

Solarte y Osorio (2014) en el artículo titulado “Evaluación de la concentración del jugo de fique (*Furcraea spp*) para el control in vitro de *Phytophthora infestans* en plantas de papas (*Solanum tuberosum L*)” determinaron el contenido final de sapogeninas (hecogenina o tigogenina) componentes que habían sido reportados como potenciales inhibidores de hongos patógenos y en particular de *Phytophthora Infestans*. La sensibilidad del patógeno *Phytophthora infestans* in vitro se determinó por medio del crecimiento radial de las colonias de *P. infestans*, para esto se usaron discos de micelio de 1,2 cm de diámetro del patógeno y fueron establecidos en cajas Petri con los diferentes tratamientos. La temperatura y el tiempo son factores que influyen directamente en la concentración del jugo de fique y para la evaluación se realizaron un análisis de varianza a los resultados encontrándose que el tratamiento C1 (90°C x 120 min) presenta la mejor combinación para lograr un grado de inhibición del patógeno de 100%. Se concluye que el jugo de fique por su poder anti fúngico se convierte en una alternativa altamente viable para el control de la gota en la papa *Phytophthora Infestans*.

Valero et al. (2014) evaluaron el efecto inhibitorio de extractos acuosos de hojas de gobernadora (*Larrea tridentata*), hojasesn (*Flourensia cernua*) y encino (*Quercus pungens*), sobre el crecimiento del micelio in vitro de cinco hongos fitopatógenos (*Phytophthora capsici*, *Botrytis sp.*, *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus* y *Rhizopus sp.*). Se realizaron extractos acuosos de las hojas secas de las tres especies de plantas a dos concentraciones diferentes (10% y 20%). Los extractos se añadieron a cajas Petri para formar un medio de cultivo extracto-Papa Dextrosa Agar (PDA). El crecimiento del micelio de cada uno de los hongos fitopatógenos se registró a cuatro tiempos diferentes (24 h, 48 h, 72 h y 96 h). El extracto más eficiente para controlar los cinco tipos de fitopatógenos fue el de *F. cernua*, ya que presentó un alto porcentaje de inhibición. El

fitopatógeno más afectado por los tres tipos de extractos fue *P. capsici*, pues no presentó crecimiento en los tratamientos.

Bernal et al. (2016) investigaron la actividad antifúngica de extractos acuosos de *Spathodea campanulata Beauv* como alternativa viable para el control de la roya del frijol, para ello, evaluaron el efecto de la aplicación de los extractos acuosos de hojas y flores al 5 y 10 % sobre la enfermedad roya del frijol. Las evaluaciones consistieron en determinar la intensidad de la infección y distribución de la roya en cada tratamiento, así como su efecto sobre las variables cuantitativas número de pústulas/hojas, diámetro de las pústulas y el rendimiento agrícola. Los mejores tratamientos para el control de la roya fueron los extractos acuosos de hojas y flores de *S. campanulata* a la concentración de 10 %, mostrando actividad antifúngica.

Gamboa et al. (2002) investigaron el efecto de los extractos vegetales metanólicos extrayendo la resina de Hojasén (*Flourensia cernua*), Mejorana (*Origanum majorana*) y Trompetilla (*Bouvardia ternifolia*), para evaluar en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* in vitro. Para cada patógeno, se incluyó el respectivo testigo químico en la dosis recomendada (tolclofos-metil y metalaxil). Los tres extractos mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *R. solani*. Para *P. infestans*, solamente el extracto de *O. majorana* mostró el efecto fungicida.

Álvarez et al. (2013) en el artículo titulado “Evaluación del bioinsumo de Fique (*Furcraea gigantea*) en el control del tizón tardío de la papa” demostraron que utilizando el bioinsumo obtenido durante cuatro días de fermentación, dio buenos resultados a nivel in vitro con concentraciones extrapolares. Por otra parte observaron una reducción en la eficacia del bioinsumo de fique, a nivel de campo posiblemente se deba a una degradación de tipo físico-químico, causada por las condiciones de campo abierto. También señalan

que los principios activos del fique son alcaloides y saponinas dentro de los metabolitos secundarios reportados como compuestos con propiedades fungicidas de interés.

Fonseca et al. (2011) Evaluaron el efecto inhibidor de los actinomicetos presentes en purines o extractos fermentados de plantas de chipaca (*Bidens pilosa* L.), sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío de la papa, para esto elaboraron cuatro extractos de flores, raíces, hojas, tallos y su mezcla, de estos extractos se obtuvieron 25 aislamientos de actinomicetos, cada uno de los cuales se enfrentó con *P. infestans* en placas de medio de cultivo. Cuyos resultados demostraron que el extracto que presentó la mayoría de aislamientos con efecto antagónico frente a *P. infestans* fue el que se obtuvo de la mezcla de todas las partes de la planta (cuatro aislamientos), seguido del extracto de tallos – hojas (tres aislamientos) y por último del extracto de raíces (con un e aislamiento) y del extracto de flores no se aislaron actinomicetos. Los actinomicetos, especialmente los pertenecientes al género *Streptomyces* sp., han sido utilizados junto a otras poblaciones microbianas, no solo en la inhibición de *P. infestans*, sino también de otros fitopatógenos

Apaza et al. (2016) en su investigación “Efecto de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd contra el fitopatógeno *Cercospora beticola* Sacc” demostraron la evaluación de la actividad antifúngica de un extracto rico en saponinas que proviene de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), obtenido de residuos del proceso industrial de beneficiado de los granos de quinoa y controlado químicamente por HPLC. El extracto se evaluó a concentraciones de 250 mg/ml, 50 mg/ml, 5 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,05 mg/ml mediante dos métodos: envenenamiento del medio y evaluación (*in situ*) de control de *C. beticola* en hojas de acelga. A partir de las 72 horas se produjo la reducción del crecimiento micelial del patógeno con respecto al control, donde las concentraciones de saponinas entre 5 mg/ml⁻¹ hasta 250 mg/ml⁻¹ fueron altamente efectivo y cuya inhibición está cerca del 95%. La capacidad de formar complejos con esteroides, proteínas y fosfolípidos de membranas, representa el principal mecanismo de actividad antifúngica

de las saponinas el cual debe aprovecharse para continuar estudios de optimización del extracto de saponinas, con la finalidad de mejorar la actividad antifúngica frente a fitopatógenos que merman la producción agrícola.

Pérez et al. (2011) en su investigación titulada “Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum* spp” evaluaron extractos de hojas de *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Jatropha gossypilia*, *Eucalyptus sp*, *Melia azederach* y *Mascagnia concinna* sobre aislados de hongo del género *Colletotrichum*, causante de la enfermedad antracnosis. Este estudio permitió evaluar el efecto inhibitorio de extractos obtenidos de seis especies vegetales sobre seis aislados de hongos del género *Colletotrichum*. Los mejores resultados de actividad inhibitoria fueron observados por los extractos de hojas secas de *M. azederach* y *M. concinna* sobre todos los aislados evaluados, convirtiéndose este estudio in vitro en el primer reporte a nivel nacional como una alternativa promisoría para el manejo de la antracnosis.

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

2.2.1. Importancia del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*)

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) a nivel mundial es uno de los cultivos más importantes, ocupa el cuarto lugar en importancia como alimento, después del maíz, el trigo y el arroz. El cultivo de papa se realiza en alturas comprendidas entre los 2700 a 3400 msnm, a lo largo del callejón interandino, sin embargo, los mejores rendimientos se presentan en zonas ubicadas entre los 2900 y los 3300 msnm, donde las temperaturas fluctúan entre 9 y 11 °C. Dentro de su composición nutricional contiene 80% de agua y la materia seca constituido por carbohidratos, proteínas, celulosa, minerales, vitaminas A, C y complejo B, proporcionan una dieta balanceada, además, son utilizados en la industria. (Bolaños 2015). En el 2018, la superficie sembrada de papa a nivel nacional fue de 23.974 hectáreas, repartidas en Chimborazo con 15.9%, Cotopaxi 14.6%, Tungurahua 10.2%, Carchi 27.3% y otras provincias 24.4%. La producción se concentra en la provincia del Carchi con el 49,5% (ESPAC 2018).

La mayor diversidad genética de papa cultivada y silvestre se encuentra en las tierras altas de los Andes de América del Sur. Los agricultores han reconocido el valor de las raíces y tubérculos en términos de producción de energía cosechada por hectárea por día, de los cuales la papa es el más eficiente entre los cultivos comestibles comunes. La calidad y cantidad de las sustancias nutritivas del tubérculo varían por variedad de papa y condiciones de campo (Pumisacho y Sherwood 2002). El cultivo de papa es afectado por numerosos organismos que en determinadas condiciones, causan daño económico. La presencia de insectos, hongos, bacterias, nematodos y virus afectan la calidad y rendimiento de los cultivos de papa, dañando hojas, tallos y tubérculos apareciendo malformaciones y pudriciones de esta manera alterando el crecimiento de las plantas y la característica de tubérculos para el mercado (Egusquiza 2013).

