



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA
EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Evaluación de la actividad antifúngica de un extracto alcohólico de hierba mora (*Solanum nigrum*) frente a oídio (*Oidium sp.*) y fusarium (*Fusarium sp.*)

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Esteban Nicolay Albán Tapia

Tutor: Ph.D. Orestes Darío López Hernández

Ambato-Ecuador

Marzo 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de enero de 2023

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

C.I: 1754784864

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Esteban Nicolay Albán Tapia, manifiesto que los resultados determinados en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Esteban Nicolay Albán Tapia', enclosed within a rectangular box. The signature is stylized and cursive.

.....
Esteban Nicolay Albán Tapia

C.I. 0504189663

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Mg. Dolores del Rocío Robalino Martínez

C.I: 1801769488

Presidente del Tribunal

BQF. Irvin Ricardo Tubón Usca Ph.D.

C.I: 0604250357

Mg. Danae Fernández Rivero

C.I: 1757181209

Ambato, 06 de marzo de 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....

Esteban Nicolay Albán Tapia

C.I. 0504189663

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres Mauricio y Rosario quienes, gracias a su amor, cariño, enseñanzas y apoyo incondicional, me han dado la fortaleza para alcanzar las metas que me he propuesto, siempre guiándome hacia un mejor futuro y llenando de felicidad cada uno de mis pasos. Gracias a todo su esfuerzo puedo cumplir un sueño más.

A mis hermanos Alex y Camilo, mis abuelitos Nicolás y Amada y a mi tía Estely, que siempre han velado por mi bienestar apoyándome en cada circunstancia colmando de alegría cada recuerdo con su presencia.

A mi novia Paula, mi mejor amiga y confidente fiel, a quien desde que conocí ha complementado cada parte de mi vida, incentivándome a ser mejor cada día y permaneciendo a mi lado en toda situación.

A mis mejores amigos Marco y Bryan, con quienes comparto los recuerdos más descabellados de mi adolescencia y que siempre han demostrado ser personas incondicionales con las que he podido y puedo contar.

A mis amigos que hice en la facultad, Diego T., Nathasha V., Diego R., Bryan N., Cynthia M. y Samy S., quienes forman parte de todos mis agradables recuerdos dentro y fuera de la universidad e hicieron de este tiempo uno de los mejores de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi querida familia que siempre ha estado conmigo en cada momento importante de mi vida, enseñándome muchos valores que me han formado y brindándome su cariño en cada paso que he dado.

Al Ph.D. Orestes López, mi tutor de tesis, quien con su invaluable guía y apoyo pude culminar con el presente trabajo de investigación.

A todos mis profesores, quienes con su conocimiento aportaron en mi formación académica y me dieron la oportunidad de superarme cada día.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO 1	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1 Hongos fitopatógenos	1
1.1.2 <i>Oidium sp.</i>	3
1.1.3 <i>Fusarium sp.</i>	6
1.1.4 Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)	9
1.1.4.1 Alcaloides.....	11
1.1.4.2 Cumarinas	13
1.1.4.3 Taninos.....	13
1.1.4.4 Flavonoides	13
1.1.4.5 Terpenos.....	13
1.1.4.6 Saponinas	14
1.1.5 Captan (Orthocide).....	14
1.1.6 Extractos vegetales.....	14

1.1.6.1 Compuestos orgánicos vegetales.....	16
1.1.7 Actividad antifúngica de extractos vegetales	18
1.1.8 Metabolitos secundarios de las plantas	19
1.1.8.1 Terpenos.....	22
1.1.8.2 Compuestos Fenólicos	23
1.1.8.3 Glucósidos.....	26
1.1.8.4 Alcaloides.....	26
1.2 Objetivos	27
1.2.1 Objetivo General	27
1.2.2 Objetivos Específicos.....	28
CAPÍTULO 2	29
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	29
2.1 Materiales y Equipos.....	29
2.1.1 Equipos.....	29
2.1.2 Materiales	32
2.2 Ubicación del lugar	32
2.2.1 Opafyora E.U.R.L	32
2.2.2 Equaflores	34
2.2.3 Fase de Laboratorio.....	35
2.3 Material vegetal.....	36
2.4 Extracto alcohólico de la planta hierba mora	36
2.4.1 Preparación del material vegetal	36
2.4.2 Preparación del extracto alcohólico	37
2.4.3 Dilución del extracto alcohólico	37
2.5 Preparación del medio de cultivo.....	38
2.6 Aislamiento de hongos.....	39

2.6.1 Aislamiento de hongos a partir del material vegetal.....	39
2.6.2 Aislamiento de cultivos puros.....	41
2.6.2.1 Identificación macroscópica y microscópica de las cepas.....	41
2.6.2.2 Preparación del cultivo puro.....	41
2.7 Modelo experimental.....	41
2.7.1 Tratamientos.....	42
2.8 Análisis de la actividad antifúngica.....	44
2.8.1 Preparación del inóculo.....	44
2.8.2 Siembra del inóculo y colocación del disco de papel.....	44
2.8.3 Medición del halo de inhibición.....	45
2.8.4 Conteo de esporas.....	45
2.9 Diseño experimental.....	46
2.9.1 Tipo de diseño.....	46
2.10 Hipótesis.....	48
CAPÍTULO 3.....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
3.1 Obtención del extracto alcohólico.....	49
3.2 Obtención de los hongos a partir del material vegetal contaminado.....	50
3.3 Detección de la actividad antifúngica.....	53
3.4 Análisis de varianza.....	58
CAPÍTULO 4.....	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
4.1 Conclusiones.....	62
4.2 Recomendaciones.....	63
Bibliografía.....	64
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica del hongo <i>Oidium</i>	4
Tabla 2 Clasificación taxonómica del hongo <i>Fusarium</i>	7
Tabla 3 Clasificación taxonómica de de la hierba mora.....	10
Tabla 4 Clasificación de compuestos fenólicos de acuerdo a su tipo de esqueleto.....	25
Tabla 5 Equipos utilizados en el proceso experimental.....	29
Tabla 6 Materiales utilizados en el proceso experimental.....	32
Tabla 7 Ubicación geográfica de la empresa Opafyora E.U.R.L.....	33
Tabla 8 Ubicación geográfica de la empresa Equaflores.....	35
Tabla 9 Ubicación de los laboratorios de la FCIAB-UTA.....	35
Tabla 10 Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 1.....	42
Tabla 11 Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 2.....	42
Tabla 12 Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 3.....	43
Tabla 13 Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 4.....	43
Tabla 14 Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 5.....	44
Tabla 15 Esquema del análisis de varianza.....	47
Tabla 16 Factores para el análisis estadístico de los géneros de hongos.....	47
Tabla 17 Resultados del proceso de obtención del extracto alcohólico.....	49
Tabla 18 Cultivos puros de <i>Oidium sp.</i> y <i>Fusarium sp.</i>	51
Tabla 19 Observación microscópica de las estructuras de <i>Oidium sp.</i> y <i>Fusarium sp.</i>	52
Tabla 20 Crecimiento de la muestra 2 de <i>Oidium sp.</i> frente a los tratamientos establecidos.....	53
Tabla 21 Valor promedio del diámetro de inhibición de las tres muestras de cada tratamiento para <i>Oidium sp.</i>	55

Tabla 22 Crecimiento de la muestra 2 de <i>Fusarium sp.</i> frente a los tratamientos establecidos.....	56
Tabla 23 Valor promedio del diámetro de inhibición de las tres muestras de cada tratamiento para <i>Fusarium sp.</i>	57
Tabla 24 Crecimiento de la muestra 1 de <i>Oidium sp.</i> frente a los tratamientos establecidos.....	74
Tabla 25 Crecimiento de la muestra 3 de <i>Oidium sp.</i> frente a los tratamientos establecidos.....	75
Tabla 26 Crecimiento de la muestra 1 de <i>Fusarium sp.</i> frente a los tratamientos establecidos.....	76
Tabla 27 Crecimiento de la muestra 3 de <i>Fusarium sp.</i> frente a los tratamientos establecidos.....	77
Tabla 28 Medición del halo de inhibición en <i>Oidium sp.</i>	78
Tabla 29 Medición del halo de inhibición en <i>Fusarium sp.</i>	79
Tabla 30 Repetición 1 del conteo de conidios de <i>Oidium sp.</i>	89
Tabla 31 Repetición 2 del conteo de conidios de <i>Oidium sp.</i>	90
Tabla 32 Repetición 3 del conteo de conidios de <i>Oidium sp.</i>	91
Tabla 33 Repetición 1 del conteo de conidios de <i>Fusarium sp.</i>	83
Tabla 34 Repetición 2 del conteo de conidios de <i>Fusarium sp.</i>	84
Tabla 35 Repetición 3 del conteo de conidios de <i>Fusarium sp.</i>	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo del patógeno que provoca el mildiú polvoroso.	5
Figura 2 Aislamiento de <i>Fusarium</i> sp. en medio PDA y observación de estructuras en el microscopio.	8
Figura 3 Estructura química de la Solanina.	12
Figura 4 Principales vías metabólicas de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas.	18
Figura 5 Rutas de biosíntesis de diversos metabolitos secundarios.	21
Figura 6 Rutas de síntesis de terpenos y su clasificación.	23
Figura 7 Rutas de síntesis de diversos compuestos fenólicos.	24
Figura 8 Síntomas de la presencia de <i>Fusarium</i> sp. en alelí.	33
Figura 9 Síntomas de la presencia de <i>Oidium</i> sp. en la rosa.	34
Figura 10 Material vegetal usado para el aislamiento de hongos. A) hojas de rosa con oídio. B) Tallos de alelí con <i>Fusarium</i>	39
Figura 11 Aislamiento de <i>Fusarium</i> sp a partir de material vegetal.	40
Figura 12 Aislamiento de <i>Oidium</i> sp a partir de material vegetal.	40
Figura 13 Gráfico de medias del conteo de conidios de <i>Oidium</i> sp.	58
Figura 14 Gráfico de medias del conteo de conidios de <i>Fusarium</i> sp.	60

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Material vegetal muestreado. a) Hojas de rosa (<i>Rosa</i> sp.); b) Flores de alelí (<i>Matthiola incana</i>).	70
Anexo 2 Material fúngico aislado de las hojas de rosa (<i>Rosa</i> sp.) en medio PDA....	70
Anexo 3 Material fúngico aislado de los tallos de alelí (<i>Matthiola incana</i>) en medio PDA.....	70
Anexo 4 Preparación de los cultivos puros a partir de las cepas aisladas del material vegetal. a) <i>Oidium</i> sp.; b) <i>Fusarium</i> sp.	71
Anexo 5 Proceso de obtención del extracto alcohólico. a) Secado del material vegetal; b) Maceración de la hierba mora; c) Filtración del extracto obtenido; d) Material vegetal recuperado de la filtración.	71
Anexo 6 Obtención del extracto alcohólico de hierba mora. a) Extracto filtrado; b) Evaporación del alcohol; c) Extracto concentrado al 100 %.	71
Anexo 7 Tratamientos usados en el ensayo experimental.	72
Anexo 8 Técnica de difusión en disco. a) Tratamiento 1; b) Tratamiento 2; c) Tratamiento 3; d) Tratamiento 4; e) Tratamiento 5.	72
Anexo 9 Cámara de Neubauer. a) Preparación de la muestra; b) Observación de la cámara de Neubauer bajo el microscopio con 4x aumentos	72
Anexo 10 Conteo de conidios de <i>Oidium</i> . a) Observación con 40x aumentos; b) Observación con 100x aumentos.	73
Anexo 11 Conteo de conidios de <i>Fusarium</i> . a) Observación con 40x aumentos; b) Observación con 100x aumentos.	73
Anexo 12 Resultados del ANOVA de la variable de interés para <i>Oidium</i> sp. en Statgraphics.....	86
Anexo 13 Resultados del ANOVA de la variable de interés para <i>Fusarium</i> sp.	87

RESUMEN

El extracto alcohólico de hierba mora se elaboró con el método de maceración haciendo uso de etanol al 70 por ciento como solvente. Se prepararon dos soluciones con agua destilada para obtener tres tratamientos con concentraciones de 50, 75 y 100 por ciento de extracto, considerando al extracto obtenido con la concentración al 100 por ciento. Los hongos fueron recogidos de hojas de rosas y de tallos de alelí, y sembrados en cajas petri con medio PDA a 25 grados Celsius. La actividad antifúngica del extracto fue evaluada mediante difusión en disco y se midió el diámetro del halo de inhibición a las 48, 72, 96 y 144 horas de incubación de los inóculos; además se realizó 3 repeticiones del conteo de conidios a las 144 horas para elaborar un diseño de bloques completamente al azar en el que se registró la concentración de conidios por mililitro como variable de interés. El extracto no tuvo efectos sobre oídio ya que no se generó un halo de inhibición en los tratamientos preparados con el extracto, además la concentración de conidios por mililitro fue superior a la del tratamiento de control positivo. En cuanto al fusarium, el tratamiento con el 100 por ciento de concentración de extracto mostró el mayor halo de inhibición a las 48 horas, pero la concentración de conidios por mililitro evaluada con extracto tuvo un valor promedio mayor que el tratamiento de control positivo, demostrando que el extracto tiene actividad antifúngica en un corto periodo de tiempo.

Palabras clave: Oídio, fusarium, hierba mora, extracto alcohólico, hongos fitopatógenos, compuestos naturales.

ABSTRACT

The alcoholic extract of blackberry herb was prepared by the maceration method using 70 percent ethanol as solvent. Two solutions were prepared with distilled water to obtain three treatments with concentrations of 50, 75 and 100 percent of extract, considering the extract obtained with the 100 percent concentration. The fungi were collected from rose leaves and allelis stems, and sown in petri dishes with PDA medium at 25 degrees Celsius. The antifungal activity of the extract was evaluated by disk diffusion and the diameter of the inhibition halo was measured at 48, 72, 96 and 144 hours of incubation of the inocula; in addition, 3 replicates of the conidia count at 144 hours were carried out to elaborate a completely randomized block design in which the concentration of conidia per milliliter was recorded as the variable of interest. The extract had no effect on powdery mildew since no inhibition halo was generated in the treatments prepared with the extract, and the concentration of conidia per milliliter was higher than that of the positive control treatment. As for fusarium, the treatment with 100 percent extract concentration showed the greatest inhibition halo at 48 hours, but the concentration of conidia per milliliter evaluated with extract had a higher average value than the positive control treatment, demonstrating that the extract has antifungal activity in a short period of time.

Key words: *Oidium*, *Fusarium*, blackberry herb, alcoholic extract, plant pathogenic fungi, organic compounds.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Hongos fitopatógenos

Los hongos son un extenso grupo de organismos eucariotas generalmente microscópicos, pueden ser unicelulares o multicelulares, son heterótrofos, omnipresentes y muchos de ellos poseen una pared celular con contenido de quitina, celulosa o los dos componentes juntos, los cuales se encuentran empapados en una matriz de polisacáridos y glicoproteínas. Su reproducción es por medio de propágulos que en su mayoría son esporas, las cuales se forman a partir de mecanismos sexuales o asexuales y se desarrollan en sitios húmedos con poca luz (**Garcés de Granada et al., 2003**). Gran parte de las especies son mesófilas ya que se desarrollan en un rango de temperatura entre 20 y 30 °C, además tienden a crecer con humedades relativas que superan el 60 % y su pH óptimo de crecimiento es entre 4 y 7. El talo o cuerpo vegetativo puede ser unicelular como es el caso de las levaduras, o plurinucleado como en la mayoría de hongos; en este último caso al soma del hongo se le denomina micelio, y está formado por un conjunto de filamentos tubulares ramificados que se llaman hifas. Para la identificación de los hongos la principal característica que se debe determinar es si el micelio presenta o no tabiques transversales; es decir que, si las hifas presentan divisiones el micelio es septado, caso contrario el micelio es cenocítico (**Granados, 2018**). En cuanto a la taxonomía de los hongos éstos pertenecen a la División Mycota, la cual presenta dos subdivisiones: Myxomycota (hongos fagocíticos que no poseen pared celular, como los mohos mucilaginosos) y Eumycota (hongos verdaderos, generalmente filamentosos y adquieren nutrientes por absorción). La gran mayoría de hongos pertenecen al grupo de hongos verdaderos, por lo que debido a su extensa diversidad se han determinado tres clases bien definidas: Ficomycetes, Ascomycetes y Basidiomycetes; también existe una cuarta clase que concierne a los hongos imperfectos, aunque no es reconocida globalmente (**González, 1980**).

Existen alrededor de 144.000 especies de hongos descritas, de las cuales se conoce que aproximadamente 100.000 especies son estrictamente saprófitas y al menos 50

especies pueden llegar a infectar a los seres humanos y animales, provocando enfermedades superficiales en la piel. Aunque varios hongos mantienen una relación de simbiosis con su hospedero, como es el caso de los líquenes y las micorrizas; existen otros que llegan a producir daños en las plantas como es el caso de los hongos fitopatógenos. De este grupo se conoce un estimado de 8000 especies que son capaces de infectar no solo a un género de plantas, sino a varios. Los microorganismos que más atacan a distintas especies de plantas son los hongos y las bacterias, aunque las especies de hongos son las que se presentan con mayor frecuencia debido a su capacidad de adaptación y supervivencia (**Granados, 2018**). Según **Cotes et al. (2018)** los diez principales hongos que son considerados como el grupo más importante de los patógenos foliares a nivel mundial catalogados por la revista *Molecular Plant Pathology*, debido al impacto que generan en el follaje y en diferentes órganos de la planta son: *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinérea*, *Puccinia spp.*, *Fusarium sp.*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminícola*, *Colletotrichum spp.*, *Ustilago maydis* y *Melampsora lini*. De manera general y en dependencia al tipo de plantas que parasiten, los efectos que los hongos pueden llegar a generar en las plantas son: daños del sistema vascular y/o radicular, necrosis del tejido vegetal, atrofia completa o parcial, hipertrofia y marchitez. Estos síntomas se pueden ver a simple visto porque dichas alteraciones están relacionadas con problemas en el tejido como es la hipertrofia, hiperplasia, plasmólisis y otras (**Juárez et al., 2010**).

Estos organismos pueden presentar un ciclo de vida diferente, de manera que pueden hallarse dos fases: sexual y asexual. En estas dos fases se puede presenciar el crecimiento de micelio y con ello se pueden diferenciar los grupos a los que pertenecen, ya que, si las hifas son cenocíticas son parte del grupo chromista, si son septadas son ascomicetes y si muestran septos dolíporos son basidiomicetes. En la fase asexual, la cual es la más común, se pueden diferenciar estructuras como esporangióforos, esporangios, zoosporas, conidióforos, picnidios, acérvulos, esporodóquios y conidios; mientras que en la fase sexual se puede hallar oogonios, anteridios, ooporas, peritecios, cleistotecios, apotecios, uredosporas y teliosporas (**Granados, 2018**).

1.1.2 *Oidium* sp.

El *Oidium*, también conocido como oídio, cenicilla polvorienta o mildiú polvoroso es un patógeno biótrofo obligado ya que sólo puede desarrollarse en huéspedes vivos, provocando una enfermedad que es fácil de reconocer y que registra una distribución a nivel mundial donde se encuentran especies con reproducción sexual o asexual. Puede llegar a contaminar una extensa variedad de cultivos de producción vegetal, frutal y ornamental, siendo estos últimos de mayor interés ya que puede llegar a deformar las flores, dañando el aspecto estético de la planta y con ello reduciendo su costo en el mercado. Las plantas que resultan ser más sensibles a su infección son el rosal, dalias, geranios, lilas, tulipanes y muchos más (**Cumbal, 2021**). Este patógeno se ve favorecido en lugares con una temperatura fluctuante entre 15 - 30 °C además de una humedad relativa entre el 70 – 79 % durante el día. La enfermedad se presenta en forma de polvo blanco, ya que su micelio de color blanco o grisáceo cubre la superficie del tejido vegetal joven y, en un periodo relativamente corto, puede llegar a cubrir todo el tejido con hifas polvorientas que provocan que las hojas se enchinen y se deformen durante su desarrollo. Las lesiones que se generan en las hojas es que pueden ser decoloradas en diferentes rangos de severidad, y hasta pueden llegar a ser necróticas (**Badillo, 2017**).

Las especies que provocan la enfermedad del mildiú polvoroso pueden crecer con las dos fases reproductivas en el mismo huésped, ya que como menciona **Cisneros (2019)** “en los rosales la fase dominante se encuentra en su estado asexual o anamorfo, clasificado como *Oidium leucoconium* el cual presenta la característica de que en su ciclo de vida se encuentre una sola fase conídica; mientras que en su fase sexual o teleomorfa se lo clasifica como *Sphaerotheca pannosa* debido a la formación de cuerpos fructíferos denominados cleistotecios”. Por lo tanto, de acuerdo a las características previamente mencionadas, la clasificación taxonómica que tienen estos hongos se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1*Clasificación taxonómica del hongo Oidium.*

Fase Sexual		Fase Asexual	
Reino:	Fungi	Reino:	Fungi
Phylum:	<i>Ascomicota</i>	Phylum:	<i>Deuteromycota</i>
Clase:	<i>Ascomycetes</i>	Clase:	<i>Deuteromycetes</i>
Subclase:	<i>Erythromycetidae</i>	Orden:	<i>Moniliales</i>
Orden:	<i>Erysiphales</i>	Género:	<i>Oidium</i>
Familia:	<i>Erysiphaceae</i>	Especie:	<i>leucoconium</i>
Género:	<i>Sphaerotheca</i>		
Especie:	<i>pannosa</i>		

Nota: Recuperado de (Cisneros, 2019)

El ciclo de la enfermedad puede presentar dos fases como se mencionó anteriormente, en la Figura 1 se puede apreciar un esquema que muestra dicho ciclo. El desarrollo asexual de este patógeno presenta las características de un hongo deuteromicetes. La infección comienza una vez que los conidios tocan la superficie del tejido vegetal, al cabo de 2 a 4 horas inicia la germinación formando el conjunto de hifas septadas con células uni-nucleadas que conforman el micelio. Para que este hongo parásito obtenga los nutrientes necesarios ingresa en las células epidérmicas de las plantas por medio de haustorios lobulados y una vez alojado empieza con el desarrollo de hifas cortas y erectas llamadas conidióforos, las cuales son estructuras que producen cadenas que contienen de 5 a 10 conidios con forma elipsoide-ovoide de 22.9 – 28.6 µm de largo y 13.6 – 15.8 µm de ancho; además tienen la capacidad de dar lugar a un nuevo ciclo del patógeno en un periodo aproximado entre 72 y 96 horas. Por otra parte, en cuanto su desarrollo sexual este es característico de un ascomiceto por la formación de un cuerpo fructífero denominado cleistotecio, el cual es originado a partir de la unión entre dos

hifas que pertenecen a grupos sexuales distintos (ascogonio y anteridio). La forma que presentan los cleistotecios es globosa y presentan un diámetro de entre 85 y 120 μm . De estas estructuras emergen ascas de forma oblonga – globosa que miden de 88 a 115 μm de largo y, estas a su vez, dispersan ascosporas maduras y unicelulares que tienen entre 20 y 27 μm de largo y entre 12 y 15 μm de ancho (**Perilla & Sanabria, 2007**).

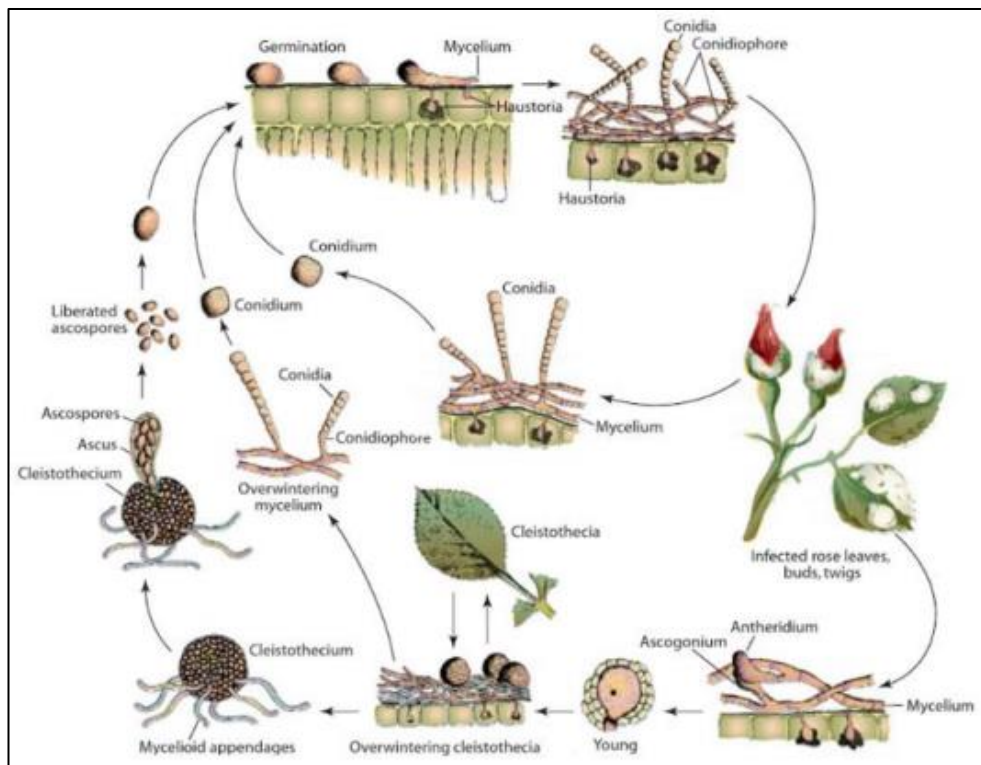


Figura 1 Ciclo del patógeno que provoca el mildiú polvoroso.

Fuente: (**Cisneros, 2019**)

Las prácticas que se usan para evitar contraer este patógeno, según **Guevara (2015)** son que “el cultivo debe llevar un manejo preventivo, es decir, básicamente tiene que mantenerse limpio y con buena aireación, se deben realizar podas bien hechas para reducir la presión del inóculo”, y en el caso de que se efectúe la aparición del patógeno en el cultivo “se deberá realizar un control químico basado en la aplicación de productos a base de azufre tales como Kumulus, Elosal y otros”. De igual manera **Toapanta (2018)** menciona que “los fungicidas sistémicos a base de azufre han arrojado los mejores resultados de control frente a esta plaga, además de controlar otros problemas como ácaros y adaptarse como nutriente para la planta”.

1.1.3 *Fusarium sp.*

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, que tienen una extendida variedad de especies por todo el mundo, capaces de infectar a varios grupos de plantas. Algunas especies pueden provocar infecciones oportunistas tanto en personas como animales o generar toxinas que de igual manera perjudican a los mencionados, aunque también es puntual mencionar que ciertas especies de este género son utilizadas como control biológico ocasionadas por especies patógenas. Poseen la capacidad de sobrevivir en el suelo cuando no tienen un hospedero cerca, ya sea como micelio o como esporas, pero cuando comienzan una infección lo hacen a través de la absorción de agua y nutrientes en las raíces o por encima del suelo en la base del tallo de la planta. Las enfermedades que puede ocasionar este fitopatógeno al tejido vegetal constan de marchitamientos vasculares, manchas en las hojas y pudrición de raíces, tallos, frutos y semillas (Leyva et al., 2017). La taxonomía que presenta este género de hongo es controversial debido a que tiene una extensa variabilidad genética y la clasificación de especies no llega a un claro consenso entre diversos taxónomos, ya que como menciona Torres (2000) “especialistas como Gordon considera que existen 26 especies, Booth 44 especies, Wollenweber y Reinking 65 especies y Gerlach 78 especies”, además recalca que los fitopatógenos pertenecientes al género *Fusarium* son relativamente fáciles de identificar pero llegado el momento de establecer su especie se presentan grandes dificultades. Por tal motivo estos hongos presentan una amplia capacidad para colonizar a distintos tipos de hospederos, muchas especies pueden acoplarse a las condiciones a las que están expuestas o simplemente sufren mutaciones en un tiempo relativamente corto, lo cual explica lo mencionado con anterioridad. Actualmente, estos hongos han sido considerados como un género dentro de los ascomicetos, por lo que su clasificación taxonómica puede ser apreciada en la Tabla 2;**Error! No se encuentra el origen de la referencia.:**

Tabla 2

Clasificación taxonómica del hongo Fusarium.

Reino	Fungi
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Orden	<i>Hypocreaceae</i>
Familia	<i>Nectriaceae</i>
Género	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>F. oxysporum, F. solani, F. verticillioides, otros.</i>

Nota: Recogido de (Albán, 2021)

Las características que este género presenta varían conforme la especie con la que se esté tratando, además del medio de cultivo en el que se desarrolle. El medio usualmente utilizado es el PDA, en éste se han observado morfologías de colonias con un micelio algodonoso, el lado frontal es de color blanco y en el reverso predominan pigmentos café, rojo, violeta, naranja, gris y blanco (Monzón & Rodríguez, 2018). Como se observa en la Figura 2 de manera general en su morfología microscópica revela fiálides finas en forma de botella que pueden ser simples o ramificadas, largas o cortas; éstas a su vez podrían ser monofialídicas o polifialídicas dependiendo del número poros que presente. Pueden exhibir macroconidios hialinos, septados (entre 2 y 5 septos) en forma de media luna con dimensiones de 27 a 60 µm de largo y 3 a 5 µm de ancho, al igual que microconidios de varias formas o agrupaciones en cadenas largas o cortas y con dimensiones estructurales de 1 a 16 µm de largo por 1 a 4.5 µm de ancho. También desarrollan clamidosporas con doble pared, la cual puede ser lisa, gruesa o rugosa debido a que es una de las estructuras más resistentes del hongo ya que le permite sobrevivir a las condiciones en las que se encuentre; sus dimensiones pueden ser de entre 5 y 15 µm de largo con 10 µm de ancho (Tapia & Amaro, 2014). La reproducción que estos hongos presentan puede ser sexual o asexual; en la fase sexual

se juntan dos células haploides que forman una ascospora con la capacidad de liberar hasta ocho esporas que pueden germinar en condiciones, mientras que en la fase asexual no existe la fusión de células ya que se generan conidios los cuales tienden a propagarse (Aguirre, 2020).



Figura 2 Aislamiento de *Fusarium sp.* en medio PDA y observación de estructuras en el microscopio.

Fuente: (Leslie & Summerell, 2008)

Al igual que otros fitopatógenos, este género de hongos utiliza diversas formas para infectar a su hospedero y, esto varía respecto a la especie con la que se esté tratando. Según Villa et al. (2015) “Para que la infección se logre con éxito, este hongo debe mover varios genes para la señalización temprana del hospedero, la adhesión a su superficie, la descomposición de barreras físicas con enzimas, la descomposición de compuestos antifúngicos y la inactivación y muerte de las células del anfitrión a través de la segregación de toxinas”. Es por ello que las señales de transducción para el desarrollo del hongo, los complejos proteicos y la secreción de enzimas hidrolíticas como celulasas, proteasas, pectinasas y quitinasas que sirven para degradar las barreras físicas del huésped, son parte crucial en la formación de las estructuras que promueven la infección. Frente a este ataque, las plantas reaccionan a través de la producción de especies reactivas del oxígeno, el incremento de genes de protección y la producción de compuestos antibióticos como las fitoalexinas o compuestos con la capacidad para fortalecer la pared celular. Es importante destacar que varias especies de este género no solo tienen la capacidad de inhibir las funciones de ciertas sustancias tóxicas que son producidas por el hospedero al que ataca, sino que además puede producir sus propias toxinas que le permiten aumentar su poder viral. Sus fitotoxinas, tales como las eniantinas y el ácido fusárico afectan únicamente a las plantas. Por otro lado, sus

micotoxinas son capaces de intoxicar a los animales con tricotecenos y fumonisinas (Groenewald et al., 2006; Villa et al., 2015).

Respecto a varios estudios de sensibilidad aplicados a distintas especies de este género con diferentes agroquímicos, se ha comprobado la resistencia que estos hongos tienen frente a múltiples compuestos que son muy utilizados en las actividades agrícolas para el control de plagas. Según Aguirre (2020) los principales compuestos son benomyl y metil-tiofanato en cuanto al control químico, mientras que para el control biológico se ha utilizado con resultados positivos mezclas de *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas fluorescens*; el único inconveniente que se ha encontrado es que estos antagonistas deben poseer una genética estable para establecer el control.

1.1.4 Hierba mora (*Solanum nigrum*)

La planta hierba mora (*Solanum nigrum*), también conocida como tomatillo del diablo, es una planta herbácea, perenne e inerte, que pertenece a la familia de las Solanáceas y aunque es nativa de Suramérica, también tiene la capacidad de desarrollarse en todo el trópico americano y otros continentes, por lo que se le considera subcosmopolita. Puede crecer entre 30 y 80 cm de altura, presenta hojas abundantes con forma ovalada o rómbica y su pecíolo corto puede tener desde 12 hasta 50 mm de largo. Sus flores generalmente están agrupadas y son de color blanco, sus bayas tienen forma globular con 1 cm de diámetro y un color verdoso que se torna morado oscuro al madurar (Fiallos, 2011). Esta planta es originaria de zonas templadas y cálidas que pueden llegar hasta los 3000 msnm aproximadamente. En cuanto al suelo en el que se desarrolla, Escobar (2017) menciona que generalmente tiende a crecer en suelos ricos en nitrógeno, con contenido de humus y con el pH neutro. Es por esto que se puede formar de manera espontánea entre la maleza, en terrenos de cultivos abandonados, jardines, terrenos baldíos y otros. La clasificación taxonómica que presenta esta planta se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3

Clasificación taxonómica de la hierba mora (Solanum nigrum).