Para reducir el daño de plagas y enfermedades en el cultivo de papa es necesario implementar un manejo integrado, en vista que durante los últimos años, los sistemas agrícolas se han visto afectados por el uso de agroquímicos para controlar el ataque de malezas, plagas y enfermedades, generando problemas ambientales así como atentar contra la salud humana, razón por la cual se busca alternativas de manejo que sean amigables con el ambiente, controlando microorganismos fitopatógenos por medio de la utilización de extractos vegetales y metabolitos bioactivos de planta (Meza 2017).

2.2.2. *Phytophthora infestans*

El Tizón tardío es la enfermedad que causa mayor pérdida económica en el cultivo de papa a nivel mundial, es causada por un oomicete denominado *Phytophthora infestans*, que destruye las hojas, los tallos y los tubérculos (Andrango 2017). *P. infestans* sobrevive en tejido vivo ya sea en tubérculo, semillas, desechos de papas, plantas voluntarias y otros hospederos susceptibles siendo estas las principales fuentes de la enfermedad, desde estos tejidos infectados el micelio crece hasta alcanzar los brotes, la enfermedad se produce en temperaturas bajas entre 15 y 22 °C acompañado de alta humedad relativa mayor al 80% (Cardona et al. 2016).

Se requiere al menos de 12 horas en estas condiciones para que se produzca infección y entre 5 a 7 días para desarrollar los primeros síntomas, el hongo se dispersa por la lluvia y el viento depositándose en hojas y tallos húmedos, donde inicia una nueva infección, comienza principalmente en los sectores más bajos y húmedos de la plantación (Acuña 2007). Este patógeno afecta la papa, el tomate y algunas otras plantas solanáceas, infectando la planta en los diferentes órganos, raíces, tubérculos, tallos, hojas, flores y fruto, siendo las hojas y el tallo los que presentan las mayores lesiones necróticas. La fase de infección foliar provoca la disminución en la capacidad fotosintética debido a la destrucción de los tejidos, resultando una reducción del rendimiento en la producción del tubérculo (Realpe 2010).

2.2.2.1. Taxonomía

TAXON	NOMBRE
Reino:	Fungi
Phylum:	Oomycota
Clase:	Oomycete
Orden:	Pythiales
Familia:	Pythiaceae
Genero:	Phytophthora
Especie:	infestans - (Mont.) de Bary 1876
Nombre científico	<i>Phytophthora infestans</i>

(Realpe 2010)

2.2.2.2. Ciclo de vida

Phytophthora infestans es un hongo oomycete, heterotálico, que produce tres tipos de esporas: esporangios, zoosporas, y oosporas (Yépez 2016).

Asexual

En agua libre y con bajas temperaturas, los esporangios germinan indirectamente produciendo alrededor de 8 - 12 zoosporas. Las zoosporas se forman dentro del esporangio y son liberadas cuando se rompe la pared esporangial, lo cual permite a las zoosporas

nadar libremente. Las zoosporas se enquistan sobre superficies sólidas, es decir, se detienen, adquieren una forma redondeada y forman una pared celular. Luego, en presencia de humedad, pueden desarrollar un tubo germinativo y penetrar a la hoja por los estomas, o formar el apresorio, de tal manera que la hifa de penetración ingresa directamente a través de la cutícula. Una vez dentro de la planta, el micelio se desarrolla intercelularmente formando haustorios dentro de las células. Ocasionalmente se forman haustorios en forma extracelular. Cuando la temperatura es mayor a 15° C, los esporangios pueden germinar directamente, formando un tubo germinativo que penetra la epidermis de la hoja e infecta al hospedante (Pérez y Forbes 2008)

Sexual

Los gametangios se forman en dos hifas separadas, por lo que *P. infestans* es heterotálico. Así, ambos tipos de apareamiento A1 y A2, deben estar presentes para que ocurra la reproducción sexual. La unión de los gametos ocurre cuando el oogonio atraviesa el anteridio y ocurre la plasmogamia. Esto conduce a la fertilización y al desarrollo de una oospora con paredes celulares gruesas. La oospora es fuerte y puede sobrevivir en los rastros. Bajo condiciones favorables, la oospora produce un tubo germinativo que forma un esporangio apical, el cual puede liberar zoosporas o formar nuevamente un tubo germinativo, los cuales sirven como inóculo primario (Realpe 2010).

La reproducción sexual, mediante formación de oosporas, da lugar a un comportamiento de parásito obligado, debido a que el micelio no puede sobrevivir en ausencia de la célula hospedante, lo que implica la infección de células vegetales, causando la enfermedad en diversas Solanáceas. Por otro lado, la reproducción asexual a través de los esporangios, le permite generar un estado de supervivencia de las oosporas y nuevas combinaciones de genes (Alor 2015).

2.2.2.3. Micelio

Las estructuras somáticas (talos), están compuestos de filamentos, “hialinos” (hifas) ramificados y cenocíticos. En ocasiones el micelio se esponja, se vuelve nudoso o tuberculado y rara veces crece simétricamente (Andrango 2017).

El micelio es capaz de vivir de forma saprófita sobre las partículas de materia orgánica del suelo en ausencia del huésped. Cuando las especies del género *Phytophthora* son cultivadas in vitro el desarrollo del micelio se ve condicionado por varios factores tales como la composición del medio, la temperatura, los nutrientes, la tensión de oxígeno y de CO₂, el pH y en menor escala la luz (Echemendia 2012).

En el caso del pH el rango permisible para el cultivo in vitro de estas especies se encuentra entre 3.5 y 10, siendo el crecimiento óptimo específico para la mayoría de las especies, encontrándose en un rango entre 4.5 y 5.5. Generalmente, los valores de pH que permiten el mejor desarrollo del micelio, también son favorables para la producción de esporangios, clamidosporas y oosporas (Echemendia 2012).

2.2.2.4. Epidemiología

En general, el tizón tardío puede desarrollarse como epidemia en determinados rangos de temperatura y en el campo se comporta como una enfermedad policíclica, originando una curva de progreso cuya forma varía de acuerdo con las condiciones climáticas (Escalante y Farrera 2004).

Este patógeno puede mantenerse de una estación a otra como micelio o esporas (esporangios u oosporas). Las fuentes iniciales que contienen inóculo son normalmente residuos vegetales o tubérculos semilla. En el caso de haberse producido reproducción sexual, las esporas presentes en el suelo serían la fuente de infección. En condiciones asexuales, los esporangios que se encuentran en hojas y tallos de plantas infectadas pueden ser dispersados por lluvia y el viento, posibilitando la infección de tubérculos existentes en el suelo o de otros hospedadores próximos (Alor 2015).

La enfermedad también se desarrolla en el período post-cosecha, a partir de tubérculos infectados, o durante el período vegetativo por lavado de esporangios hacia el suelo y en contacto con partes aéreas de plantas infectadas. Durante su almacenamiento, estos tubérculos enfermos pueden formar brotes que se convierten en fuentes primarias de infección de tubérculos sanos o de un nuevo cultivo si se utilizan como material de propagación vegetativa (Alor 2015).

2.2.2.5. Sintomatología

El síntoma característico del tizón tardío es una macha foliar pero, este síntoma es la fase final de otra previa caracterizada por la formación de un área amarillenta en el haz de las hojas que se forma al inicio o cuando el síntoma se detiene debido a las condiciones desfavorables de clima, sequedad ambiental. Esta es una característica de los patógenos hemibiotrófos, es decir, aquellos que pasan por una fase biotrófica y llegan a una fase final necrotrofica. Otra característica del tizón tardío es la formación de una felpa de color blanquecino en el envés de la lesión de la hoja. Aunque en algunos casos, en dependencia de la virulencia del patógeno, esta felpa puede formarse en el haz y en el borde la mancha foliar. Esta felpa blanquecina es el signo de la enfermedad que está formada por las esporas - esporangios - y esporangioforos (Coca 2012)

En tallos y tubérculos se observan lesiones necróticas de color café, dejando frágiles a tallos (susceptibles al quiebre), mientras que en tubérculos estas lesiones son irregulares en profundidad. Si las condiciones de humedad y temperatura siguen siendo favorables tras la infección, se podría colapsar y morir todo el follaje (Acuña y Araya 2017).

3.2.3. *Puccinia pittieriana*

Se reportan las mayores pérdidas en el norte de Ecuador cerca de la línea ecuatorial, en las provincias de Carchi y Tungurahua. Raramente alcanza niveles alarmantes en la papa, excepto en condiciones muy marginales, especialmente desde el periodo de floración. Probablemente, este hongo puede ser transportado en material vegetal fresco, seco o en restos de cultivos en el suelo, causando enfermedades en las papas en regiones húmedas y frías, debido a que las basidiosporas son de corta duración y no se producen en grandes cantidades, el hongo no se propaga lejos por agentes naturales como el viento (USDA 2010).

Se trata de una de las enfermedades causadas por un biótrofo, en general no ocasiona problemas serios en el cultivo o en la producción. Toma importancia en el momento que la infección ocurre en los estados fenológicos más sensibles para la planta, esto es el periodo pos vegetativo al inicio de la floración. Las plantas afectadas luego de este periodo pueden permanecer débiles, agotadas y ser prácticamente objeto de infección de plagas o enfermedades originados por fitopatógenos (Falconí 2013).