Reino	Plantae
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Sub clase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum nigrum</i>
Nombre vulgar	Hierba mora, tomatillo del diablo, otros

Nota: Recogido de (Fiallos, 2011)

Estudios farmacológicos de esta planta realizados *in vitro*, demuestran que las hojas tienen actividad antibiótica, analgésica y sedante. Por este motivo ha sido objeto de varios análisis puesto que ha demostrado tener un amplio uso medicinal, como es principalmente el tratamiento para padecimientos gastrointestinales, tales como la diarrea, cólico, gastritis, úlcera gástrica; también se ha probado para afecciones respiratorias como la amigdalitis y la tos ferina, inflamaciones, entre otras (**García, 1942**). Se han desarrollado tratamientos anticancerígenos a partir de esta planta y, gracias a ello, varias investigaciones demuestran que los extractos etílicos de hojas y bayas de hierba mora tienen un efecto inhibidor de células cancerígenas, ya que los compuestos activos son capaces de evitar la proliferación de células; de igual manera son utilizadas para enfermedades de la piel, si se extrae el jugo se puede aprovechar en oftalmopatía, también las raíces tienen otras aplicaciones en otopatía, rinopatía, oftalmopatía y hepatitis; de igual manera han presentado un efecto antidiabético, debido a que puede llegar a ser un significativo anti-hiperglicémico (**Castro, 2019**).

Cabe resaltar que, según el tipo de condiciones involucradas con su desarrollo, esta planta puede llegar a ser muy tóxica por su elevada producción de solanina, este glucoalcaloide es el compuesto activo principal que la planta utiliza para defenderse cuando se siente bajo amenaza; se encuentra presente en el tallo, en el fruto y en las hojas en concentraciones diferentes. **(Fiallos, 2011)** Gracias a estudios sobre los efectos adversos que los frutos y hojas de esta planta pueden generar, **Cuasés (2018)** menciona que si el consumo de esta planta es mayor a 30 mg resulta ser perjudicial ya que genera problemas gastrointestinales y neurológicos debido a que actúa como un veneno.

Varias plantas que pertenecen al mismo género de la hierba mora registran sustancias antimicrobianas usadas para su protección contra microorganismos, insectos, infecciones y el deterioro. Distintas evaluaciones antimicrobianas realizadas a este género de plantas con extractos de agua, etanol y metanol, demuestran que se puede obtener compuestos capaces de inhibir el crecimiento de microbios y otros organismos, ya que se ha identificado una gran variedad de compuestos que tienen actividad antimicrobiana como alcaloides, flavonoides y triterpenos **(Abbas et al., 2014)**. Según **Chang et al. (2013)** en su investigación sobre la caracterización fitoquímica de *Solanum nigrum*, exponen que los principales compuestos activos que esta planta tiene son:

- Alcaloides
- Cumarinas
- Taninos
- Flavonoides
- Terpenos
- Saponinas
- Nitratos

1.1.4.1 Alcaloides

Varios alcaloides desempeñan una actividad protectora frente a distintas infecciones debido a que presentan propiedades como antimicrobianos, insecticidas, antifúngicos, larvicidas y otras. Las solanáceas tienen la característica de presentar varios tipos de alcaloides que pueden llegar a ser más o menos activos de acuerdo a las condiciones

en las que se desarrolla la planta, como la α - y β -solanina, la α - y β -chaconina, la solanidina, la solanigrina, la solamargina, entre otros. El compuesto activo principal de esta familia de plantas es la α -solanina, el cual es un compuesto que pertenece a los alcaloides esteroidales y está presente en estas plantas en forma de glucósido; está formado por una parte de oligosacáridos, un enlace glucosídico y un esteroide con un heterociclo que contiene nitrógeno (Vélez, 2014). Su fórmula elemental es $C_{45}H_{73}NO_{15}$ y su estructura se muestra en la Figura 3. Este glucoalcaloide ha sido estudiado debido a su potencial toxicidad y posibles efectos teratogénicos en la salud humana, aunque de igual manera, se ha visto envuelto en investigaciones relacionadas con el efecto de defensa frente a hongos, bacterias e insectos. La α -solanina y otros alcaloides esteroidales son derivados de esteroides, los cuales han sido glicosilados para producir glucoalcaloides esteroidales; el precursor que sintetiza estos glucoalcaloides es el colesterol, ya que después de que este compuesto se cicla a solanidina, posteriormente se glicosila a α -solanina y α -chaconina por la unión de un carbohidrato a las estructuras (Ordóñez, 2019). El mecanismo tóxico de la solanina se produce por su interacción química con las membranas mitocondriales, ya que cuando las células se ven expuestas a este glucoalcaloide, los canales de potasio de la mitocondria se abren; esto provoca que los iones de calcio en la mitocondria pasen al citoplasma, generando una muy probable apoptosis o al menos daños celulares (Cuasés, 2018).

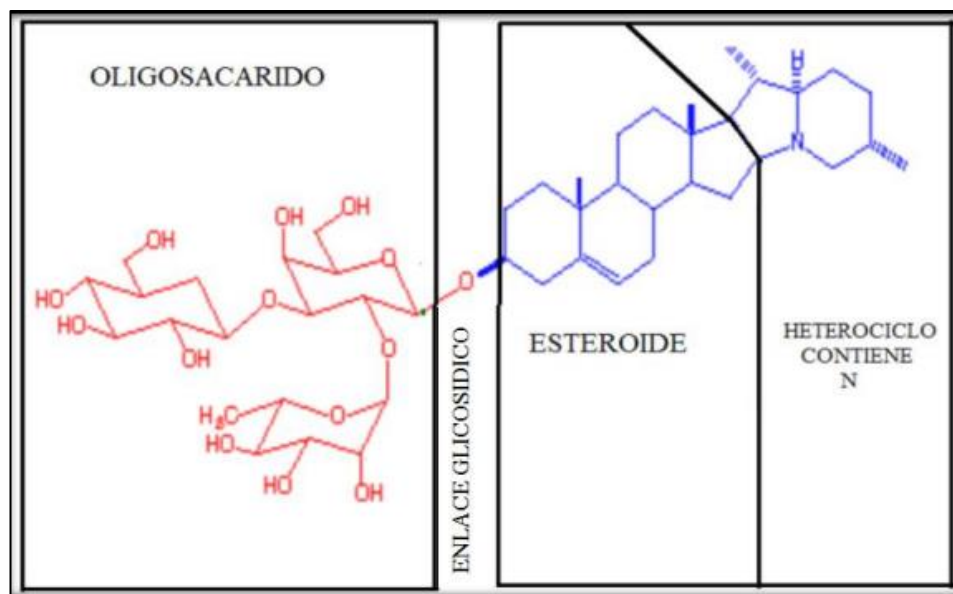


Figura 3 Estructura química de la Solanina.

Fuente: (Vélez, 2014)

1.1.4.2 Cumarinas

Las cumarinas son sustancias orgánicas que se encuentran presentes en varias partes de las plantas como las hojas, en las raíces o en los frutos. Estos compuestos se derivan del metabolismo de la fenilalanina y su precursor básico es la umbeliferona. Se les atribuye una gran variedad de actividades biológicas como antimicrobiano, antiviral, antiinflamatorio, antiespasmódico, antitumoral, antioxidante, antialérgico, entre otras. También se ha reportado que en plantas de la familia *solanaceae* se ha encontrado cumarinas conocidas como esculetina e isoescopoletina (Suárez et al., 2006).

1.1.4.3 Taninos

Son sustancias orgánicas de sabor amargo, astringentes que pertenecen al grupo de metabolitos secundarios fenólicos no nitrogenados. Pueden ser hallados en las raíces, en la corteza y en menor concentración en las hojas. Entre sus características se conoce que son solubles en agua e insolubles en presencia de alcohol o solventes orgánicos, aunque cabe mencionar que también se han reportado procesos de extracción exitosos con alcohol, acetona o con mezclas entre agua y alcohol. Son ampliamente utilizados por sus propiedades antibacterianas, antisépticas, antioxidantes, cicatrizantes y vasoconstrictoras (Cuasés, 2018).

1.1.4.4 Flavonoides

Las plantas del género *Solanum* pueden producir quercitina, un compuesto que proporciona la pigmentación característica de flores, frutas y hortalizas que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antihistamínicas (Cuasés, 2018).

1.1.4.5 Terpenos

Son sustancias naturales producidas por una gran variedad de plantas ya que les otorgan sus características organolépticas. En algunas solanáceas se ha encontrado isoprenoides de bajo peso molecular. En las plantas algunos terpenos pueden llegar a ser esenciales en el metabolismo de la planta, como el ácido giberélico que actúa como una hormona de crecimiento (Aguirre, 2020).

1.1.4.6 Saponinas

Son un grupo de glucósidos que pueden ser fácilmente solubles en agua, ya que tienen propiedades similares a las de un jabón. En las solanáceas se ha encontrado una distribución amplia de saponinas esteroidales en las hojas y flores. Puede tener diversos efectos biológicos cuando actúan como antinutrientes debido a que alteran las membranas celulares por su capacidad tensioactiva, lo que les atribuye propiedades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas, antiinflamatorias, digestivas, diuréticas y expectorantes; además su molécula suele estar conformada por un elemento que es soluble en lípidos como un esteroide o un triterpenoide y un elemento soluble en agua (Fiallos, 2011).

1.1.5 Captan (Orthocide)

La dosis recomendada para la aplicación en ornamentales es de 1.0 g/L y su descripción general del producto es la siguiente:

Nombre químico: N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida.

Fórmula molecular: $C_9H_8Cl_3NO_2S$.

Masa molar: 300.6g/mol

Punto de acción: Actividad de contacto multisitio.

Grupo químico: Ftalimidas.

Nombre común: Captan.

(Albán, 2021)

1.1.6 Extractos vegetales

Tanto extractos como aceites vegetales son una composición de mezclas complejas de metabolitos secundarios que son producidos por las plantas como autodefensa, y pueden ser obtenidos a partir de diversos métodos de extracción, ya sea con métodos convencionales o no convencionales. Con el pasar del tiempo los extractos vegetales han ganado mucho interés debido a sus amplios usos dentro de la industria agrícola y farmacéutica, ya que se ha reportado que tienen actividad antibacteriana y antifúngica.

Según **Escobar (2017)** los extractos vegetales son productos líquidos obtenidos a partir de distintos procesos físicos y químicos, con el uso de distintos solventes como pueden ser alcoholes, aceites y agua, siendo este último el más usado para generar productos fitoterapéuticos; es por ello que al clasificarlos se tiene en cuenta su consistencia, ya que pueden ser fluidos, blandos, secos y crioextractos. Los extractos fluidos o también llamados líquidos son preparados vegetales donde se utiliza alcohol como principal disolvente, en los extractos secos se obtienen productos secos con consistencia polvorosa debido a que se evapora el solvente, en los extractos blandos de igual manera se evapora el solvente, pero el producto obtenido es de textura semisólida y en los crioextractos se somete el material vegetal seco a condiciones de congelación con la inyección de nitrógeno líquido. Los parámetros que influyen cuando se extraen compuestos de plantas son principalmente la naturaleza química del material vegetal ya que se deben conocer las propiedades del metabolito que se desea extraer, el solvente y la relación sólido-líquido también son importantes ya que dependiendo del reactivo con el que se realice la extracción y la proporción que se tenga entre el material vegetal y el solvente se podrá obtener un mayor rendimiento del compuesto estudiado; otro parámetro es la temperatura la cual puede favorecer la extracción si se aumenta, también la velocidad y el tiempo de extracción pueden ser considerables ya que a mayor tiempo de contacto del solvente con el material vegetal se tendrá la posibilidad de obtener concentraciones altas de los compuestos extraídos (**Amaguaña & Churuchumbi, 2018**).

La extracción sólido-líquido ha sido uno de los procesos ampliamente reproducidos en tecnologías industriales para la producción de químicos y fármacos a partir de los compuestos obtenidos de materia vegetal. Dentro de este método se han aplicado distintas técnicas para obtener extractos, las cuales las más usadas son (**Benítez et al., 2019**):

- Extracción por maceración: El material crudo es triturado y puesto en contacto con el solvente en un recipiente cerrado a temperatura ambiente por un espacio de tiempo hasta obtener el extracto.
- Extracción por percolación: El material vegetal es molido y el solvente pasa a través de éste por aparatos conocidos como percoladores los cuales controlan el flujo del solvente, el tiempo y la temperatura, lo cual mejora el proceso.

- Extracción por lixiviación: El material es triturado, se pone en contacto con el solvente y se realiza una renovación de forma continua.

Los extractos vegetales pueden ser obtenidos a partir de pétalos, flores, hojas, frutos, tallos y raíces, teniendo en cuenta que la concentración en la que se encuentren sus compuestos depende directamente de la etapa de crecimiento y las condiciones ambientales para su desarrollo. Gracias a su composición química, sus propiedades pueden ser aprovechadas como antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos en virtud de la salud humana, dado que se encuentran presentes mezclas de terpenoides, fenilpropanoides, aldehídos, cetonas y otros; también pueden actuar como antibióticos frente a una gran variedad de microorganismos como hongos, bacterias, protozoarios, entre otros (**Luján et al., 2010**).

El grupo con un mayor número y variedad son los terpenoides y, dentro de este, los más importantes obtenidos de procesos donde se utiliza material vegetal son monoterpenoides y sesquiterpenoides. Estos compuestos están conformados por una estructura de 5 carbonos básicamente, por lo que su clasificación depende del número de dichas unidades presentes en su esqueleto. Por otro lado, los fenilpropanoides son compuestos derivados de la fenilalanina, pero no tan comunes en las plantas; aunque cuando están presentes, generalmente se encuentran en grandes concentraciones. En cuanto al efecto que estos compuestos causan en microorganismos, es puntual mencionar que son de naturaleza lipofílica, dado que provoca que las membranas celulares se vuelvan más finas y esto promueva la interacción de los compuestos con la membrana celular. Como resultado de este proceso se genera una alteración en el transporte e intercambio de iones, se generan fallas en otros procesos tales como la translocación de proteínas, reacciones enzimáticas, fosforilación, entre otros. El único inconveniente con este accionar es que también se ven afectados microorganismos que son benéficos para las plantas (**Vélez et al., 2014**).

1.1.6.1 Compuestos orgánicos vegetales

Las plantas tienen la capacidad de producir y expresar varios compuestos orgánicos que cumplen una función diferente e importante para su cuidado y desarrollo. Se trata de una cantidad de compuestos con un bajo peso molecular, los cuales presentan un olor que puede llegar a ser muy intenso para humanos y animales, y que los vegetales

regulan cuando están en situaciones de estrés. Estos pueden ser sintetizados y emitidos a través de las hojas, flores, fruto y raíces; aunque cabe mencionar que dichos sitios de almacenamiento pueden verse influenciados por ciertos factores ambientales como temperatura, humedad, cantidad de nutrientes disponibles, entre otros. De manera general, estos compuestos se encuentran en estado gaseoso a temperatura ambiente y la mayoría son expuestos cuando las plantas se encuentran amenazadas ya sea por un estímulo biótico o abiótico. Los microorganismos que parasitan a las plantas lo hacen a través de señales que se liberan como olores que son provocadas por los depredadores vegetales. Con el paso del tiempo se ha encontrado y estudiado varios compuestos orgánicos producidos por plantas y, la gran mayoría de estos son productos o subproductos de las rutas metabólicas primarias. Se debe tomar en cuenta cuatro vías principales para la generación de estos compuestos como se muestra en la Figura 4, ya que regulan la emisión de compuestos benzenoides, sesquiterpenos, monoterpenos, hemiterpenos, diterpenos, derivados de carotenoides, metil jasmonato y otros volátiles. Se dividen en base a su origen biosintético y son: del shikimato-fenilalanina, del ácido mevalónico (MVA), del metileritritol fosfato (MEP) y de la lipoxigenasa (LOX). Para la extracción y análisis de este tipo de compuestos vegetales se ha establecido una variedad de metodologías, aunque la más utilizada por eficiencia de tiempo para realizar análisis cualitativos y cuantitativos ha sido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Es importante mencionar que, en el contexto internacional actual, para la extracción y la identificación de nuevos compuestos orgánicos de las plantas, se efectúa la técnica por micro extracción en fase sólida acoplada con cromatografía de gases y espectrometría (MEFS-CGEM). Gracias a esta técnica se ha conseguido analizar la composición química de los aceites de hojas y frutas de una gran cantidad especies de plantas. Las aplicaciones que se les puede dar a este tipo de compuestos varían enormemente a nivel industrial. Pueden tener desde aplicaciones agrícolas para el manejo de plagas, ya que se lograría disminuir el impacto ambiental provocado por productos con varios componentes inorgánicos; también pueden servir en estudios que aporten en la solución a problemas médicos tanto para humanos como animales, pueden ser utilizados en la industria alimenticia y nutritiva, entre otros (Cantúa et al., 2019).