3.2.3.1. Taxonomía

TAXON	NOMBRE
Reino:	Fungi
División :	Basidiomycota
Clase:	Pucciniomycetes
Orden:	Pucciniales
Familia:	Pucciniaceae
Genero:	Puccinia
Especie:	Pittieriana
Nombre científico	<i>Puccinia pittieriana</i>

(Jeger et al. 2017)

3.2.3.2. Biología

P. pittieriana es una roya microcíclica, que produce solo teliosporas. Por debajo de 15 ° C, las teliosporas germinan para producir basidia y basidiosporas en 3-24 h. Las basidiosporas son arrastradas por el viento a las nuevas hojas del huésped y comienzan la infección inmediatamente. El período de incubación es de 14-16 días en papas a temperaturas de 16 ° C o menos, y las lesiones se desarrollan completamente en 20-25 días. Las teliosporas maduran 30-40 días después de la inoculación. A temperaturas más altas, las basidiosporas no se forman, por lo que la propagación se ve favorecida por las condiciones de frío: temperatura promedio de 10 ° C con 10-12 h de humedad libre. El patógeno persiste en cultivos de papa superpuestos o en malezas solanáceas. La

longevidad de las teliosporas aparentemente no se ha determinado, pero pueden persistir en los desechos del suelo, que acompañan a los tubérculos de papa exportados (CABBI y EPPO 2017). In vitro y a temperaturas inferiores a 15 ° C, las teliosporas germinan en 1 h para producir un basidio, que da lugar a cuatro basidiosporas en 3–24 h (Jeger et al. 2017).

3.2.3.3. Forma de propagación

La roya es una especie heteroica, es decir, que necesita la presencia de una planta intermedia (Huésped secundario) para que el parasito pueda completar las distintas fases de su ciclo biológico. El ciclo sexual de este hongo comprende cinco fases de desarrollo: espermogonio, aecio, uredo, telio y basidio. En los restos de cosecha se forman los teliosoros, los cuales forman teleutosporas y éstas a su vez, producen, por meiosis y una vez llegada la primavera, basidiosporas. Éstas infectan las hojas del huésped secundario, formándose posteriormente en éste huésped picnidios y aecios (Zuluaga 2008).

Las aeciosporas, bajo condiciones climatológicas adecuadas, inician la infección en las hojas del hospedero, formándose en éstas urediniosporas (forma asexual del hongo) que irán infectando al cultivo de forma progresiva mientras que se den las condiciones óptimas de humedad y temperatura. A medida que maduran las plantas o cuando no son favorables las condiciones ambientales, se observarán los teliosoros o masas de teleutosporas, las cuales se forman debajo de la epidermis de la hoja, permaneciendo en éstas (restos de cosechas) durante el otoño-invierno, completándose así el ciclo de vida del hongo (RAIF 2014).

3.2.3.4. Sintomatología

La infección ocurre en hojas, tallos y peciolo. Tras el periodo de latencia, las lesiones se desarrollan en el envés de la hoja en forma de manchas redondas que van del blanco al verde. Más tarde aparecen pústulas ovaladas o redondas de color café rojizo que pueden alcanzar más de 0.5 cm de diámetro. La formación masiva de esporas o uredosporas en las pústulas confiere al follaje un aspecto rojizo, tal como ocurre con la roya de los cereales. El aire transporta las uredosporas maduras. El tejido afectado muere dejando un orificio en su lugar (Pumisacho y Sherwood 2002). La defoliación se produce cuando se forman cientos de lesiones en una hoja. Lesiones alargadas o irregulares ocurren en peciolo y tallos, Las frutas y las flores también se ven afectadas (CABI 2019).

3.2.4. Extractos vegetales

Las mezclas de compuestos con propiedad antifúngica encontrados en las plantas pueden afectar a patógenos diferencialmente, ya sea de manera individual o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones. Así mismo, diversos métodos de extracción son estudiados para salvaguardar las propiedades extraídas de la mejor y más viable manera posible (Villa et al. 2014).

Los extractos vegetales son preparados que permiten extraer de las plantas determinadas sustancias útiles, para la nutrición, otras que pueden controlar insectos plagas de manera eficiente y ayudar en el tema de enfermedades, estos extractos pueden desarrollarse a partir de varias plantas y de diferentes partes de esta, se extraen por medios físicos y químicos como son la fermentación, la decocción, las maceraciones e infusiones (Cano 2016).

Las plantas han sido capaces de protegerse de las plagas por sí mismas antes de que el hombre jugara un rol activo en protegerlas. Se conoce que sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa. Diversos productos

derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas, saponinas y polipéptidos. (Hernández et al, 2007). La actividad antifúngica de las plantas ha sido muy estudiada por la resistencia a los distintos funguicidas comerciales utilizados normalmente en el control de enfermedades de cultivos agrícolas lo que ha estimulado en los últimos años la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas entre los productos naturales, algunos de los cuales se han mostrado efectivos contra fitopatógenos tanto en condiciones in vitro como in vivo (Moreno et al. 2011).

El proceso para obtener extractos vegetales es variable, todos estos componentes se obtienen en conjunto cuando se extraen de los diferentes órganos tanto vegetativos como reproductivos, tales como raíces, hojas, brotes, tallos, flores y frutos previamente triturados con un tamaño de partícula determinado y en contacto con cantidad suficiente de solvente. Entre las técnicas de extracción se pueden obtener extractos acuosos, etanólicos, aceites esenciales o utilizar otros solventes para obtener diversos compuestos, acorde a su polaridad. Posterior a la extracción, la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto, y secarlos hasta sequedad (Mesa et al. 2017).

3.2.5. Cabuya blanca (*Furcraea andina*)

Esta es una planta que crece en forma silvestre o cultivada en los valles y laderas de los Andes, pertenece a la familia de las Agavaceae (Aguilar et al. 2007).

Presenta cualidades fungicidas que pueden ser utilizadas en manejos de problemas fitosanitarios, ya que poseen propiedades tensoactivas y plaguicidas, cabe destacar que de la planta de fique solamente se aprovecha la cabuya (fibra natural) lo cual representa el

4% del peso de la hoja, los residual del peso de extracción constituyen el 96%, siendo el jugo de fique el más representativo con el 70% del peso total (Álvarez et al. 2011).

La composición química puede varias dependiendo de la características propias de la planta y el cultivo, sin embargo estudios realizados indican la existencia de metabolitos secundarios tales como saponinas, flavonoides, alcaloides, esteroides y triterpenos, componentes que pueden interactuar como limitante en el crecimiento del patógeno. Lo que ha considerado a esta planta como una potencial materia prima para la elaboración de tensoactivos, plaguicidas y fármacos (Bacca 2012).

3.2.6. Cabuya negra (*Agave americana*)

Las especies del género *Agave* son ricas en saponinas, alcaloides y taninos que son metabolitos secundarios. Sin embargo, las especies de *Agave* también sintetizan una importante riqueza y abundancia de compuestos fenólicos. Los flavonoides se encuentran entre los compuestos fenólicos más presentes que se producen en prácticamente todas las partes de las plantas. Muchos de esos compuestos tienen varias propiedades biológicas (Almaraz et al. 2013). *Agave americana* se le puede emplear como plaguicida, principalmente para el control de la *Phytophthora infestans*, se aprovecha el 4 % en peso de toda la hoja (Iannacone et al. 2013).

3.2.7. Ashpa quinua (*Chenopodium álbum.*)

Es considerada una de las 10 malezas de mayor importancia a nivel mundial, tanto por la cantidad de cultivos infestados como por la distribución geográfica de estas infestaciones. La semilla puede permanecer viable por muchos años, lo que permite que siempre esté presente en el suelo, cuando éste ya ha sido infestado (León 2017). La familia Chenopodiaceae se caracteriza por contener diferentes grupos de metabolitos secundarios

de los cuales los más importantes son los alcaloides, esteroides, flavonoides, fenoles y saponinas, estas sustancias que están distribuidas en diferentes órganos de la planta, principalmente en raíces, hojas y semillas. Las saponinas exhiben actividad antifúngica y bactericida (Russo 2011).

3.2.8. METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas producen compuestos secundarios con características químicas y funcionales muy diversas, a éstos se les llama metabolitos secundarios y por la actividad que algunos tienen sobre patógenos. En años recientes se han incrementado las investigaciones acerca de la importancia de estos compuestos para los organismos que los producen y sus interacciones alelopáticas, defensa contra herbívoros o patógenos, atracción de polinizadores, dispersores de semillas, bacterias benéficas. Tienen por misión servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta, ejerciendo una presión selectiva sobre los patógenos potenciales, desarrollando mecanismos de resistencia, esto se debe en parte a la enorme diversidad química de los productos naturales derivados de plantas. La función primordial de muchos metabolitos secundarios no es necesariamente antibacteriana o antifúngica, también algunos inhiben la germinación de esporas (Vivanco et al. 2005).