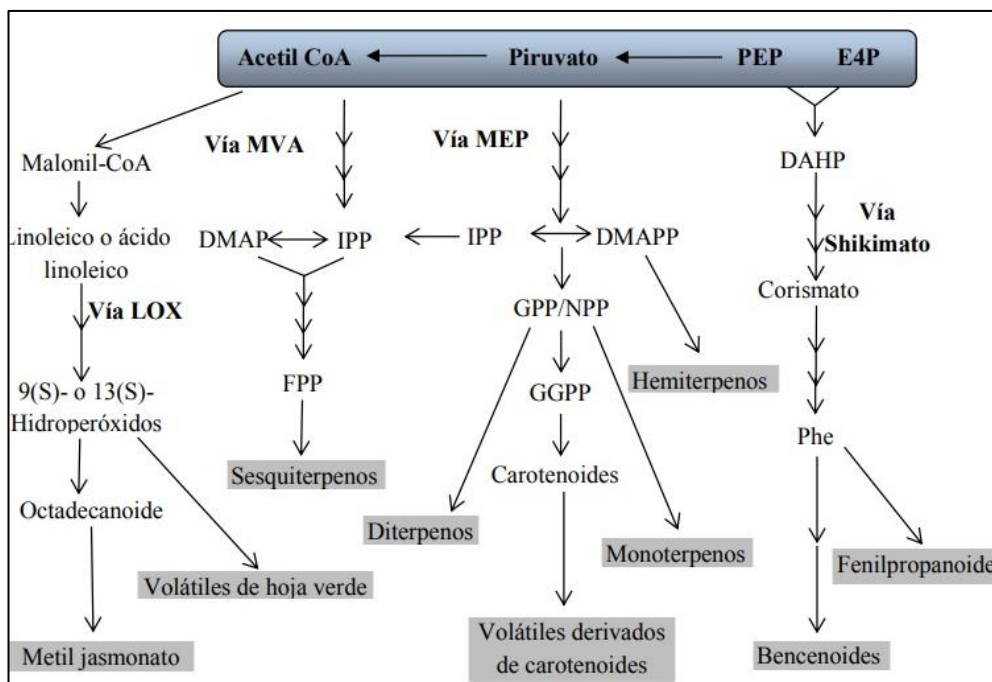


Figura 4 Principales vías metabólicas de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas.

Fuente: (Cantúa et al., 2019)

1.1.7 Actividad antifúngica de extractos vegetales

Los extractos vegetales presentan distintos metabolitos secundarios que son producidos por las plantas como una estrategia defensiva en caso de ataques por microorganismo hospederos. De manera general, los productos que les confieren características antivirales, antimicrobianos, antifúngicos, inhibidores de germinación de semillas, repelentes y otras más, pueden ser agrupados en compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados y terpenoides. Este último grupo de compuestos es el más representativo por sus propiedades liposolubles frente al desarrollo de patógenos, ya que puede provocar daños en la membrana celular y desnaturalizar enzimas, aunque cabe mencionar que la capacidad de inhibición se ve reflejada con la capacidad lipofílica e hidrolítica del compuesto. Además, se debe considerar que ciertos metabolitos pueden sufrir cambios en su estructura por entrar en contacto con el aire, lo cual puede hacer que el efecto de inhibición varíe y hasta llegue a ser inexistente (Celis et al., 2009).

Los métodos que se utilizan para evaluar la actividad antifúngica pueden ser clasificados en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y

bioautografía. Las técnicas más utilizadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de vegetales son las de difusión (en disco o en pozo) ya que permiten estudiar la actividad antimicrobiana de sustancias polares. Se basa en el método de Kirby-Bauer el cual determina una concentración de la sustancia necesaria para inhibir el crecimiento de un patógeno; se establece a partir de la medición del halo inhibitorio de crecimiento que se forma alrededor de un disco de papel filtro (generalmente de 6mm de diámetro) empapado con una cantidad conocida de sustancia vegetal de estudio. El disco se coloca en una caja petri con el medio adecuado y con el inóculo del microorganismo sembrado homogéneamente. El principio de esta técnica son el de difusión y solubilidad, ya que cuando el disco de papel entra en contacto con el agar se empieza a difundir la sustancia en el medio, lo cual genera el halo en caso de presentar efecto antimicrobiano. Es importante destacar que el tamaño del halo se verá influenciado por el medio de cultivo usado, la capacidad de difusión del compuesto, la concentración de células del inóculo, el tiempo de crecimiento del microorganismo, la sensibilidad que el microorganismo responda frente al compuesto y el periodo de incubación. Este método ha sido estandarizado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de Estados Unidos y otras entidades ya que tienen la ventaja de obtener resultados reproducibles, lo cual asegura que puedan ser comparables (**Ramirez & Castaño, 2009**).

1.1.8 Metabolitos secundarios de las plantas

El metabolismo se refiere al conjunto de reacciones químicas que ocurren dentro de la célula de un organismo vivo, con el fin de proporcionar moléculas necesarias para el correcto desarrollo de las funciones vitales. Desde organismos unicelulares simples hasta especies pluricelulares complejas dependen de una gran cantidad de reacciones metabólicas que son reguladas por moléculas indispensables llamadas enzimas. Todas las especies vegetales tienen una gran cantidad de componentes que utilizan para diferentes fines, ya sea para crecimiento, desarrollo o supervivencia. En cuanto a los componentes orgánicos de las plantas se puede encontrar desde metabolitos primarios que son esenciales en el metabolismo celular, hasta metabolitos secundarios que no están ligados al metabolismo esencial, pero que forman parte importante de la actividad farmacológica de las plantas y su relación con el medio que las rodea (**Meyer et al., 2013**).

Todos los organismos formados por carbono pueden sintetizar metabolitos, pero a diferencia de los animales y hongos, varias plantas, algas y algunas bacterias tienen la capacidad de dirigir una gran cantidad de carbono asimilado y energía producida para elaborar una extensa variedad de moléculas orgánicas denominadas metabolitos secundarios, las cuales no intervienen en ninguno de sus procesos vitales como la fotosíntesis, respiración, transporte de sustancias, síntesis de proteínas y coenzimas, entre otros; pero le confiere características que le permite defenderse de ataques, emitir señales para interactuar con su entorno y beneficiarse del proceso y más. Es imperativo mencionar que no todas las plantas producen los mismos metabolitos secundarios, sino que difieren según el grupo de plantas y en algunos casos dependen de las condiciones en las que se desarrollan. Es por ello que la síntesis de compuestos no ocurre de manera generalizada, es decir, su producción y concentración se restringe al género, familia y hasta especie (**Almaraz et al., 2006**).

Las funciones que cumplen estos productos metabólicos a menudo sirven para atraer o repeler animales o insectos, de igual manera pueden proteger a las plantas de predadores a través de la conversión de compuestos para volverlas venenosas o indigestas. En su estructura química se puede encontrar grupos similares a los metabolitos primarios, como es el caso del ácido kaurenico con el ácido abiético y el de la prolina con el ácido pipercolico. Estos compuestos son estructuralmente similares ya que se debe tener muy en cuenta que las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios son una derivación del metabolismo primario del carbono, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato (**Ávalos & Pérez, 2009**). En la Figura 5 se muestra un esquema que muestra la producción de diversos metabolitos secundarios y sus rutas de biosíntesis.

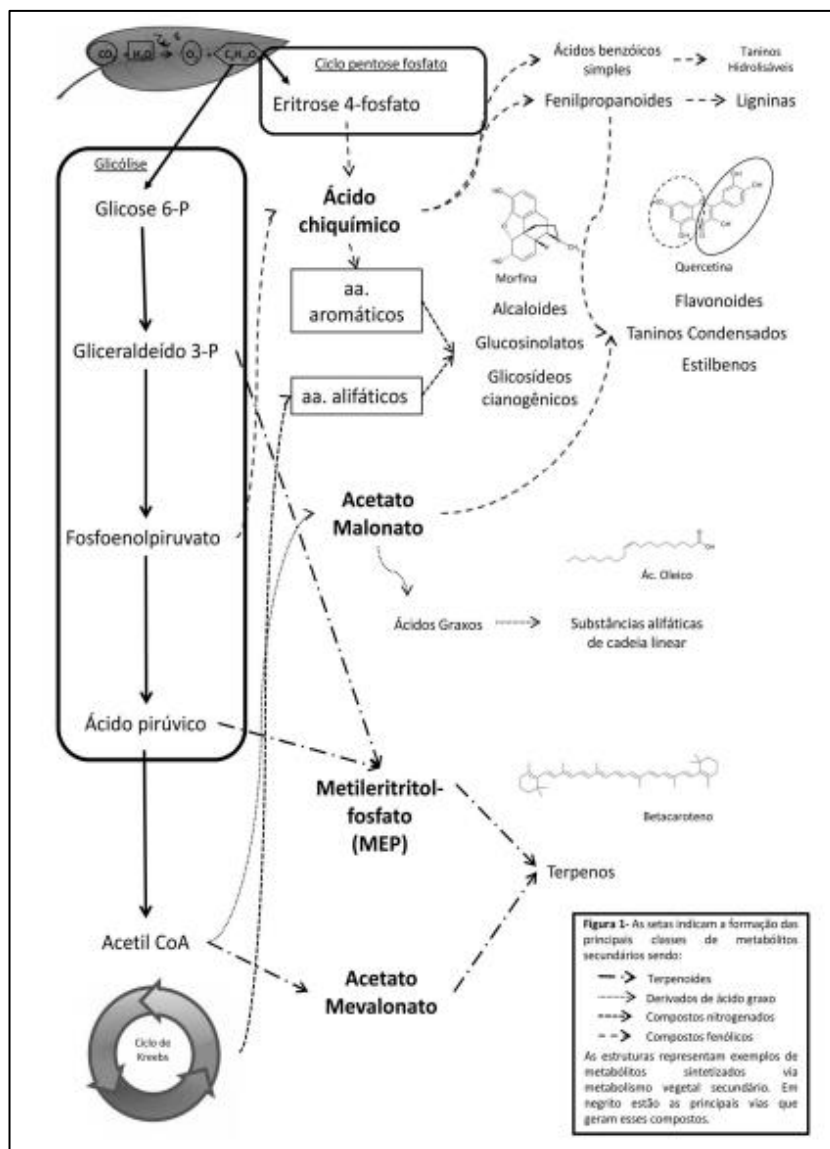


Figura 5 Rutas de biosíntesis de diversos metabolitos secundarios.

Fuente: (Meyer et al., 2013)

Los metabolitos secundarios son productos naturales ampliamente utilizados en la industria, por ello con el paso del tiempo han generado un alto interés medicinal, agrícola y económico de una gran variedad de compuestos extraídos de las plantas. Muchos de estos productos metabólicos han sido ocupados en la antigüedad para tratar un sin número de problemas medicinales, pero hasta hace unas décadas se ha establecido un sustento científico completo sobre su accionar y se han establecido varias ramas de la industria donde pueden ser aprovechadas de manera óptima. Existe una gran variedad de metabolitos secundarios que difieren en sus estructuras y grupos químicos, los cuales para diferenciarlos según **Aguirre (2020)** han sido clasificados

“en base a su composición química en nitrogenados y no nitrogenados; dentro de los nitrogenados se encuentran los alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, aminas y aminoácidos no proteicos, y en los no nitrogenados están los terpenoides, compuestos fenólicos y policétidos”. Es por ello que estos metabolitos pueden ser clasificados según su origen biosintético y, como mencionan (**Ávalos & Pérez, 2009**), se los puede clasificar en cuatro clases principales:

- Terpenos
- Compuestos fenólicos
- Glicósidos
- Alcaloides

1.1.8.1 Terpenos

Los terpenos constituyen un grupo numeroso de más de 40.000 moléculas diferentes. Estos metabolitos secundarios evitan que se generen condiciones oxidantes que provocan las sequías, además les otorgan a las plantas las características organolépticas y constituyen gran parte del aceite esencial que se extrae de plantas aromáticas. Cuando son modificados ya sea químicamente mediante oxidación o por reubicación del esqueleto hidrocarbonado se les denomina terpenoides. Generalmente son insolubles en agua y se forman por la unión de unidades conformadas por 5 átomos de carbono denominadas isopreno; es por ello que gracias a la regla del isopreno se ha logrado clasificarlos y estudiarlos en base al número de unidades de isopreno (5 C) presentes en su estructura. Es así que se han logrado clasificar en: Hemiterpenos (5 carbonos), Monoterpenos (10 carbonos), Sesquiterpenos (15 carbonos), Diterpenos (20 carbonos), Triterpenos (30 carbonos), Tetraterpenos (40 carbonos), Politerpenos (más de 40 carbonos) (**Almaraz et al., 2006**).

Cabe mencionar que los terpenos no son derivados del isopreno, sino que su precursor principal es el ácido mevalónico que proviene del acetyl coenzima A. Por este motivo **Ávalos & Pérez (2009)** mencionan que “estos compuestos pueden ser sintetizados por dos rutas: la del ácido mevalónico que se da en el citosol, donde tres moléculas de acetyl coenzima A se condensan para formar el ácido mevalónico, el cual reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP); y la ruta del metileritritol fosfato que ocurre en los cloroplastos, donde una molécula de metileritritol fosfato reacciona para generar

el isómero del IPP, el dimetilalil pirofosfato (DMAPP)". La producción tanto de IPP como de DMAPP son importantes ya que sirven como base para la biosíntesis de terpenos y otras moléculas usadas en diversos procesos. En la Figura 6 se presenta un esquema de las rutas mencionadas y la producción de distintos terpenos.

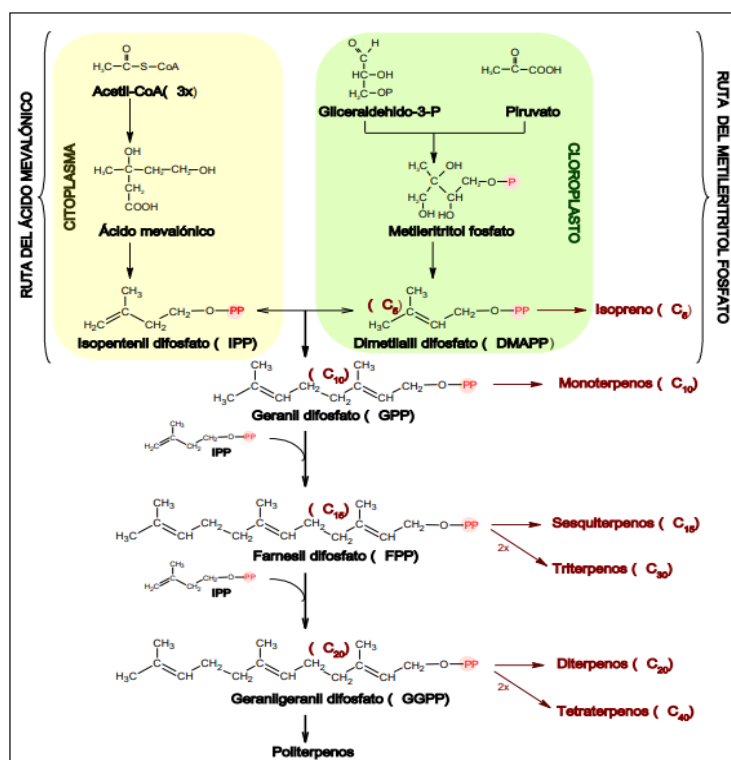


Figura 6 Rutas de síntesis de terpenos y su clasificación.

Fuente: (Ávalos & Pérez, 2009)

1.1.8.2 Compuestos Fenólicos

Estos compuestos acogen a todos los metabolitos secundarios que presentan un grupo fenol en su estructura, es decir, tienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y su origen se da en el mundo vegetal, donde una de las funciones principales que presentan es que actúan como fitoalexinas para la protección de las plantas. También contribuyen a la pigmentación de varias partes que componen a la planta, ya sea hojas, tallo o fruto; y con ello influyen también en ciertas características organolépticas ya que proporcionan el sabor particular y las protegen contra la oxidación (Creus, 2004).

En cuanto a su producción se han ubicado dos rutas que están implicadas en la síntesis de compuestos fenólicos, estas son: la ruta de ácido shikímico y la ruta del ácido

malónico. La primera ruta es la responsable y principal en la síntesis de estos compuestos en plantas, donde el precursor utilizado es el ácido cinámico que es un derivado de la fenilalanina por efecto catalítico de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). La segunda ruta, por otro lado, es importante en la síntesis de compuestos fenólicos, pero es aprovechada en mayor cantidad por hongos y bacterias, mas no por plantas superiores; en esta ruta se parte de una molécula de acetil coenzima A que se degrada hasta formar diversos fenoles (Ávalos & Pérez, 2009). En la Figura 7 se puede apreciar las rutas mencionadas.

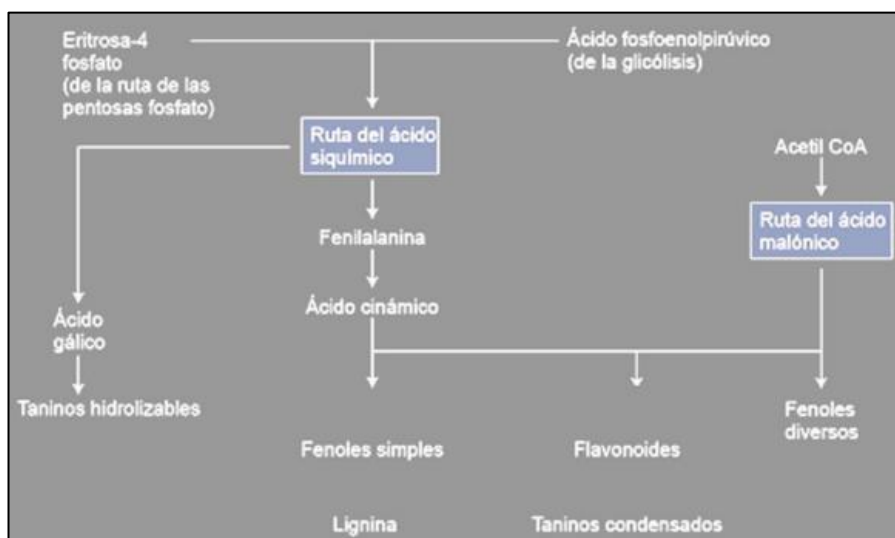


Figura 7 Rutas de síntesis de diversos compuestos fenólicos.

Fuente: (Ávalos & Pérez, 2009)

Estos compuestos destacan por su alta capacidad antioxidante ya que neutralizan radicales libres que pueden dañar diferentes moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos con reacciones de oxidación. Aunque presentan esta dicha cualidad, puede llegar a ser muy susceptibles a ser oxidados y cuando esto ocurre dan lugar a las quinonas. También pueden actuar como quelantes y formar complejos con metales, especialmente con el hierro y el aluminio. Dentro de este grupo de metabolitos destacan los lignanos, las cumarinas y los flavonoides, aunque cabe mencionar que, de acuerdo a su clasificación general según su estructura química, estos compuestos pueden dividirse en dos grupos (Morales, 2012):

- Flavonoides: Formados por la unión de dos ciclos bencénicos con un puente tricarbonado, pueden clasificarse en flavonoles, antoncianinas, flavonas, flavanonas, catequinas y dihidroflavonoles.
- No flavonoides: Ácidos fenoles derivados del ácido benzoico del ácido cinámico., estilibenos y otros.

Según **Pereira (2014)** también se los puede clasificar de acuerdo a su tipo de esqueleto como se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4

Clasificación de compuestos fenólicos de acuerdo al tipo de esqueleto.

Compuesto fenólico	Esqueleto básico
Fenoles simples, benzoquinonas	C6
Ácidos fenólicos	C6-C1
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C6-C2
Fenilpropanoles, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas	C6-C3
Naftoquinonas	C6-C4
Xantonas	C6-C1-C6
Estilibenos, antraquinonas	C6-C2-C6
Flavonoides, isoflavonas	C6-C3-C6
Lignanós	(C6-C3) ₂
Diflavonoides	(C6-C3-C6) ₂
Ligninas	(C6-C3) _n
Taninos hidrosolubles	(C6-C1) _n

Fuente: Recuperado de (Pereira, 2014)

1.1.8.3 Glucósidos

Los glucósidos son moléculas que están compuestas por glúcidos. Estos metabolitos vegetales de gran importancia se forman por la unión de una molécula de azúcar con otra que contiene un grupo hidroxilo en su estructura. Es por ello que el nombre de estos compuestos deriva del enlace glicosídico que se forma por la condensación de las moléculas mencionadas. De estos compuestos se puede identificar cuatro grupos: glucósidos cianogénicos, glucósidos cardíacos, saponinas y glucosinolatos. Los glucósidos cianogénicos pertenecen a los compuestos nitrogenados, los cuales liberan sustancias volátiles que son tóxicas cuando la planta es maltratada, por lo que no se degradan cuando la planta permanece intacta. Los glucósidos cardenólidos son compuestos que se forman de agliconas, los cuales son terpenos sin la cadena de carbohidrato, tienen cierta similitud con las saponinas porque también tienen propiedades como detergentes y de manera general en su estructura presenta una lactona. Las saponinas son compuestos triterpenoides o esteroides que presentan uno o varios carbohidratos unidos a su estructura, se los encuentra como glucósidos esteroides o bien como glucósidos triterpenos. Los glucosinolatos son compuestos que se degradan fácilmente desprendiendo sustancias volátiles que le atribuyen ciertas características organolépticas a las plantas, como el aroma y el sabor (**Ávalos & Pérez, 2009**).

1.1.8.4 Alcaloides

Los alcaloides conforman una gran variedad de compuestos de aproximadamente 15.000 moléculas diferentes que presentan tres características comunes: capacidad de solubilidad en agua, tener actividad biológica y poseer en su estructura un átomo de nitrógeno unido a anillo heterocíclico. De acuerdo a su complejidad se conocen desde estructuras simples como las aminas, de este grupo se puede mencionar la ricina; hasta estructuras complejas como los glicósidos esteroidales, dentro de los cuales se hace referencia a la solanina (**Pereira, 2014**).

Según menciona **Cuasés (2018)** “generalmente los glucoalcaloides que se presentan en plantas del género *Solanum* son alquilaminas esteroidales que presentan un esqueleto con 27 carbonos, el cual se encuentra en estas plantas en forma de glicósidos, los cuales son muy relacionados con los triterpenoides tetracíclicos”. Pueden

originarse a partir de aminoácidos como la fenilalanina, arginina, triptófano y otros; también pueden encontrarse unidos a terpenoides o pueden ser derivados de purinas. Es por ello que estos metabolitos han sido clasificados en base a su origen biosintético:

- Alcaloides derivados de aminoácidos
- Alcaloides purínicos
- Terpenos aminados
- Alcaloides policétidos

Estos compuestos se pueden localizar en el tejido joven de las plantas que se encuentra en activo crecimiento, sin embargo, cabe destacar que se pueden encontrar en otros tejidos bien sea en la raíz, en el tallo o en las hojas. Tienen un papel muy importante en la defensa de las plantas ya que reaccionan frente al estrés causado por infecciones de hongos, bacterias, nemátodos o insectos. Gracias a sus efectos analgésicos y anestésicos se convirtieron en un recurso muy utilizado en la industria farmacéutica, ya que en el año 1817 se logró aislar la morfina del opio, proporcionando un compuesto que mejoró la práctica médica y que es recurrido hasta la actualidad. De igual manera en el mismo año se logró separar la cafeína y otros alcaloides que son muy aplicados en la industria alimenticia. Es importante mencionar que en dosis altas la mayoría de alcaloides podrían llegar a ser muy tóxicos, es por ello que para ser aprovechados con fines farmacéuticos se manejan dosis bajas, porque así actúan como tranquilizantes y más (Meyer et al., 2013).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad antifúngica de los compuestos fitoquímicos del extracto alcohólico de hierba mora para inhibir el crecimiento de *Oidium sp.* y *Fusarium sp.*

1.2.2 Objetivos Específicos

- Cultivar *in vitro* con el medio de cultivo Agar papa-dextrosa los hongos fitopatógenos.
- Evaluar la aplicación de distintas dosis del extracto a través de un diseño experimental completamente al azar para examinar su incidencia sobre los hongos cultivados.
- Analizar la evolución de los hongos a través del conteo de esporas que muestren la resiliencia de los patógenos con y sin la aplicación del compuesto obtenido.

CAPÍTULO 2




METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN


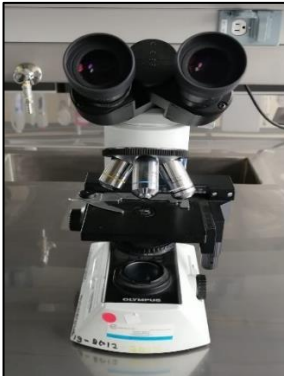


2.1 Materiales y Equipos




2.1.1 Equipos

Tabla 5

Equipos utilizados en el proceso experimental.

Equipo	Imagen	Marca	Modelo
Rotavapor	 A photograph of a white and blue rotavapor (IKA HB100) in a laboratory setting. It features a glass flask on a rotating platform and a condenser coil.	IKA	HB100
Autoclave	 A photograph of a white autoclave (Hirayama HV-85) with its circular door open, showing the interior chamber.	Hirayama	HV-85
Cabina de flujo laminar	 A photograph of a laminar flow cabinet (Labconco Logic) with a glass front and a control panel on the right side.	Labconco	Logic

<p>Incubadora</p>		<p>Memmert</p>	
<p>Microscopio óptico</p>		<p>Olympus</p>	<p>CX21</p>
<p>Cámara de Neubauer</p>		<p>Boeco</p>	
<p>Vórtex</p>		<p>Fisher Scientific</p>	

Estufa		Memmert	100-800
Micropipeta 1000 uL		Labnet	BioPette
Secador		Gander	

Nota: Los equipos utilizados fueron proporcionados por los laboratorios de la UODIDE-FCIAB.

2.1.2 Materiales

Tabla 6

Materiales utilizados en el proceso experimental.

Material	Volumen
Balón aforado	500 mL
Vasos de precipitación	250 mL – 1000 mL
Tubos de ensayo con tapa	50 mL
Matraz Erlenmeyer	500 mL
Botellas de tapa azul	500 mL
Botella de vidrio ámbar	1000 mL
Puntas para micropipeta	1 mL
Placas Petri plásticas	25 mL
Discos de papel	
Mortero y pistilo	
Gradilla	
Portaobjetos y cubreobjetos	

2.2 Ubicación del lugar

La obtención del material vegetal se ejecutó en dos plantaciones diferentes dedicadas a la exportación de cultivos, situadas en la provincia Cotopaxi, en el cantón Latacunga, en la parroquia Aláquez. La parte experimental se desarrolló en la Universidad Técnica de Ambato en el campus de Huachi Chico, perteneciente a la provincia de Tungurahua.

2.2.1 Opafyora E.U.R.L

La primera plantación correspondiente a la empresa Opafyora E.U.R.L. tiene como principal actividad la producción y exportación de flores de verano. Las descripciones de su ubicación geográfica se detallan en la Tabla 7. En varios diagnósticos técnicos de campo se presentaron problemas en el cultivo de alelí (*Matthiola incana*) por la

presencia de *Fusarium sp.*, dado que las flores mostraban varias características sintomáticas como la coloración amarillenta de los cotiledones, pudrición radicular, enanismo y otras como se muestra en la Figura 8.

Tabla 7

Ubicación geográfica de la empresa Opafyora E.U.R.L.

Provincia	Cotopaxi
Cantón	Latacunga
Parroquia	Aláquez
Barrio	El Tejar
Referencia	500 metros al sur de la sede social
Coordenadas UTM	X: 0772033
	Y: 9904020
	Altura: 3094 msnm

Fuente: Autor.



Figura 8 Síntomas de la presencia de *Fusarium sp.* en alelí.

Fuente: Autor.

2.2.2 Equaflores

La segunda plantación correspondiente a Equaflores, se dedica principalmente a la producción y exportación de rosas de distintas variedades. Su ubicación geográfica se detalla en la Tabla 8. En cuanto a su análisis técnico de campo revelaba una extendida contaminación por *Oidium sp.* en el cultivo de rosas (*Rosa sp.*), mostrando síntomas característicos del ataque de este hongo como la presencia del polvo blanquecino en el tallo y en las hojas, coloración rojiza en el envés de las hojas, mal formación floral, muerte por desecación de tejido y otros que se muestran en la Figura 9.



Figura 9 Síntomas de la presencia de *Oidium sp.* en la rosa.

Fuente: Autor.

Tabla 8*Ubicación geográfica de la empresa Equaflores.*

Provincia	Cotopaxi
Cantón	Latacunga
Parroquia	Aláquez
Barrio	Pillig
Coordenadas UTM	X: 0768736
	Y: 907208
	Altura: 3035 msnm

*Fuente: Autor.***2.2.3 Fase de Laboratorio**

El ensayo experimental se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato – campus Huachi Chico, dentro de los laboratorios de investigación.

Tabla 9*Ubicación de los laboratorios de la FCIAB - UTA.*

Provincia	Tungurahua
Cantón	Ambato
Parroquia	Huachi chico
Dirección	Av. Los Chasquis y Río Payamino

Fuente: Autor.

2.3 Material vegetal

Las muestras fueron recogidas aplicando un muestreo aleatorio. En la plantación Equaflores se estableció la zona más infectada por *Oidium* independientemente de la variedad de rosa y se recolectaron 30 g de hojas. Para el caso del alelí se muestreó en el área más afectada por *Fusarium* en la plantación Opafyora, de lo cual se tomaron 35 g de muestra ya que se recogieron plantas completas con rastros sintomáticos del hongo principalmente en la corona y raíces en diferentes puntos.

La hierba mora al ser una planta silvestre crece en varios sitios de la zona rural del cantón Latacunga, por lo que de este material vegetal se tomó una muestra de 300 g (del arbusto se tomaron varios tallos con hojas y frutos en buen estado) en la plantación Opafyora. Las muestras se colocaron en fundas ziploc con el respectivo etiquetado para posteriormente continuar con el estudio en las instalaciones de investigación de la FCIAB.

Se2.4 Extracto alcohólico de la planta hierba mora

2.4.1 Preparación del material vegetal

La planta de hierba mora (*Solanum nigrum*) recolectada fue sacudida y limpiada para retirar cualquier contaminante como tierra, desechos u otros. Después se procedió con la selección de hojas que se encontraban en el mejor estado de preservación, libre de manchas, infecciones u otros problemas a simple vista. Las partes que no cumplieron con lo mencionado fueron descartadas. Seguido se pesaron 80 g de hojas seleccionadas y 158 g de bayas y tallos en una balanza (OHAUS), las cuales fueron depositadas en sobres de papel manila con pequeños orificios hechos con palillos dentales para secar el material vegetal. El sobre fue introducido en un deshidratador con un sistema de recirculación de aire caliente (GANDER) a 50 °C por un tiempo de 6 horas y, después de haberse completado este periodo, se pesaron 30 g entre hojas secas, tallos y bayas que fueron machacadas en un mortero con la ayuda de un pistilo, todo correctamente esterilizado (Fiallos, 2011).

2.4.2 Preparación del extracto alcohólico

Para la obtención de los compuestos orgánicos se realizó una extracción sólido-líquido y se aplicó una relación 1:20 (gramos de material vegetal / mililitros de solvente). Por lo que, los 30 g de material vegetal seco se incorporó con 600 mL de etanol al 70 % en un envase de vidrio ámbar, tapado herméticamente, correctamente etiquetado y dispuesto en un lugar donde no tenga contacto con la luz del sol durante 7 días. Al cabo de este tiempo se procedió a tamizar el extracto con la ayuda de papel filtro y un embudo para separar los sólidos y mantener la parte líquida. El residuo del material vegetal se dispuso en una estufa a 50 °C durante 4 horas para secar nuevamente el material y recoger su peso en seco. A continuación, se dispuso el extracto en un rotavapor (IKA HB10) a 230 rpm con una temperatura de 68 °C durante un tiempo aproximado de 2 horas para evaporar el alcohol residual (**Chávez & Aquino, 2012**).

Para el cálculo del rendimiento porcentual de los pesos finales se procedió a aplicar la fórmula:

$$\%R = \frac{Wi - Wf}{Wi} * 100$$

Donde:

%R= Porcentaje de rendimiento.

Wi= Peso inicial del material vegetal seco.

Wf= Peso final del material vegetal filtrado y secado.