Los diferentes metabolitos secundarios constituyen verdaderas barreras frente a la penetración de los hongos patógenos. El principal mecanismo de actividad antifúngica de las saponinas es debido a su habilidad de formar complejos con los esteroides en las membranas de los hongos lo cual ocasiona la desintegración de la membrana. Los compuestos fenólicos se ha demostrado que inhiben las enzimas reaccionando con los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos. Los flavonoides, taninos forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación. Dentro de los alcaloides los llamados cuaternarios se les atribuyen la propiedad de intercalarse en el

ADN lo que ocasiona múltiples efectos en el microorganismo. Muchos hongos fitopatógenos (a excepción de los biotróficos) secretan enzimas hidrolíticas que se difunden en las células del hospedero antes del avance de los microorganismos, lo cual puede ser inhibido por radicales libres de fenoles oxidados que funcionan como inhibidores no específicos, así como taninos, cianidina, delfinidina y malvidina (Montes 2009).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Los extractos vegetales inhiben el crecimiento in vitro de los hongos fitopatógenos de la papa, *Phytophthora infestans* y *Puccinia pittieriana*

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

Evaluar tres extractos vegetales para el control de *Phytophthora infestans* y *Puccinia Pittieriana* in vitro en el cultivo de papa.

3.2.2. Objetivos específicos

Determinar el extracto vegetal que inhibe el crecimiento de *Phytophthora infestans* in vitro en papa.

Determinar el extracto vegetal que inhibe el crecimiento de *Puccinia pittieriana* in vitro en papa.

Establecer la concentración adecuada de los extractos para inhibir el crecimiento de los hongos.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO (ENSAYO)

La investigación se llevó a cabo en la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el laboratorio de suelo y de Microbiología agrícola y ambiental. La localidad que está ubicado en el sector El Tambo, parroquia la Matriz perteneciente del Cantón Cevallos, provincia de Tungurahua se halla a 2850 msnm sus coordenadas geográficas son: 01° 24'27'' de latitud Sur y a 78° 35' 00'' de longitud Oeste, ubicado a 19,31 km, al Sureste de Ambato

4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

Para el experimento se utilizó los Laboratorios de Suelos de Servicio al Público y de Microbiología agrícola y ambiental, de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, mismo que cuentan con condiciones de ambiente controlado, conservándose a una temperatura promedio de 20°C y una humedad del 48%.

4.3. EQUIPOS Y MATERIALES

4.3.1. Equipos

Bomba de vacío

Estufa

Rota vapor

Cámara de flujo laminar

Autoclave

Molino

Plato caliente

Balanza analítica

Refrigerador

4.3.2. Materiales

Material vegetal (hojas cabuya negra, hojas cabuya blanca y semillas ashpa quinua)

Cajas Petri

Agar Papa Dextrosa

Puntas para sembrar microorganismos

Lámpara de alcohol

Papel paraffim

Etanol

Agua destilada

Embaces plásticos estériles

Frascos de vidrio ámbar

Frascos autoclavables de rosca (100, 500ml)

Papel filtro

Matraz quitasato

Embudo de porcelana

Papel aluminio

Antibióticos (Rifaximina y Ampicilina)

Probetas

Puntas de plástico

Pipetas

4.4. FACTORES EN ESTUDIO

Los factores de estudio que esta investigación se va a tomar en cuenta son los siguientes:

4.4.1. Extractos vegetales

Cabuya blanca X1

Cabuya negra X2

Ashpa quinua X3

4.4.2. Dosis

0% D1

0,5 % D2

1% D3

2% D4

4% D5

4.4.3. Enfermedades

Phytophthora infestans E1

Puccinia pittieriana E2

4.5. TRATAMIENTOS

Tabla 1 Tratamientos investigados

N°	Símbolo	Extracto vegetal	Dosis	Enfermedad
1	X1D1E1	Cabuya blanca	0%	<i>Phytophthora infestans</i>
2	X1D2E1	Cabuya blanca	0.5%	<i>Phytophthora infestans</i>
3	X1D3E1	Cabuya blanca	1%	<i>Phytophthora infestans</i>
4	X1D4E1	Cabuya blanca	2%	<i>Phytophthora infestans</i>
5	X1D4E1	Cabuya blanca	4%	<i>Phytophthora infestans</i>
6	X2D1E1	Cabuya negra	0%	<i>Phytophthora infestans</i>
7	X2D2E1	Cabuya negra	0.5%	<i>Phytophthora infestans</i>
8	X2D3E1	Cabuya negra	1%	<i>Phytophthora infestans</i>
9	X2D4E1	Cabuya negra	2%	<i>Phytophthora infestans</i>
10	X2D5E1	Cabuya negra	4%	<i>Phytophthora infestans</i>
11	X3D1E1	Ashpa quinua	0%	<i>Phytophthora infestans</i>
12	X3D2E1	Ashpa quinua	0.5%	<i>Phytophthora infestans</i>
13	X3D3E1	Ashpa quinua	1%	<i>Phytophthora infestans</i>
14	X3D4E1	Ashpa quinua	2%	<i>Phytophthora infestans</i>
15	X3D5E1	Ashpa quinua	4%	<i>Phytophthora infestans</i>
16	X1D1E2	Cabuya blanca	0%	<i>Puccinia pittieriana</i>
17	X1D2E2	Cabuya blanca	0.5%	<i>Puccinia pittieriana</i>
18	X1D3E2	Cabuya blanca	1%	<i>Puccinia pittieriana</i>

19	X1D4E2	Cabuya blanca	2%	<i>Puccinia pittieriana</i>
20	X1D5E2	Cabuya blanca	4%	<i>Puccinia pittieriana</i>
21	X2D1E2	Cabuya negra	0%	<i>Puccinia pittieriana</i>
22	X2D2E2	Cabuya negra	0.5%	<i>Puccinia pittieriana</i>
23	X2D3E2	Cabuya negra	1%	<i>Puccinia pittieriana</i>
24	X2D4E2	Cabuya negra	2%	<i>Puccinia pittieriana</i>
25	X2D5E2	Cabuya negra	4%	<i>Puccinia pittieriana</i>
26	X3D1E2	Ashpa quinua	0%	<i>Puccinia pittieriana</i>
27	X3D2E2	Ashpa quinua	0.5%	<i>Puccinia pittieriana</i>
28	X3D3E2	Ashpa quinua	1%	<i>Puccinia pittieriana</i>
29	X3D4E2	Ashpa quinua	2%	<i>Puccinia pittieriana</i>
30	X3D5E2	Ashpa quinua	4%	<i>Puccinia pittieriana</i>
31	Testigo (<i>P. infestans</i>)		(Metalaxil)	
32	Testigo (<i>P. pittieriana</i>)		(Oxicarboxin)	

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la evaluación se planteó un diseño experimental Completamente al azar (DCA) donde se incluyeron 30 tratamientos y 2 testigos comerciales (Metalaxil; Oxicarboxin) cada uno de los tratamientos con cuatro repeticiones.

4.7.MANEJO DEL EXPERIMENTO

4.7.1. Preparación de extractos de plantas

Se recolectó semillas de ashpa quinua *Chenopodium álbum*, hojas de cabuya negra (*Agave americana*) y hojas de cabuya blanca (*Furcraea andina*), mismas que fueron secadas en la estufa a una temperatura de 50°C hasta que estuvieran completamente secas, posteriormente fueron trituradas en un molino de cuchillas.

En un matraz se pesó 100 g de muestra seca y molida de las tres plantas al que se añadió 300 ml de etanol al 50%. Se dejó macerar por 48 horas, posterior a esto se extrajo el solvente utilizando el rota vapor y se preparó las soluciones en diferentes concentraciones.

4.7.2. Reproducción de los hongos fitopatógenos

Para el cultivo de *Phytophthora infestans* y *Puccinia pittieriana* se preparó el medio de cultivo en un matraz con 250 ml de agua destilada y 10g de agar papa dextrosa (APD) y se colocó en la autoclave por 2 horas, luego se dejó enfriar.

Para evitar contaminación del medio de cultivo, se aplicaron antibióticos, 125 µL de Rifaximina y 250 µL de Ampicilina en los 250 ml del medio.

En la cámara de flujo laminar, se dispensaron el medio en 12 cajas Petri de 25 ml y se dejó reposar por una hora hasta conseguir la consistencia gelatinosa y se procedió a sembrar las cepas de los hongos, en seis cajas *Phytophthora infestans* y en las otras seis restantes *Puccinia pittieriana*, esto con la ayuda de una punta. Los medios con los hongos fueron conservados a 23° C por 9 días.

4.7.3. Siembra de hongos fitopatógenos

Se preparó un medio de agar papa dextrosa (PDA), se colocó en la autoclave a 121 ° C y se enfrió a 45 ° C. Posteriormente, se añadió cantidades apropiadas de solución madre de cada extracto y agua destilada al medio PDA para obtener concentraciones del 0%, 0.5%, 1.0 %, 2. % y 4% (p / v) de los extractos en el medio (Tabla 2). Los extractos de plantas se mezclaron completamente con el medio. Se vertió veinte mililitros de cada medio en cada una de las cajas de Petri esterilizadas de 90 mm de diámetro y se dejaron solidificar durante una noche. Posteriormente con una punta plástica, se realiza una perforación en el centro de la caja petri para ser rellenada con el hongo patógeno (*Phytophthora infestans* y *Puccinia pittieriana*) de acuerdo a los tratamientos establecidos.

Tabla 2 Concentraciones para preparar los medios de cultivo.

	DOSIS				
	0%	0.5%	1%	2%	4%
Agar	100ml	99.5ml	99 ml	98ml	96ml
Extractos vegetales	0ml	0.5ml	1ml	2ml	4ml

4.8. VARIABLE RESPUESTA

4.8.1. Crecimiento de los hongos en el medio de cultivo

Se tomaron discos miceliales de 5 mm de diámetro de cultivos de *Phytophthora infestans* y *Puccinia Pittieriana* de 9 días de edad con un perforador de punta esterilizado y se colocaron en el centro de cada caja petri. La posición del disco se marcó en la base del plato con un rotulador y dos ejes ortogonales, que pasaron por el centro del disco, además se marcaron para usar como referencias para registrar el crecimiento. Las placas se incubaron a 23 °C durante 168 h. El crecimiento miceliar se midió a lo largo de una línea a partir del halo de crecimiento del microorganismo, se registraron exactamente a intervalos de 24 h usando una regla. Cada tratamiento será replicado cuatro veces.

4.8.2. Determinación del porcentaje de inhibición

Para determinar el porcentaje de inhibición de *Phytophthora infestans* y *Puccinia Pittieriana*, se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(D. \text{ halo del extracto} - D. \text{ halo blanco})}{(D. \text{ halo control positivo} - D. \text{ halo blanco})} * 100$$

(Ramírez y Díaz 2007).

4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Para el cálculo y análisis de los datos de crecimiento de los hongos en el medio de cultivo, se registró en Excel 2016, para posteriormente procesar la información, mediante la utilización del Análisis PROBIT.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos (*Phytophthora infestans*, *Puccinia pittieriana*)

La prueba de Tukey al 5% al analizar el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* a las 168 horas de haber iniciado el ensayo se puede inferir que los extractos vegetales de ashpa quinua, al 1 % de concentración, cabuya blanca al 2% y cabuya negra 4% presentan un crecimiento de 2.73 (b), 3,93 (ab) y 4,05 (ab) cm. Mientras que el testigo comercial (Metalaxil), presenta un crecimiento de 2,45 (b) cm y el testigo absoluto presenta un crecimiento micelial que va en un rango de 3,85 (ab) hasta 6 (a) cm (tabla 3). Efecto similar obtuvo (Álvarez 2011) al enmendar el medio de cultivo con 75.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración de *Furcraea gigantea vent* que inhibe totalmente el crecimiento micelial de *P. infestans* in vitro, determinado la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides y saponinas.

Por otra parte se registró que el menor crecimiento micelial de *Puccinia pittieriana* a las 168 horas en los diferentes tratamientos las dosis más efectivas fueron cabuya blanca al 2%, cabuya negra al 4% y ashpa quinua al 2% mismas que reportaron valores de 2.08 (bcde), 1.30 (de) y 1.75 (cde) cm, mientras que el testigo comercial (Oxicarboxin 75%) presentó un crecimiento de 0,93(e) cm y el blanco (Testigo absoluto) presenta un crecimiento superior que oscila entre 3,20 (ab) y 3,55 (ab) cm (tabla 4). Bernal et al. (2016), investigaron la actividad antifúngica de extractos acuosos de *Spathodea campanulata Beauv* como alternativa viable para el control de la roya del frijol, obteniendo los mejores tratamientos para el control de la roya con extractos acuosos de hojas y flores de *S. campanulata* a la concentración de 10 %, mostrando actividad antifúngica.

Tabla 3 Crecimiento miceliar de *Phytophthora infestans* tratado con diferentes concentraciones de extractos vegetales.

Tratamiento	Dosis	48 h	72h	96h	120h	144h	168h
Cabuya blanca	0	1,58±0,126 a	2,40±0,490 ab	2,90±0,663 ab	3,20±0,980 abc	3,70±1,536 abc	4.53±2.247 ab
	0,5	1,25±0,100 bcd	2,05±0,100 bc	2,60±0,283abc	2,90±0,476 abc	3,40±0,909 abc	3.98±1.269 ab
	1	1,15±0,100 cde	1,70±0,116 cd	2,45±0,100 bcd	3,05±0,100 abc	3,65±0,100 abc	4.70±0.356 ab
	2	1,00±0,000 def	1,65±0,100 cd	2,15±0,100 bcd	2,80±0,000 bc	3,50±0,116 abc	3.93±0.723 ab
	4	0,85±0,100 ef	1,30±0,116 de	1,75±0,100 def	2,65±0,473bcd	3,15±0,379 abc	4.88±0.650 ab
Cabuya negra	0	1,50±0,116 ab	2,75±0,100 a	3,25±0,192 a	3,95±0,192 a	5,00±0,432 a	6.00±0.956 a
	0,5	1,25±0,100 bcd	2,35±0,100 ab	2,50±0,116 abcd	3,35±0,100 abc	3,95±0,252 ab	5.00±0.082 ab
	1	1,10±0,116 de	1,65±0,100 cd	2,40±0,163 bcd	3,10±0,200 abc	3,65±0,252 abc	4.58±0.544 ab
	2	0,90±0,116 ef	1,45±0,100 de	2,25±0,100 bcd	3,10±0,200 abc	3,65±0,412 abc	4.78±0.222 ab
	4	0,95±0,100 def	1,10±0,116 ef	1,30±0,116 ef	1,55±0,192 de	2,80±0,490 bc	4.05±0.551 ab
Ashpa quinua	0	1,45±0,100 abc	2,10±0,116 bc	2,45±0,526 bcd	2,95±0,640 abc	3,45±1,570 abc	3.85±1.568 ab
	0,5	1,55±0,100 ab	2,25±0,192 b	2,85±0,100 ab	3,55±0,300 ab	4,20±0,400 ab	4.53±0.443 ab
	1	1,45±0,100 abc	2,00±0,000 bc	2,20±0,000 bcd	2,45±0,252 bcd	2,35±0,100 bc	2.73±0.171 b
	2	1,25±0,100 bcd	1,70±0,116 cd	2,00±0,283 cde	2,30±0,200 cde	2,50±0,346 bc	3.08±0.287 b
	4	1,25±0,100 bcd	1,70±0,200 cd	2,15±0,192 bcd	2,55±0,342 bcd	2,80±0,365 bc	3.25±0.342 b
Metalaxil		0,70±0,116 f	1,81±0,525 f	1,00±0,163 f	1,30±0,116 f	1,80±0,231 c	2.45±0.332 b

abcd. Medias con letras diferentes entre filas difiere significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4 Crecimiento micelial de *Puccinia pittieriana* tratado con diferentes concentraciones de extractos vegetales.

Tratamiento	Dosis	48 h	72h	96h	120h	144h	168h
Cabuya blanca	0	1,50±0,116ab	2,40±0,163a	2,00±0,163 abc	2,30±0,116 abc	2,85±0,252 ab	3,55±0,915 ab
	0,5	1,20±0,000 abcd	1,50±0,116 bcd	1,60±0,163 abcde	1,95±0,100abcd	2,35±0,100 abcd	2,80±0,116 abcd
	1	1,05±0,100 cde	1,30±0,116 cde	1,45±0,100 abcde	1,60±0,231 abcd	1,95±0,100 abcd	2,15±0,058 bcde
	2	0,90±0,116 de	1,10±0,116 de	1,30±0,116 bcde	1,50±0,116 abcd	1,65±0,100 abcd	2,08±0,096 bcde
	4	0,68±0,275 e	1,05±0,100 de	1,20±0,231 bcde	1,60±0,365 abcd	1,50±0,383 cd	2,15±0,995 bcde
Cabuya negra	0	1,60±0,163 a	1,65±0,252 bc	1,85±0,252 abcd	2,35±0,192 ab	2,80±0,163 abc	3,38±0,126 abc
	0,5	1,20±0,163 abcd	1,25±0,300 cde	1,10±0,347 de	1,30±0,476 bcd	1,60±0,712 abcd	2,53±0,660 abcde
	1	1,00±0,163 cde	1,15±0,100 cde	1,20±0,231 bcde	1,40±0,231 bcd	1,55±0,100 bcd	1,83±0,126 bcde
	2	1,00±0,000 cde	1,05±0,100 de	1,18±0,386 cde	1,20±0,283 cd	1,35±0,252 d	1,73±0,378 cde
	4	0,90±0,116 de	0,85±0,100 e	0,85±0,100 ef	1,00±0,283 de	1,05±0,300 de	1,30±0,245 de
Ashpa quinua	0	1,35±0,100 abc	1,65±0,100 bc	2,05±0,100 ab	2,30±0,116 abc	2,90±0,116 a	3,20±0,216 abc
	0,5	1,10±0,258 bcd	1,15±0,300 cde	1,30±0,739 bcde	2,60±0,365 a	2,90±0,383 a	4,03±0,670 a
	1	1,25±0,100 abcd	1,50±0,200 bcd	1,65±0,100 abcde	1,90±0,503 abcd	2,00±0,542 abcd	2,55±0,545 abcde
	2	1,10±0,116 bcd	1,10±0,116 de	1,25±0,192 bcde	1,40±0,432 bcd	1,45±0,342 d	1,75±0,420 cde
	4	1,35±0,100 abc	2,00±0,231 ab	2,20±0,490 abcde	2,55±1,012 a	2,85±1,350 ab	4,25±1,434 a
Oxicarboxin		0,00±0,000 f	0,00±0,000 f	0,00±0,000 f	0,00±0,000 e	0,00±0,000 e	0,93±0,150 e

abcd. Medias con letras diferentes entre filas difiere significativamente ($p < 0,05$).