(**Benítez et al., 2019**)

2.4.3 Dilución del extracto alcohólico

Una vez obtenido el extracto se realizaron dos diluciones con agua destilada para obtener tres concentraciones diferentes. Estas fueron utilizadas para la evaluación del extracto en distintas dosis: 50, 75 y 100 % ^{v/v}. Entonces, a partir del extracto concentrado, al cual se le consideró al 100 %, se calculó el volumen del extracto concentrado requerido para realizar cada dilución; con ello se procedió a preparar

soluciones de 100 mL con agua destilada para cada dosis, haciendo uso de la siguiente fórmula (Escobar, 2017):

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

Donde:

- V1: volumen del extracto concentrado
- C1: concentración del extracto obtenido
- V2: volumen del extracto diluido a preparar
- C2: concentración del extracto diluido a preparar

- Se preparó 100mL de una solución al 50% V/V de extracto alcohólico de hierba mora con agua destilada, a partir de una solución stock del mismo extracto al 100% V/V

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1} = \frac{50 \% * 100 \text{ mL}}{100 \%} = 50 \text{ mL}$$

Volumen del extracto concentrado (V1) = 50 mL

Volumen de agua destilada (VH₂O) = 50 mL

Volumen del extracto de hierba mora al 50 % = V1 + VH₂O = 100 mL

2.5 Preparación del medio de cultivo

Para preparar el medio de cultivo Agar Papa-Dextrosa (PDA) se utilizó medio de la marca comercial BD DIFCO™ (compuesto por 4 g de infusión de almidón de papa, 20 g de dextrosa y 15 g de agar) y se siguieron las instrucciones de preparación del recipiente. En un frasco para medio de cultivo se rehidrató 39 g de polvo con un litro de agua destilada, después por 5 minutos se mantuvo calentando y agitando a baño maría hasta disolverlo por completo y se dejó reposar. Una vez disuelto se esterilizó en una autoclave (HIRAYAMA) por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y 15 libras de presión. Cuando el tiempo se completó, se procedió a verter de entre 20 y 22 mL de medio de cultivo en cajas petri que se encontraban previamente esterilizadas.

Posterior se taparon y se esperó hasta que el medio solidifique para continuar con el estudio (Lemus et al., 2008).

2.6 Aislamiento de hongos

2.6.1 Aislamiento de hongos a partir del material vegetal

Se realizó una limpieza simple del material vegetal, con el fin de retirar contaminantes como tierra y otros. Después se trabajó en una cabina de flujo laminar (LABCONCO) donde se realizaron cortes transversales de aproximadamente 1 cm de las partes del tejido que se encontraba contaminado, relacionando las lesiones la planta con los síntomas que los hongos provocan. Para el caso del alelí se hicieron pequeños cortes de las lesiones ubicadas en la corona del tallo, mientras que para el caso de las hojas de la rosa se cortó las partes donde había mayor crecimiento del polvo blanquecino como se muestra en la Figura 10.



Figura 10 Material vegetal usado para el aislamiento de hongos. A) hojas de rosa con oídio. B) Tallos de alelí con fusarium.

Fuente: Autor.

Para el aislamiento de *Fusarium* se procedió con la desinfección de los tallos utilizando tres recipientes que contenían reactivos diferentes. Primero se empapó el material con etanol al 70 % durante 1 minuto, después se sumergió en disolución de hipoclorito de sodio al 1 % por 2 minutos, y se realizaron 3 lavados con agua destilada para después colocar el material desinfectado en una gasa estéril que absorbió el agua residual. Seguido, se insertó dos partes pequeñas del tallo en dos puntos equidistantes de la placa petri que contenían medio PDA, se cerró y se envolvió la caja con cinta de

embalaje. Este procedimiento se llevó a cabo hasta obtener 9 cajas como se observa en la Figura 11. Éstas fueron incubadas a 25 ± 2 °C durante 96 horas (**Hernández et al., 2019**).

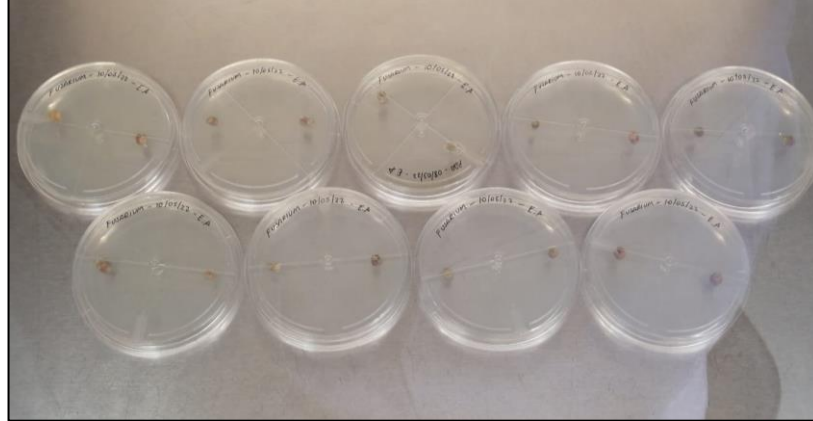


Figura 11 Aislamiento de *Fusarium sp* a partir de material vegetal.

Fuente: Autor.

Por otro lado, para el aislamiento de *Oidium* se procedió a cortar zonas con la mayor incidencia del hongo en la hoja. Manteniendo las condiciones asépticas, se depositó el material cortado en cada caja Petri con medio PDA, colocando 4 cortes de la hoja ubicados equidistantemente en forma de equis, después se cerró y se envolvió con cinta de embalaje. Este procedimiento se llevó a cabo hasta obtener 9 cajas como se observa en la Figura 12. y fueron incubadas a 25 ± 2 °C durante 96 horas (**Moreno et al., 2012**).

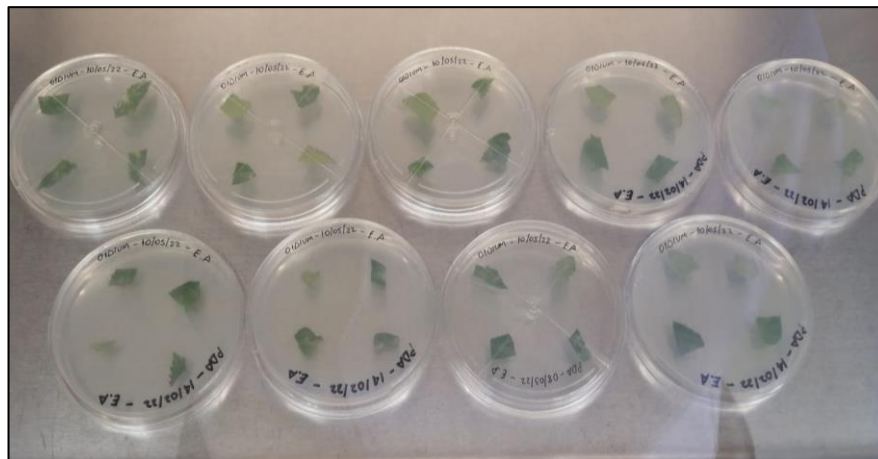


Figura 12 Aislamiento de *Oidium sp* a partir de material vegetal.

Fuente: Autor.

2.6.2 Aislamiento de cultivos puros

Para trabajar con cultivos puros se procedió a realizar siembras en medio sólido a partir de los cultivos aislados del material vegetal, pero de manera previa a la elección de la cepa a utilizar se efectuaron observaciones macroscópicas y microscópicas de los hongos desarrollados. Una vez realizadas las observaciones se extrajo un pequeño fragmento de micelio del hongo con una porción del medio de cultivo donde creció el hongo y se lo colocó en otra caja Petri con medio PDA para que se desarrolle la cepa de interés.

2.6.2.1 Identificación macroscópica y microscópica de las cepas

Tras haber transcurrido el periodo de 96 horas se procedió a identificar las cepas fúngicas que se desarrollaron a partir del material vegetal muestreado. Para la identificación macroscópica de los hongos se describió las características del micelio (algodonoso, velloso, pastoso, aterciopelado, aéreo o pegado al micelio) observando su forma, tamaño, aspecto, textura y color. Para la identificación microscópica se siguió la guía de la nota técnica NTP 488 correspondiente a calidad de aire interior: identificación de hongos, de la cual se aplicó el método de preparación con cinta adhesiva y se realizó el análisis de las estructuras con un microscopio (OLYMPUS), con el fin de escoger las cepas correspondientes a los hongos de interés.

2.6.2.2 Preparación del cultivo puro

Con las cepas identificadas se procedió a realizar los cultivos puros. Se aplicó una siembra en medio sólido, con la ayuda de un bisturí se realizó un corte de aproximadamente 1 cm del medio de cultivo con micelio del hongo y se colocó en el centro de una caja petri nueva con medio PDA. Se envolvió la caja con cinta adhesiva y se incubó a 25 °C durante 7 días. Este proceso fue replicado en otras tres placas más para obtener las cepas de interés (**Cañedo & Ames, 2004**).

2.7 Modelo experimental

Para el análisis de la actividad antifúngica del extracto se procedió a evaluar tres tratamientos con extracto alcohólico de hierba mora a dosis diferentes. También se utilizó un fungicida comercial como contraste positivo que demuestre un efecto

inhibitorio frente a los hongos, mientras que para el contraste negativo se utilizó agua destilada para demostrar el desarrollo normal del hongo. Para cada tratamiento se trabajó con 3 muestras, obteniendo un total de 15 cajas petri para *Oidium* y 15 cajas para *Fusarium*.

2.7.1 Tratamientos

Los tratamientos usados se detallan a continuación:

- **Tratamiento 1 (T1)** = Solución de 20 mL de agua destilada con extracto alcohólico preparada en una proporción 50-50 % respectivamente. El código de las muestras para este tratamiento fue el siguiente:

Tabla 10

Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 1.

<i>Oidium</i>	<i>Fusarium</i>
OM1T1	FM1T1
OM2T1	FM2T1
OM3T1	FM3T1

Nota: O (Oidium); F (Fusarium); M (muestra); T (Tratamiento).

- **Tratamiento 2 (T2)** = Solución de 20 mL de agua destilada con extracto alcohólico preparada en una proporción 25-75 % respectivamente. El código de las muestras para este tratamiento fue el siguiente:

Tabla 11

Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 2.

<i>Oidium</i>	<i>Fusarium</i>
OM1T2	FM1T2
OM2T2	FM2T2
OM3T2	FM3T2

Nota: O (Oidium); F (Fusarium); M (muestra); T (Tratamiento).

- **Tratamiento 3 (T3)** = Volumen de 20 mL de extracto alcohólico al 100 %.

Tabla 12

Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 3.

<i>Oidium</i>	<i>Fusarium</i>
OM1T3	FM1T3
OM2T3	FM2T3
OM3T3	FM3T3

Nota: O (*Oidium*); F (*Fusarium*); M (muestra); T (Tratamiento).

- **Tratamiento 4 (T4+)** = Control positivo. Solución de un producto comercial preparado con las instrucciones recomendadas para el control de las plagas. Se utilizó el producto Orthocide para la prueba con *Oidium* y *Fusarium* preparando 1.5 g/L como se recomienda en sus especificaciones.

Tabla 13

Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 4.

<i>Oidium</i>	<i>Fusarium</i>
OM1T4	FM1T4
OM2T4	FM2T4
OM3T4	FM3T4

Nota: O (*Oidium*); F (*Fusarium*); M (muestra); T (Tratamiento).

- **Tratamiento 5 (T5-)** = Control negativo. Volumen de 20mL de agua destilada.

Tabla 14

Códigos de las muestras usadas para el tratamiento 5.

<i>Oidium</i>	<i>Fusarium</i>
OM1T5	FM1T5
OM2T5	FM2T5
OM3T5	FM3T5

Nota: O (*Oidium*); F (*Fusarium*); M (muestra); T (Tratamiento).

2.8 Análisis de la actividad antifúngica

Para establecer un criterio sobre la actividad antifúngica del extracto se procedió a trabajar con la técnica de difusión en disco de Kirby – Bauer, en la cual se mide el halo de inhibición y se realiza el conteo de esporas.

2.8.1 Preparación del inóculo

Primero se preparó la solución de Tween 80 al 0.1 %. Se tomó 1 mL de la solución comercial de Tween 80 y se depositó en 9 mL de solución salina estéril al 0.85 % para preparar la dilución de Tween 80 al 10 %. Después se recogió 1 mL de la primera dilución realizada y se depositó en 99 mL de solución salina al 0.85 % para preparar la solución con Tween 80 al 0.1 % (**Cañedo & Ames, 2004**).

Se tomó un cultivo puro con mayor desarrollo micelial de *Fusarium*. y *Oidium* de 7 días de incubación y se le agregó 15 mL de solución salina estéril al 0.85 % con Tween 80 al 0.1 % en toda la caja petri. Se mantuvo agitando en círculos suavemente durante aproximadamente cuatro minutos con el fin de obtener la mayor cantidad de conidios. Después con una micropipeta de 1 mL se recolectó toda la suspensión que se obtuvo y se trasvasó a un tubo de ensayo estéril, donde nuevamente se realizaron homogenizaciones hasta ser usado (**Moreno et al., 2012**).

2.8.2 Siembra del inóculo y colocación del disco de papel

De la suspensión se sustrajo una alícuota de 10 μ L que fue dispuesta en la cámara de Neubauer para establecer la concentración de esporas. Este proceso se realizó con el

fin de establecer una dilución que contenga una aproximada concentración de 1×10^5 conidios/mL para trabajar los inóculos de fusarium y oídio con una concentración conocida. Una vez establecida la dilución se procedió a tomar 500 μ L de la suspensión con 1×10^5 esporas/mL y se depositó en una caja Petri con medio PDA, después se dispersó la suspensión en todo el medio con la ayuda de un asa Drigalsky y se dejó secar por un tiempo de tres a cinco minutos antes de colocar los discos con los tratamientos. Este procedimiento se realizó hasta obtener 15 cajas para *Oidium* y 15 cajas para *Fusarium*. Después, se procedió a empapar los discos de papel filtro (20 mm de diámetro) con los distintos tratamientos. Para ello a cada disco se lo humedeció con 500 μ L de tratamiento y se colocó en el centro de la placa que contenía la suspensión de esporas que se dejó reposar previamente (Aguirre, 2020).

2.8.3 Medición del halo de inhibición

Después de haber transcurrido un periodo de 48 horas se continuó con las mediciones del halo de inhibición generado por el tratamiento aplicado. Los datos fueron recogidos a las 48, 72, 96 y 144 horas para que en el séptimo día se inicie el conteo de esporas. El diámetro inhibitorio medido fue el halo translúcido que se formó alrededor del disco de papel, este dato incluyó el diámetro del disco y fue recogido en milímetros para clasificarlo de acuerdo a la escala de Duraffourd, ya que esta escala permite determinar cuantitativamente el efecto de inhibición in vitro; aunque cabe mencionar que se realizaron ciertas modificaciones de acuerdo al diámetro del disco como lo propone (Aguirre, 2020):

- Nula (-) para un diámetro igual a 20 mm.
- Sensible (+) para un diámetro entre 21 y 26 mm.
- Muy sensible (++) para un diámetro entre 27 y 32 mm.
- Altamente sensible (+++) para un diámetro mayor a 32 mm.

2.8.4 Conteo de esporas

Este proceso se llevó a cabo para establecer la efectividad del extracto frente a la inhibición de la germinación de esporas en las cajas Petri. Se tomó un cultivo de 7 días y se le colocó 5 mL de una solución de agua destilada con Tween 80 al 0.1 % alrededor del disco para obtener la suspensión principal de esporas. Después se tomó una alícuota

de 100 μL de esta solución y se diluyó en un tubo eppendorf con 900 μL de agua destilada estéril para obtener la dilución 1×10^{-1} . Este procedimiento se repitió hasta tener la dilución 1×10^{-3} . A partir de dicha dilución, se continuó con la determinación de la concentración de esporas, para lo cual se tomó una alícuota de 10 μL con la micropipeta y se depositó en la placa de la cámara de Neubauer para posteriormente observar la muestra en el microscopio (OLYMPUS) en el aumento 40X (**Lemus et al., 2008**). Se realizó el mismo procedimiento para las 15 cajas de *Oidium* y las 15 de *Fusarium*.