5.2. Porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos (*Phytophthora infestans*, *Puccinia pittieriana*)

El porcentaje de inhibición de *Phytophthora infestans* a las 168 horas con el extracto de ashpa quinua al 1% presenta un valor de 92.25% (a), el extracto de cabuya negra al 4%, 61.25% (bc), mientras que con el extracto de cabuya blanca los resultados no fueron favorables puesto que al 2% presenta una imbibición de solo 55.50 % (bc), el testigo (Metalaxil) presenta una inhibición de 100% (a) y el testigo absoluto presenta un porcentaje de inhibición de 0% (tabla 5). Lo que concuerda con Abushaala et al. (2017) quien señala que la aplicación de extractos de plantas inhibe el crecimiento de patógenos, ya que dentro de su composición bioquímica contienen metabolitos que muestran efectos antifúngicos.

El porcentaje de inhibición de *Puccinia pittieriana* a las 168 horas mostró resultados satisfactorios con el extracto de ashpa quinua al 4% presento inhibición del 86,25% (ab) y con el extracto de cabuya negra al 4 %, inhibió 82,75% (abc), mientras que con el extracto de cabuya blanca los resultados fueron inferiores mostrando un 47.25% en la dosis del 2% mostrando que no hubo efecto significativo sobre inhibición de *P. pittieriana*. El testigo (Oxicarboxin 75%), demostró una inhibición de 100% (a) y el testigo absoluto 0% de inhibición (tabla 6), resultados que demuestran la efectividad de los extractos vegetales como una alternativa biológica. Hernández et al. (2007), en condiciones in vitro los extractos inhiben el crecimiento del patógeno, así como la esporulación y germinación de esporas, de modo que ayudan a controlar las enfermedades

Tabla 5: Porcentaje de inhibición de *Phytophthora infestans* tratado con diferentes concentraciones de extractos vegetales.

Tratamiento	Dosis	48 h	72h	96h	120h	144h	168h
Metalaxil		100±0,000 a	100±0,000 a	100±0,000 a	100±0,000 a	100±0,000 a	100±0,000 a
	0	0,00±0,000 f	0,00±0,000 h	0,00±0,000 g	0,00±0,000 f	0,00±0,000 f	0,00±0,000 c
Cabuya blanca	0.5	35,75±8,6939 cdef	36,50±4,726 fg	33,35±11,82 ef	41,25±18,98 cde	29,75±4,272 e	37,50±2,646 c
	1	48,25±18,500 bcde	53,75±4,787 def	42,25±6,714 de	35,25±4,272 cde	42,50±5,745 de	44,25±8,655 c
	2	66,50±6,3509 abcd	56,25 ±7,500 cde	52,08±2,413 cde	44,50±1,732 cde	47,00±0,000 de	55,50±5,000 bc
	4	81,75±14,338 ab	73,50± 7,895 bc	69,05±6,053 bc	50,25±18,88 cd	53,25±5,315 cde	40,75±17,519 c
Cabuya negra	0.5	37,00±13,392 cdef	22,00±5,416 g	37,83±7,047 ef	24,00±3,464 def	32,75±6,946 e	37,00±2,708 c
	1	53,25±18,228 bcde	56,25±4,787cde	41,73±5,981 def	33,25±8,221 cde	42,50±10,247 de	48,00±17,493 c
	2	79,25±16,601 abc	63,50±4,726 cd	48,18±5,334 de	33,75±8,221 cde	42,75±16,132 de	42,75±8,770 c
	4	74,75±17,988 abcd	83,25±8,302 ab	87,65±8,268 ab	91,00±8,756 ab	68,75±15,586 bcd	61,25±17,424 bc
Ashpa quinua	0.5	0,250±24,459 f	26,75±9,430 g	22,86±3,211 f	16,25±10,874 ef	24,50±11,818 ef	48,50±11,387 c
	1	13,50±11,210 ef	39,00±2,000 efg	50,18±3,395 cde	57,75±10,996 c	83,00±8,446 ab	92,25±8,808 a
	2	33,75±22,867def	53,75±4,787 def	57,93±8,199 cd	63,00±8,982 bc	78,75±14,93 abc	85,50±12,557 ab
	4	37,00±13,392 cdef	53,75±9,465 def	52,25±9,314 cde	54,25±14,477 c	69,75±16,317 bcd	80,50± 9,147 ab

abcd. Medias con letras diferentes entre filas difiere significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 6: Porcentaje de inhibición de *Puccinia pittieriana* tratado con diferentes concentraciones de extractos vegetales.

Tratamiento	Dosis	48 h	72h	96h	120h	144h	168h
Oxicarboxin	0.63	100±0.000 a	100±0.000 a	100±0.000 a	100±0.000 a	100±0.000 a	100±0.000 a
	0	0.00±0.000 d	0.00±0.000 e	0.00±0.000 d	0.00±0.000 f	0.00±0.000 g	0.00±0.000 e
Cabuya blanca	0.5	22.25±5.500 cd	37.00±6.164 cd	19.25±13.500 cd	15.25±4.1932 def	17.00±7.528 efg	13.75±11.266 de
	1	32.50±6.557 bc	45.50±8.062 bc	27.00±7.394 bcd	30.25±10.782 bcde	31.50±6.856 cdef	43.75±5.680 abcde
	2	41.75±10.210 bc	53.75±6.131 bc	34.75±4.272 bcd	34.50±6.245 bcde	42.00±2.708 bcde	47.25±7.136 abcde
	4	55.75±20.775 b	56.25±5.058 bc	39.75±12.12 bc	30.25±15.798 bcde	46.50±17.020 bcd	44.00±40.62 abcde
Cabuya negra	0.5	22.00±15.895 cd	47.50±12.152 bc	45.75±12.816 bc	43.75±18.679 bcd	45.00±20.865 bcde	29.50±29.41 cde
	1	36.00±7.703 bc	51.75±7.228 bc	39.25±15.777 bc	38.50±13.279 bcde	45.00±7.703 bcde	58.50±8.737 abcd
	2	35.75±4.500 bc	55.75±7.411bc	42.25±14.431 bc	43.50±1.732 bcd	53.00±6.000 bc	63.25±21.469 abcd
	4	41.75±10.210 bc	64.50±6.403 b	57.50±5.9722 b	56.25±14.009 b	62.75±11.325 b	82.75±11.529 abc
Ashpa quinua	0.5	28.75±18.283 bcd	51.75±13.57 bc	36.75±32.077 bcd	12.75±10.720 ef	8.500±8.888 fg	42.75±29.982 bcde
	1	19.25±6.652 cd	37.000±9.764 cd	16.75±11.644 cd	12.00±3.830 f	20.25±7.805 defg	24.75±29.669 de
	2	29.25±6.131 bcd	49.750±3.686 bc	29.50±5.7446 bcd	26.00±2.582 cdef	41.75±6.238 bcde	46.25±3.500 abcde
	4	12.75±10.21 cd	16.500±7.048 de	19.75±7.8475 cd	48.50±7.506 bc	41.25±12.010 bcde	86.25±8.958 ab

abcd. Medias con letras diferentes entre filas difiere significativamente ($p < 0,05$).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

El extracto de ashpa quinua al 1% en el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans*), presenta un menor crecimiento micelial y un mayor porcentaje de inhibición, 2.73 cm y 92,25 % respectivamente. Mientras que el testigo comercial (metalaxil) reporta un crecimiento micelial de 2,45 cm y 100% de inhibición.

En el control de roya (*Puccinia pittieriana*) el extracto de cabuya negra al 4% presenta un crecimiento micelial de 1.30 cm, el testigo comercial obtiene un crecimiento de 0.93 cm. Mientras que el porcentaje de inhibición se ve influenciado por los extractos de Ashpa quinua y cabuya negra con valores de 86,25% y 82,75% respectivamente, mientras que el testigo comercial reportó 100% de inhibición. Esto puede deberse a la capacidad antifúngica de las saponinas ya que al formar complejos con esteroides, proteínas y fosfolípidos de las membranas es el principal mecanismo de actividad frente a los fitopatógenos (Apaza et al. 2016),

Los extractos vegetales de *Furcraea andina*, *Agave americana* y *Chenopodium álbum*, mostraron efectos fungicidas debido a la presencia de diversos metabolitos secundarios tales como saponinas, alcaloides, flavonoides entre otros, demostrando que los extractos en condiciones in vitro inhiben el crecimiento del patógeno así como la esporulación y germinación de esporas.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

- Abushaala, F; Ben Ramadan¹, A; Fahej, M. 2017. In vitro Antifungal Activity of Some Plant Extracts against Seed-borne Pathogens. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 10(4): 49-57
- Acuña, I. 2007. Manejo integrado del Tizón tardío y estrategias de control químico. Informativo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias – INIA. 1-4.
- Acuña, I; Ayara, M. 2017. Fitopatología – Enfermedades de la papa: Tizón tardío. Instituto de Investigaciones Agropecuarias – INIA. 1-2.
- Aguilar, S; Ramírez, J; Malagón, O. 2007. Extracción de fibras no leñosas: Cabuya (*Furcraea andina trel.*) y Banano (*Musa paradisiaca l.*) para estandarizar un proceso tecnológico destinado a la elaboración de pulpa y papel. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 8(2): 1-10.
- Almaraz, N; Delgado, E; Ávila, J; Uribe, J; González, L. 2013. The Phenols of the Genus *Agave* (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(1): 9-12.
- Alor, A. 2015. Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata. (Tesis Doctoral). UNIVERSITAT DE LLEIDA Escuela Técnica Superior d'Enginyeria Agrària. 12-19.
- Álvarez, D; Salazar, C; Hurtado, A; Delgado, E; Arango, O. 2011. Sensibilidad in vitro de *Phytophthora infestans* al extracto de fique (*Furcraea gigantea Vent*). *Revista Scielo*, 9(2): 96-104.
- Álvarez, D; Salazar, C; Hurtado, A; Delgado, E; Arango, O; Acosta, J. 2013. Evaluación del bioinsumo de Fique (*Furcraea gigantea*) en el control del tizón tardío de la papa. *Revista Scielo*, 11(2): 29-36.
- Andrango, A. 2017. Uso de extractos de Penco azul (*Agave americana*) y hongos de sombrero (*Estrobilurus tenacellus*) como preventivos del tizón tardío

- (*Phytophthora infestans*) en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Chaucha amarilla. (Tesis de grado). Universidad Técnica de Ambato. 6-10.
- Apaza, R; Smeltekop, H; Flores, Y; Almanza, G; Salcedo, L. 2016. Efecto de saponinas de *Chenopodium quinoa Willd* contra el fitopatógeno *Cercospora beticola Sacc.* *Revista Scielo*, 31(1):63-69.
- Bacca, D. 2012. Estudio fotoquímico del jugo de fique de las especies negra común (*Furcraea gigantea*) y una de agila (*Furcraea macrophylla*) de los municipios del Tambo y Guaitarila (Nariño). (Tesis de grado). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Química, Nariño, Colombia. 30-37.
- Bernal, A; Fleites, A; Sosa, R. 2014. Actividad antifúngica de extractos acuosos de *Spathodea campanulata Beauv* sobre la roya del frijol común (*Uromyces phaseoli Pers. (Wint)* var. *typica Arth.*). *Revista Scielo*, 43(1): 55-61.
- Bolaños, A. 2015. Evaluación de diferentes orígenes de semilla de papa (*Solanum tuberosum L.*) provenientes de tres Sistemas de Producción en dos localidades de la Sierra ecuatoriana (tesis de grado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- CABI (Centre for Agricultural Bioscience International); EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria). 2017. *Puccinia pittieriana*. Data Sheets on Quarantine Pests.
- CABI (Centre for Agricultural Bioscience International). 2019. *Puccinia pittieriana* (roya común de la papa).
- Cano, G. 2016. Evaluación de tres extractos vegetales para el control de plagas en el cultivo de frijol arbustivo *Phaseolus vulgaris L.* Tesis de grado. Universidad de Manizales. 37-39.

- Cardona, L; Castaño, J; Caballos, N. 2016. Epidemiología del Tizón tardío (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) en quince introducciones de tomate silvestre. Revista Scielo, 19(1): 45-54.
- Carreño, N; Vargas, A; Bernal, A; Restrepo, S. 2007. Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia. Una revisión Agronomía Colombiana, 25(2), 320-329.
- Celis, A; Mendoza, C; Pachón, M. 2009. Revisión: uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses. Universidad de Cundinamarca. 14(1):5-16.
- Coca, M. 2012. Tizón tardío de la papa causado por *Phytophthora infestans*, en Bolivia. Boletín técnico, 6(5): 1-4.
- Echemendia, Y. 2012. *Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. 1-30.
- Egusquiza, R. 2013. Manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo de papa. Cusco, Peru.1-28.
- Escalante, M; Farrera, R. 2004. Epidemiología del tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont de Bary) de la papa en zonas productoras del estado Táchira, Venezuela. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal Redalyl 16(1): 47-54.
- ESPAC (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, Ecuador). 2018. Unidad de Estadísticas Agropecuarias. 18.
- Falconí, C., (Ed). 2013. Manual del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Quito, Ecuador: EDIFARM. 1-59.

- Fonseca, Y; Castellanos, D; León, T. 2011. Efecto Antagónico in vitro de Actinomicetos Aislados de Purines de Chipaca (*Bidens pilosa* L.) Frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Revista Scielo, 64(2): 6111-6119.
- Gamboa, R; Hernández, F; Guerrero, E; Sanchez, A. 2002. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con Extractos Vegetales Metanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* D.C.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.) *Schlecht.*). Revista Mexicana de Fitopatología, 21(1): 13-18.
- García, H; Martínez, A; Hermosa, M; Monte, E; Aguilar, C; Gonzáles, C. 2017. Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de Trichoderma y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestan*. Revista Mexicana de Fitopatología, 35(1):58-79.
- Guerrero, E; Solís, S; Hernández, F; Flores, A; Sandoval, V. 2007. Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* D.C. en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y *Sacc.* y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. Revista Scielo, 25 (1): 1-6.
- Hernández, A; Bautista, S; Velázquez, M. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Revista Fitotecnia Mexicana, 30(2): 119-123.
- Iannacone, J; Torre, M; Alvaríño, L; Cepeda, C; Ayala, H; Argota, G. 2013. Toxicidad de los bioplaguicidas agave americana, *Furcraea andina* (asparagaceae) y *Sapindus saponaria* (sapindaceae) sobre el caracol invasor *melanoides tuberculata* (thiaridae). Asociación Peruana de Helminología e Invertebrados Afines (APHIA), 7(2):1-11.
- Jeger, M; Bragard, C; Caffier, D; Candresse, T; Chatzivassiliou, E. 2017. Pest categorisation of *Puccinia pittieriana*. The EFSA Journal is a publication of the European Food Safety Authority, an agency of the European Union.1-22.

- León, L. 2017. Malherbología – Malezas en cultivos anuales y hortalizas: *Chenopodium álbum*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias – INIA.
- Martínez, S; Terrazas, E; Álvarez, T; Mamani, O; Vila, J; Mollinedo, P. 2010. Actividad antifúngica *IN VITRO* de extractos polares de plantas del genero *baccharis* sobre fitopatógenos. *Revista Scielo*, 27(1): 1-6.
- Mesa, V; Marín, P; Ocampo, O; Calle, J; Monsalve, Z. 2017. Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Medellín, Colombia. 1-8.
- Montes, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Scielo*, vol 29: 1-6.
- Moreno, S; Gonzales, L; Salcedo, S; Cardenas, M; Perales, A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de Gobernadora (*Larrea tridentata l.*) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* *Revista Scielo*, (32): 1-7.
- Pérez, A; Rojas, J; Chamorro, L; Pérez, K. 2011. Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum spp.* Universidad Nacional de Colombia, 60(2): 158-164.
- Pérez, W; Forbes, G. 2008. MANUAL TÉCNICO El tizón tardío de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú.
- Pumisacho, M; Sherwood, S (Ed). 2002. El cultivo de la papa en Ecuador. Quito, Ecuador: INIAP-CIP.
- Ramírez, L; Díaz, H. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portuga*, (33): 1-5.
- RAIF (Red de Alerta e Información Fitosanitaria de Andalucía). 2014. Roya (*Puccinia spp.*). Ficha técnica: Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural. 1-4.

- Realpe, E. 2010. Evaluación de la eficiencia de fungicidas protectantes y sistémicos para el control de tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en el cultivo de papa en San Pedro de huaca provincia del Carchi. (Tesis de grado). Universidad técnica del Norte.
- Russo, S; Yaber, M; Leicach, S. 2011. Efecto de extractos de *Chenopodium album* L. sobre los estados larval y adulto de *Oryzaephilus surinamensis* L. (*Coleoptera:Silvanidae*). Revista Scielo, 29(1): 51-57.
- Solarte, R; Osorio, O. 2014. Evaluación de la Concentración del Jugo de Figue (*Furcraea spp*) para el Control In Vitro de *Phytophthora infestans* en Plantas de Papa (*Solanum tuberosum* L). Revista Scielo, 25(5): 47-54.
- Torres, H. 2002. Manual de las enfermedades más importantes de la Papa en el Perú. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP).
- USDA (United States Department Of Agriculture). 2010. Patata común y roya del tomate *Puccinia pittieriana*. Micología y microbiología sistemática. 1- 4.
- Valero, J; González, C; González, R. 2014. Efecto de los extractos acuosos de hojas de plantas de gobernadora (*Larreas tridentata*), hojasesn (*Flourensia cernua*) y encino (*Quercus pungens*), sobre el crecimiento micelial in vitro de hongos fitopatógenos. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, 24(5): 13-19.
- Villa, A; Pérez, R; Morales, H; Basurto, M; Soto, J; Martines, E. 2014. Situación actual en el control de *Fusarium spp.* y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, 64(2): 194-205.
- Vivanco, J; Cosio, E; Loyola, V; Flores, H. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. 1-8.