Finalmente se procedió a realizar el conteo de esporas utilizando los cuatro cuadrantes de 1mm^2 en la cámara de Neubauer utilizando la siguiente fórmula (**Cisneros, 2019**):

$$[\text{células/mL}] = \frac{\#células\ contadas}{\#cuadrantes} * 10^4\text{ mL} * FD$$

Donde:

[células/mL]= Concentración de células por mililitro

#células contadas= Sumatoria del número de células contadas en los cuadrantes

#cuadrantes= Número de cuadrantes donde se realizó el conteo

10^4 mL = Volumen en el cuadrante grande de cada uno de los extremos de la cuadrícula

FD= Factor de dilución

2.9 Diseño experimental

2.9.1 Tipo de diseño

Para establecer un criterio sobre el efecto del extracto a diferentes dosis frente a los hongos fitopatógenos, se procedió a realizar un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con un factor de 5 niveles (5 tratamientos) y 3 bloques (3 muestras), además se realizaron 3 repeticiones lo cual dio como resultado 45 datos experimentales para cada género de hongo.

Tabla 15*Esquema del análisis de varianza.*

Fuente de variación	Grados de libertad	
	Fórmula	Valor
Bloques	(R-1)	2
Tratamientos	(T-1)	4
Error Experimental	(R-1) (T-1)	8
Total	(R) (T) -1	14

Nota: #Repeticiones (R); #Tratamientos (T); Datos experimentales (N).

Tabla 16*Factores para el análisis estadístico de los dos géneros de hongos.*

Hongos	Dosis del extracto	Variable de interés	Definición
<i>Oidium sp.</i>	50 %	[conidios/mL]	Concentración de conidios por mililitro.
<i>Fusarium sp.</i>	75 %		
	100 %		

Con los factores establecidos en la Tabla 16 se efectuó un análisis de varianza conocido como ANOVA utilizando el programa Statgraphics en conjunto con una prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5%, con el fin de determinar si se encuentran o no diferencias significativas entre los tratamientos.

2.10 Hipótesis

Las hipótesis que fueron planteadas para analizar los resultados de la concentración de conidios por mililitro frente a las diferentes dosis del extracto fueron las siguientes:

- **Hipótesis nula (H₀):** Los tratamientos muestran resultados estadísticamente iguales. Las dosis de extracto alcohólico de hierba mora presentan efectos inhibitorios iguales a los del producto comercial usado como control positivo.
- **Hipótesis nula (H₀):** Los tratamientos muestran resultados estadísticamente diferentes. Las dosis de extracto alcohólico de hierba mora presentan efectos inhibitorios diferentes a los del producto comercial usado como control positivo.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención del extracto alcohólico

Al cabo de siete días de maceración del soluto (hierba mora) con el solvente (alcohol 70 %) se obtuvo un volumen de 500 mL después de haber filtrado el extracto con papel filtro. Este depurado fue llevado al rotavapor (IKA HB10) y se obtuvo un volumen final de 50 mL de extracto alcohólico de hierba mora. Según el cálculo teórico se presume que el extracto presentó una concentración de compuestos del 50 % m/v . Por otro lado, después de filtrar el extracto se llevó el material vegetal de hierba mora macerado a una estufa a 50 °C durante 4 horas para secarlo y registrar su peso. Con este último dato se procedió a calcular el porcentaje rendimiento, resultando en 37 % de rendimiento. En la Tabla 17 se presenta los resultados mencionados:

Tabla 17

Resultados del proceso de obtención del extracto alcohólico.

Volumen del extracto tamizado	Volumen final del extracto	Peso del soluto seco recuperado	Volumen del solvente recuperado	Rendimiento del extracto obtenido
500 mL	50 mL	18,83 g	400 mL	37 %

Fuente: Autor.

En la caracterización fitoquímica de extractos de hojas y tallos de *Solanum nigrum* realizada por **Chang et al. (2013)** se menciona que, en extractos secos de hierba mora disueltos en etanol al 70 % se determinó la presencia de metabolitos secundarios como: alcaloides, taninos, cumarinas, triterpenoides, esteroides, saponinas, y flavonoides; estos compuestos les atribuyen a las plantas una amplia variedad de propiedades que las protegen cuando se encuentran amenazadas. De igual manera, **Paixão et al. (2014)** señala que en un extracto metanólico de hierba mora obtuvo gran parte de los compuestos orgánicos mencionados por **Chang et al. (2013)**, en este caso los que tuvieron presencia cuantiosa fueron los fenoles, alcaloides, terpenos y flavonoides;


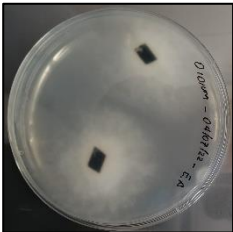




además recalca que la presencia de estos compuestos en las plantas ha evidenciado propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas, sobre todo los alcaloides, terpenos y flavonoides. Cabe resaltar que se han realizado análisis de otras plantas de la misma familia y se han encontrado los mismos metabolitos mencionados en los anteriores estudios; es por esto que **Ramírez et al. (2017)** evidenció la actividad antimicrobiana de *Solanum dolichosepalum*, la cual tiene una estrecha relación con *Solanum nigrum* y *Solanum lycopersicum*. Esto demuestra que las plantas de este género son ricas en metabolitos secundarios que tienen actividad antimicrobiana, lo que vuelve necesario profundizar en el estudio de las estructuras presentes en los compuestos encontrados para analizar con certeza su naturaleza química e interpretar su efecto frente a distintos microorganismos.

3.2 Obtención de los hongos a partir del material vegetal contaminado

Para cada género de hongos se preparó nueve cajas Petri con medio PDA para obtener las cepas a partir de las hojas de rosa con síntomas de presencia de oídio y en los tallos de alelí con síntomas de presencia de fusarium. De la cantidad mencionada se identificó a las 96 horas que cuatro cajas de *Oidium* y cuatro de *Fusarium* presentaban crecimiento micelial con las características de los hongos en estudio, por lo que se procedió a cortar un pedazo de aproximadamente 1cm de micelio con medio de cultivo y se colocó en una caja Petri nueva con medio PDA para incubarlo a 25°C por otras 96 horas para conseguir el cultivo puro. Este proceso se replicó hasta obtener cuatro cajas para cada hongo, en la Tabla 18 se muestran imágenes de las mejores cepas que crecieron de *Oidium* y *Fusarium*.

Tabla 18

Cultivos puros de Oidium sp. y Fusarium sp.

Hongo	Imagen superior	Imagen inferior	Acercamiento
<i>Oidium</i> <i>sp.</i>			
<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>			

Fuente: Autor.

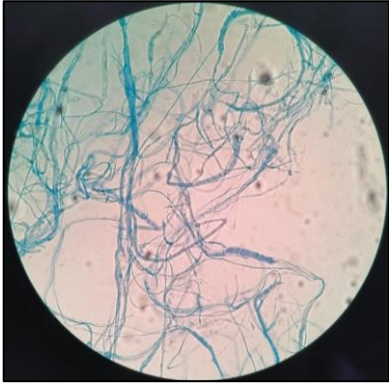
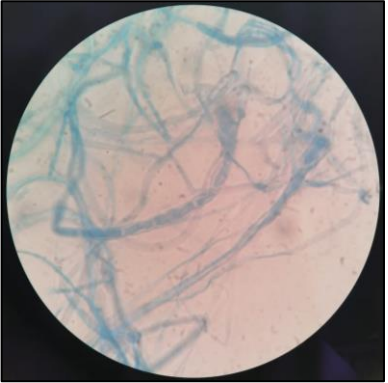
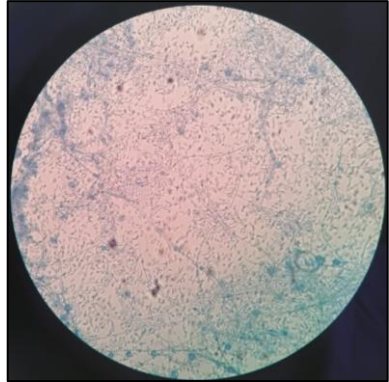
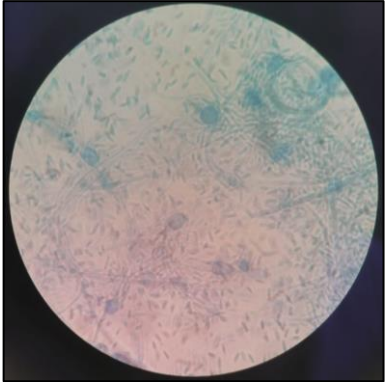
En la Tabla 18 se muestran los cultivos puros de *Oidium* y *Fusarium*. El *Oidium* presenta un micelio de color blanco con tendencia grisácea, tiene una estructura en forma de algodón polvoroso ya que se pueden apreciar diminutos puntos a su alrededor y el crecimiento de sus hifas es muy elevado por encima de la superficie del medio de cultivo como se puede ver en la imagen con acercamiento. En la descripción que hacen **Perilla & Sanabria (2007)** sobre este hongo señalan que se desarrolla un micelio blanco alargado, el cual está formado por hifas que nacen perpendiculares sobre una capa que cubre la superficie de las hojas. En cuanto al *Fusarium*, la cepa exhibe un micelio con apariencia algodonosa de color blanco con una tenue coloración anaranjada y el crecimiento de sus hifas es poco elevado. **Monzón & Rodríguez (2018)** identifican entre las características de este hongo un crecimiento micelial rápido, la pigmentación que suele presentar depende de la especie, aunque de manera general puede ser blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura y otros; además el micelio suele ser aéreo, abundante y presentar un aspecto algodonoso.

De igual manera para identificar las cepas se realizaron observaciones con un microscopio (OLYMPUS) y se aplicó azul de lactofenol para realizar la tinción de las

estructuras que los hongos presentan, obteniendo los resultados dispuestos en la Tabla 19; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.:**

Tabla 19

Observación microscópica de las estructuras de Oidium sp. y Fusarium sp.

Hongo	Microscopio 40x	Microscopio 100x
<i>Oidium sp.</i>		
<i>Fusarium sp.</i>		

Fuente: Autor.

En la Tabla 19 se presenciaron las estructuras microscópicas de *Oidium* y *Fusarium*. En la muestra de *Oidium* se observó la formación de un gran número de hifas hialinas septadas que están entrelazadas y la formación de conidios en ramificaciones; como se puede ver en 100x aumentos existen conidióforos emergiendo de las hifas y también hay formación de conidios elipsoidales; estas estructuras son descritas de igual manera por **Domínguez et al. (2016)** en su investigación sobre la cenicilla del rosal. En la muestra recogida para *Fusarium* se puede observar que de igual manera se desarrollan hifas hialinas septadas, en el aumento 100x se diferencian microconidios ovalados y alargados que no presentan septos y también se puede ver la formación de estructuras


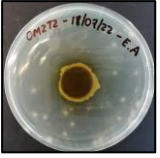
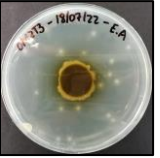
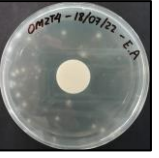
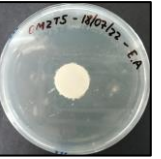


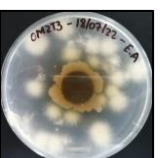





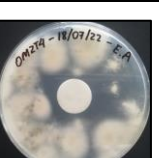
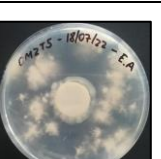





circulares que corresponde a clamidosporas aisladas; esta descripción concuerda con lo descrito por **Rentería et al. (2019)** en su artículo sobre la descripción y comparación de morfotipos de *Fusarium*.

3.3 Detección de la actividad antifúngica

A partir de 500 μL de la suspensión con la concentración de 1×10^5 esporas/mL se inoculó 15 cajas Petri con medio PDA para cada género de hongo, a las cuales se les colocó un disco de papel en el centro empapado con 500 μL de cada uno de los tratamientos mencionados. Las ilustraciones de los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20 y en la Tabla 22.

Tabla 20

Crecimiento de la muestra 2 de Oidium sp. frente a los tratamientos establecidos.

Tiempo	OM2T1	OM2T2	OM2T3	OM2T4	OM2T5
48 horas					
72 horas					
96 horas					
144 horas					

Nota: T1=50 %; T2=75 %; T3=100 %; T4=C+; T5=C-

En la Tabla 20 se aprecia los resultados del ensayo realizado en la muestra 2 de *Oidium* de cada tratamiento ya que fue la más representativa. Como se observa a las 48 horas de crecimiento ya se distinguió el desarrollo del micelio característico en toda la caja Petri lo cual es congruente con lo mencionado por **Perilla & Sanabria (2007)**, ya que señalan que el desarrollo de los conidióforos de *Oidium* suele empezar el periodo de latencia al cuarto día posterior a la inoculación. También puede apreciarse claramente que en los tres primeros tratamientos correspondientes al extracto alcohólico se desarrolló el micelio del hongo alrededor del disco de papel, demostrando un efecto inhibitorio nulo en cuanto al crecimiento del hongo *Oidium*. Esto puede corroborarse ya que a las 48 horas el disco de papel con el tratamiento cuatro, el cual sirvió como contraste positivo de control, no presentó ninguna formación a su alrededor; mientras que el tratamiento cinco, usado como contraste negativo de control, mostró una formación similar a lo observado en los tres primeros tratamientos. En el tiempo posterior a lo mencionado se observó el crecimiento micelial normal del hongo en toda la caja Petri para los distintos tratamientos, de igual manera sucedió con el tratamiento cuatro debido a que con el pasar del tiempo el diámetro del halo disminuía; es por ello que **Cisneros (2019)** indica que para el control de este hongo se utilizan distintos fungicidas, uno que sirve de contacto y se utiliza a las 24 horas posteriores a la infección del hongo, con el fin de debilitarlo y que no se generen afecciones en la calidad del cultivo; después se aplica otro con actividad sistémica para realizar el control del hongo en el cultivo, siendo los más usados los productos azufrados y triazoles.

En la Tabla 28 se presentan los datos del diámetro del halo de inhibición de las tres muestras de *Oidium* para cada tratamiento. Debido a que presentaban valores similares se procedió a determinar el promedio entre los resultados obtenidos. Es por ello que en la Tabla 21 se muestra dicho valor promedio para ubicarlo de acuerdo a la escala de Duraffourd:

Tabla 21

Valor promedio del diámetro de inhibición de las tres muestras de cada tratamiento para Oidium sp.

Hongo	Intervalo de tiempo	Diámetros del halo de inhibición (mm)				
		T1 [50%]	T2 [75%]	T3 [100%]	T4 (C+)	T5 (C-)
<i>Oidium sp.</i>	48 horas	20 -	20 -	20 -	30.3 ++	20 -
	72 horas	20 -	20 -	20 -	26.6 +	20 -
	96 horas	20 -	20 -	20 -	24.6 +	20 -
	144 horas	20 -	20 -	20 -	20 -	20 -

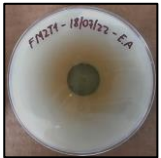
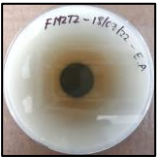
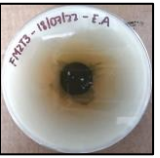


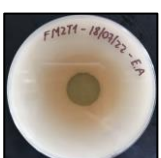

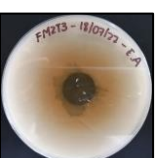

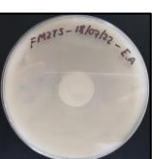
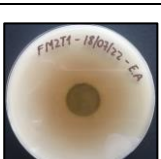

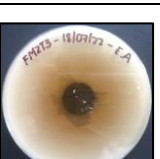
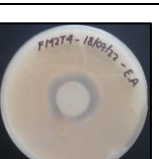
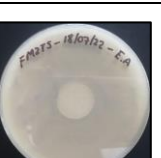


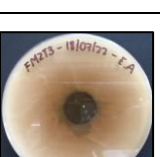

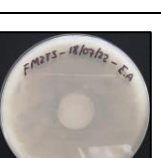
Nota: Escala de Duraffourd: Nula (-); Sensible (+); Muy sensible (++); Altamente sensible (+++)

En los resultados del promedio de las tres muestras aplicadas para cada tratamiento frente a *Oidium* se puede apreciar que no existieron datos significativos para los tratamientos que fueron preparados con el extracto alcohólico debido a que el micelio del hongo pudo desarrollarse alrededor del disco empapado. El tratamiento 4 que corresponde al control positivo con el producto comercial Orthocide presentó el mayor diámetro de halo de inhibición con 30.3 mm a las 48 horas, generando un efecto sensible (++) frente a este hongo acorde a la escala de Duraffourd.

En la Tabla 22 se puede observar un crecimiento homogéneo de *Fusarium* en toda la caja Petri, mostrando las características macroscópicas comunes de este género.

Tabla 22

Crecimiento de la muestra 2 de Fusarium sp. frente a los tratamientos establecidos.