Yépez, L. 2016. Validación de estrategias de manejo del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) de la papa, en tres variedades, Píllaro, 2016. (Tesis de grado). Universidad Central del Ecuador.

Zuluaga, C; Buritica, P; Marin, M. 2008. Generalidades de los Uredinales (Fungi: Basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. Revista Scielo, 14(1):41-5

6.3. ANEXOS

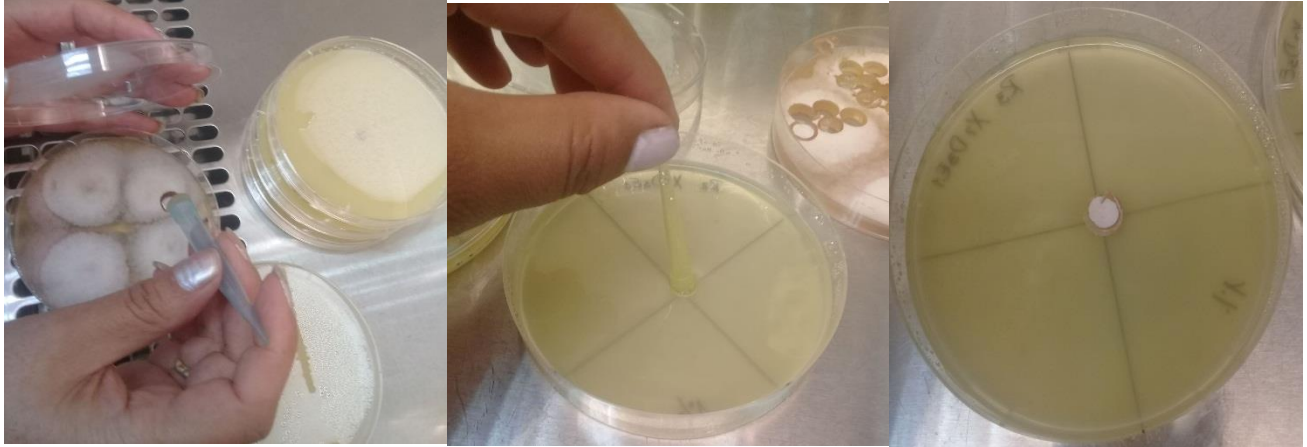
ANEXO 1: PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.



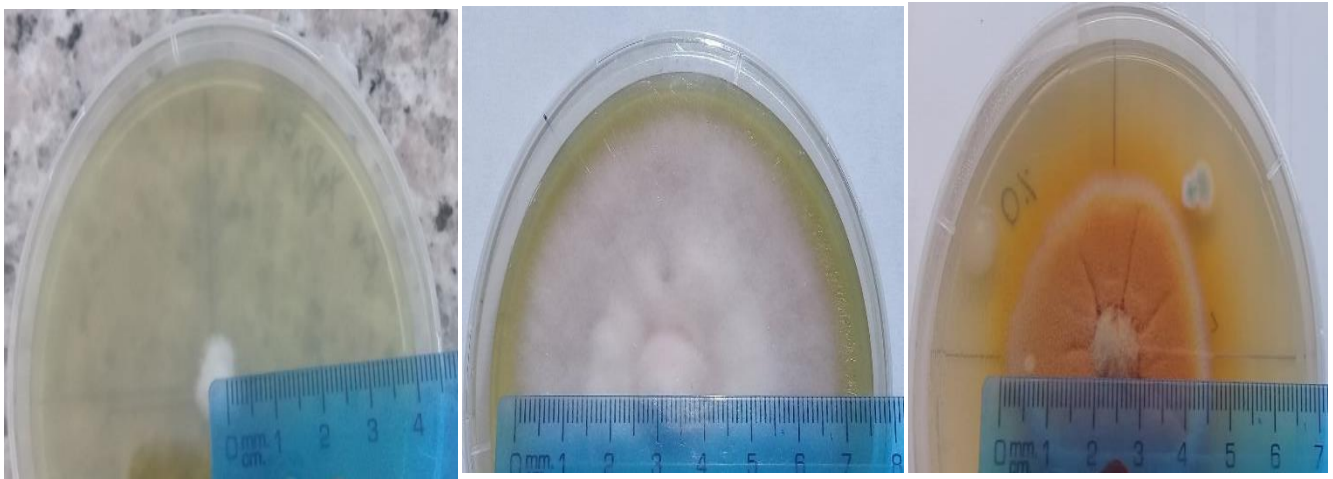
ANEXOS 2: REPRODUCCIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS (*Phytophthora infestans*, *Puccinia pittieriana*)



ANEXO 3: SIEMBRA DE HONGOS FITOPATÓGENOS, EN LOS MEDIO DE CULTIVO QUE CONTIENEN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.



ANEXO 4: TOMA DE DATOS PARA DETERMINAR EL CRECIMIENTO MICELIAR DE LOS HONGOS Y EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN



ANEXO 5: CRECIMIENTO MICELIAR DE *Phytophthora infestans* A LAS 168 HORAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES CON EXTRACTO DE ASHPA QUINUA, CABUYA NEGRA Y CABUYA BLANCA MAS EL TESTIGO (METALAXIL)



Extracto de ashpa quinua

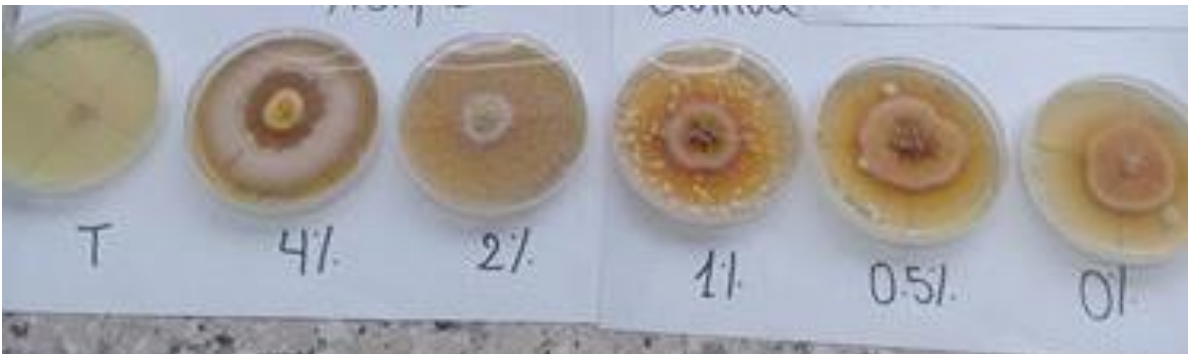


Extracto de cabuya negra



Extracto de cabuya blanca

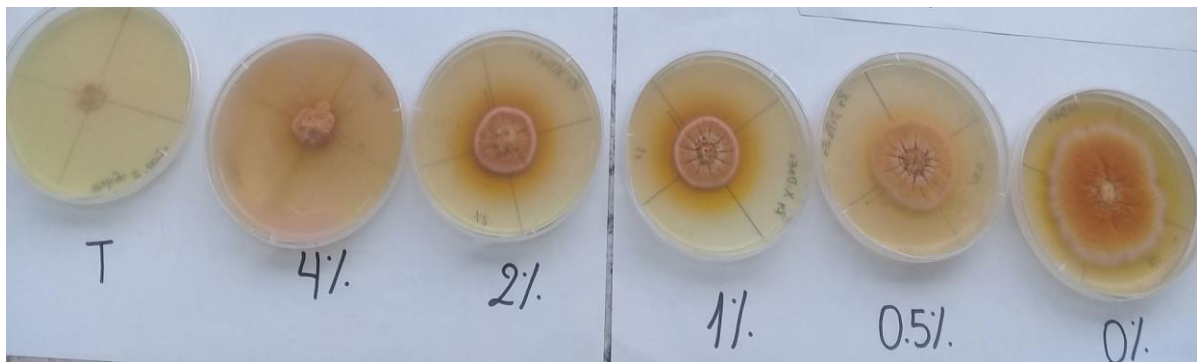
ANEXO 6: CRECIMIENTO MICELIAR DE *Puccinia pittieriana* A LAS 168 HORAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES CON EXTRACTO DE ASHPA QUINUA, CABUYA NEGRA Y CABUYA BLANCA, MAS EL TESTIGO COMERCIAL (OXICARBOXIN 75%)



Extracto de ashpa quinua



Extracto de cabuya negra



Extracto de cabuya blanca