Tiempo	FM2T1	FM2T2	FM2T3	FM2T4	FM2T5
48 horas					
72 horas					
96 horas					
144 horas					

Nota: T1=50%; T2=75%; T3=100%; T4=C+; T5=C-

Para el *Fusarium* también se utilizó la muestra 2 como la muestra más representativa del ensayo. Después de transcurrir 48 horas en incubación, este hongo presentó un desarrollo micelial normal en el tratamiento uno, pero en el tratamiento dos y en el tratamiento tres se pudo observar un pequeño halo que se formó alrededor al disco de papel. Este efecto pudo distinguirse por la comparación realizada con el control negativo, ya que en el tratamiento cinco se pudo observar el crecimiento micelial del hongo sin ningún efecto inhibitorio, tal cual ocurrió con el tratamiento uno. De los tratamientos preparados con el extracto de hierba mora se visualizó que el tratamiento tres presentó el mayor halo de inhibición, el cual como se aprecia en la Tabla 22 no tuvo una formación clara como se ve en el tratamiento cuatro. En el tiempo posterior a las 48 horas el halo que se formó en los tratamientos fue disminuyendo hasta ser opacado por el micelio al cabo de las 144 horas.

De igual manera se promedió los resultados de la Tabla 29 correspondiente a las tres muestras de cada tratamiento frente a *Fusarium*. Los valores resultantes dispuestos en la Tabla 23 fueron clasificados de acuerdo a la escala de Duraffourd, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 23

Valor promedio del diámetro de inhibición de las tres muestras de cada tratamiento para Fusarium sp.

Hongo	Intervalo de tiempo	Diámetros del halo de inhibición (mm)				
		T1 [50%]	T2 [75%]	T3 [100%]	T4 (C+)	T5 (C-)
<i>Fusarium sp.</i>	48 horas	20 -	22+	26.6 +	31.3 ++	20 -
	72 horas	20 -	20 -	24.3 +	26 +	20 -
	96 horas	20 -	20 -	20 -	20 -	20 -
	144 horas	20 -	20 -	20 -	20 -	20 -

Nota: Escala de Duraffourd: Nula (-); Sensible (+); Muy sensible (++) ; Altamente sensible (+++)

Con los valores de la Tabla 23 se pudo establecer el halo de inhibición más grande en los tratamientos a las 48 horas de crecimiento. El tratamiento preparado con extracto alcohólico que demostró una mejor respuesta frente a *Fusarium* fue el tratamiento tres con la concentración al 100 % V/V , ya que se obtuvo un diámetro promedio de 26.6 mm, lo cual en base a la escala de Duraffourd con las modificaciones realizadas en base al tamaño del disco de papel, el efecto que tuvo el extracto frente a este hongo fue muy sensible (++) . Otro de los tratamientos que surtió efecto, aunque leve, fue el tratamiento 2 con la concentración al 75 % V/V ya que se obtuvo un diámetro promedio de 22 mm, lo que en la escala de Duraffourd ubica a este valor con un efecto sensible (+). Cabe señalar que para este hongo el tratamiento 4 que corresponde al control positivo con el producto comercial Orthocide presentó el mayor diámetro de halo de inhibición con 31.3 mm resultando ser muy sensible (++) frente a *Fusarium*.

3.4 Análisis de varianza

Después del transcurso de los siete días de incubación de los inóculos se continuó con el conteo de conidios en la cámara de Neubauer. A partir de la dilución 10^{-3} de la suspensión original que fue recogida de la caja Petri, se tomaron $10 \mu\text{L}$ y se los esparció a través del cubreobjetos por efecto de capilaridad. La muestra preparada fue colocada en el microscopio (OLYMPUS) y se realizó el conteo de conidios en los cuatro cuadrantes más grandes de la cámara con $40\times$ aumentos. Este procedimiento fue realizado para las tres muestras de cada tratamiento de *Oidium* y *Fusarium*, también el conteo fue replicado dos veces más para cada uno de los tratamientos de los dos géneros de hongos, obteniendo los resultados dispuestos en las Tablas: Tabla 30, Tabla 31, Tabla 32, Tabla 33, Tabla 34, y Tabla 35. Con estos datos se obtuvo un total de 45 unidades experimentales para cada hongo y se procedió a efectuar el ANOVA con una prueba de Tukey al 5 %.

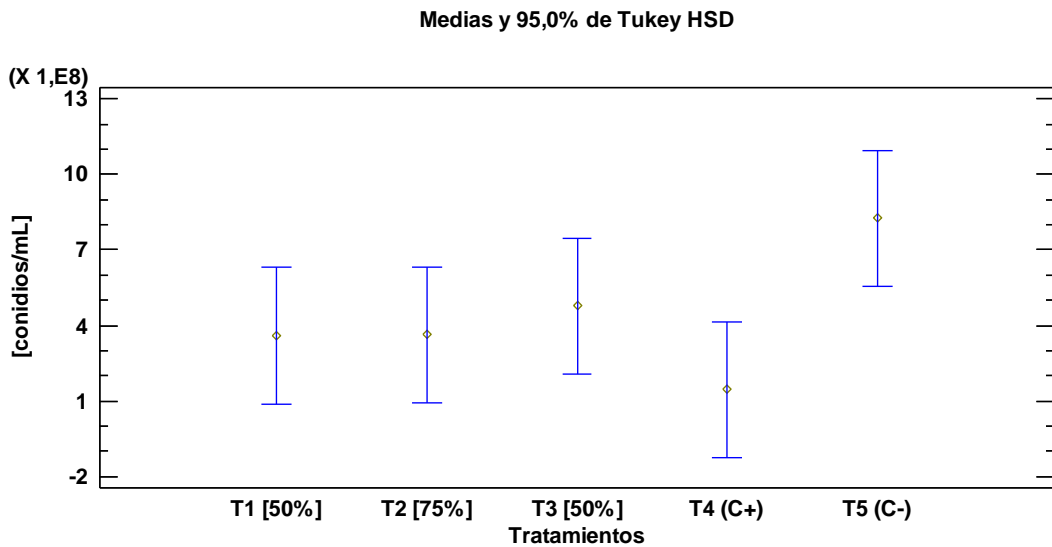


Figura 13 Gráfico de medias del conteo de conidios de *Oidium sp.*

En el gráfico de medias de *Oidium* mostrados en la Figura 13 se observa que en el gráfico de caja y bigotes los tratamientos uno, dos y tres correspondientes a las dosis del extracto alcohólico de hierba mora no presentan diferencias significativas, debido a que el valor promedio de la concentración de conidios/mL en estos tratamientos están dentro de un mismo rango. En el Anexo 12 *Resultados del ANOVA de la variable de interés para Oidium sp. en Statgraphics.* se muestra la prueba de múltiples rangos

utilizando Tukey a un nivel de significancia del 5 %, donde se puede apreciar que los tratamientos que presentan homogeneidad son los tratamientos uno, dos y tres; también se puede observar que entre el tratamiento uno y el tratamiento dos existe la menor diferencia de rangos.

Por otro lado, el tratamiento cuatro con la dosis de Orthocide presenta un valor promedio menor al de los tratamientos con el extracto alcohólico, mostrando diferencias significativas, lo cual de igual manera ocurre con el tratamiento cinco, aunque la media con la dosis de agua destilada es mayor a la de los primeros tres tratamientos. Esto evidencia que el extracto alcohólico puede generar efectos inhibitorios debido a su comparación con el tratamiento cinco (control negativo), pero este efecto no es tan eficiente como el que se logró con el tratamiento cuatro (control positivo).

Los resultados del cuadro ANOVA en el Anexo 12 *Resultados del ANOVA de la variable de interés para Oidium sp. en Statgraphics*. muestran un valor-P menor a 0.05, lo cual demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. En estas diferencias se analizó que las dosis del extracto de hierba mora no inhiben la producción de esporas de los hongos del género *Oidium sp.* en un intervalo de 7 días de desarrollo del hongo. Por lo cual se procede a rechazar la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, lo que indica que las dosis del extracto alcohólico de hierba mora muestran efectos diferentes a los obtenidos con el producto químico de control.

En publicaciones donde se utilizan extractos vegetales para el control microbiológico no siempre se logra un resultado óptimo. **Chang et al. (2013)** resalta que numerosos estudios señalan que varias especies vegetales no presentan efectos inhibitorios frente a microorganismos, como sucedió en su evaluación antimicrobiana del extracto seco de tallos y hojas de hierba mora frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*; sin embargo, cabe mencionar que el mismo extracto sí mostró un efecto en otras cepas como *S. aureus* y *B. subtilis*. **Chauhan et al. (2012)** menciona que la susceptibilidad del microorganismo al extracto crudo de hierba mora varía con respecto al microorganismo con el que se trabaje y el solvente extractor, esto debido a sus resultados negativos en cepas bacterianas y otros positivos en cepas fúngicas; además demostró que se puede obtener un mayor control utilizando metanol como solvente en

comparación con otros solventes como agua y etanol, es por ello que recomienda el uso de dicho solvente para extraer compuestos antimicrobianos de las hojas de hierba mora.

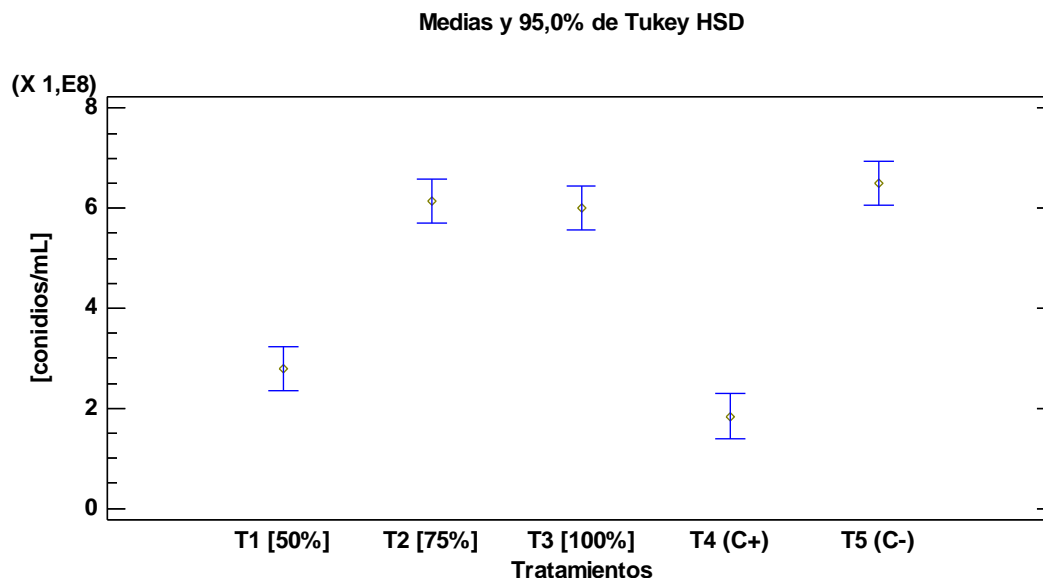


Figura 14 Gráfico de medias del conteo de conidios de *Fusarium sp.*

En la Figura 14 se muestra el gráfico de medias de las unidades experimentales del conteo de conidios de *Fusarium*, donde se puede apreciar que existe diferencias significativas en cuanto al promedio de concentración de conidios/mL de cada tratamiento. Se puede apreciar que en el gráfico de medias los tratamientos dos y tres con las dosis más concentradas del extracto alcohólico de hierba mora presentan un mayor promedio de conidios/mL en comparación con el tratamiento uno con la dosis de extracto más baja. También se observa que el tratamiento dos con el tratamiento tres son estadísticamente iguales, lo que de igual manera ocurre entre estos mismos tratamientos y el tratamiento cinco; esta igualdad fue corroborada al observar con la prueba de múltiples rangos hecha con una prueba de Tukey al 5 % de significancia, ya que los tratamientos que no presentaron diferencias significativas fueron los ya mencionados. El tratamiento uno presentó una media que no es estadísticamente igual a la media del tratamiento cuatro, pero estos promedios no son tan distantes como en el caso del tratamiento dos y tres.

En el tratamiento cuatro, preparado con Orthocide (control positivo) se evidenció el menor promedio de conidios/mL, mientras que en el tratamiento cinco, preparado con agua destilada se obtuvo el mayor promedio de la variable de interés. Al comparar los resultados de los tratamientos se puede asegurar que el tratamiento dos y tres no presentó un efecto inhibitorio de conidios de *Fusarium* ya que el valor promedio de estos tratamientos era similar al del tratamiento cinco; por otro lado, el tratamiento uno mostró el menor promedio de conidios/mL, pero debido a que este valor se encontraba por encima del valor promedio del tratamiento cuatro se asevera que el extracto alcohólico de hierba mora no mostró efectos inhibitorios más eficaces que el control positivo con el producto comercial.

Ahora bien, comparando los resultados obtenidos en el diámetro del halo de inhibición y el conteo de esporas para *Fusarium* se puede mencionar que el efecto antifúngico del extracto funciona hasta cierto intervalo de tiempo de crecimiento de este hongo, el cual fue de 48 horas. Al transcurrir más tiempo el hongo pudo generar resistencia al extracto y desarrolló sus estructuras de reproducción sin problema.

El cuadro ANOVA presente en el Anexo 13 Resultados del ANOVA de la variable de interés para *Fusarium sp.* en Statgraphics. se muestra un valor-P menor a 0.05, lo cual demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. En estas diferencias se analizó que las dosis del extracto de hierba mora no inhiben la producción de esporas de los hongos del género *Fusarium sp* en un intervalo de 7 días de desarrollo del hongo. Por lo cual se procede a rechazar la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, lo que indica que las dosis del extracto alcohólico de hierba mora muestran efectos diferentes a los obtenidos con el producto químico de control.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Las cepas aisladas en medio PDA correspondieron a los hongos *Oidium sp.* y *Fusarium sp.*, esto se pudo verificar en base a observaciones macroscópicas y microscópicas de las estructuras que se desarrollaron.
- Los ensayos de la prueba de difusión en disco y el conteo de conidios permitieron evaluar la actividad antifúngica del extracto alcohólico de hierba mora (*Solanum nigrum*).
- El extracto no mostró efecto inhibitorio sobre *Oidium sp.* debido a que en la prueba de difusión en disco no se formó el halo de inhibición con ninguna dosis del extracto. Por otra parte, en las pruebas realizadas con *Fusarium sp.* se formó un halo de inhibición a las 48 horas con las dosis del extracto al 75 y 100 % V/V , siendo esta última dosis la más efectiva.
- En el análisis de varianzas para *Oidium* los tratamientos con extracto alcohólico mostraron homogeneidad en sus valores, sin embargo, presentaron diferencias significativas con el control positivo. En cuanto al *Fusarium*, los tratamientos con extracto alcohólico de igual manera tuvieron diferencias significativas con el tratamiento de control positivo.
- Se determinó una elevada concentración de conidios/mL tanto para *Oidium* como para *Fusarium* en los tratamientos preparados con extracto alcohólico, lo cual indica que el extracto no mantiene un control sobre el desarrollo de conidios de estos hongos a largo plazo. El tratamiento tres (100 %) presentó la menor concentración de conidios/mL para *Oidium*, mientras que para el *Fusarium* fue el tratamiento uno (50 %).
- La inactividad del extracto puede atribuirse a varios factores, como puede ser el microorganismo con el que se trabaja, el solvente utilizado, el tiempo de maceración del extracto, la concentración inicial de células para el ensayo, la concentración del extracto, tiempo de análisis del ensayo y otros.

4.2 Recomendaciones

- Utilizar otros solventes para la obtención del extracto de hierba mora, ya que se ha demostrado que solventes como el metanol han extraído una mayor cantidad de metabolitos que tienen efectos antifúngicos de otras plantas.
- Aplicar otras técnicas para la obtención de compuestos de la planta hierba mora, con el fin de separar los componentes extraídos y analizar con exactitud el efecto que induce cada uno sobre diferentes microorganismos.
- Replicar este ensayo realizando los análisis del conteo de conidios en periodos de tiempo más cortos para analizar si el extracto de hierba mora genera un efecto inhibitorio, además se pueden hacer aplicaciones de manera continua para analizar si el efecto permanece nulo o si genera algún tipo de control.
- Realizar más investigaciones del uso de hierba mora, ya que como se mencionó este proyecto fue resultado de una observación de campo donde se evidenció que frente a un gran impacto de *Oidium* y *Fusarium* en cultivos, la hierba mora se desarrollaba sin problemas, a diferencia de otras plantas. Si bien en este estudio no se logró resultados positivos, con otra metodología podría ser distinto.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, K., Niaz, U., Hussain, T., Saeed, M. A., Javaid, Z., Idrees, A., & Rasool, S. (2014). Antimicrobial activity of fruits of *Solanum nigrum* and *Solanum xanthocarpum*. *Acta Pol Pharm*, 71(3), 415–421.
- Aguirre, K. (2020). *Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de Clinopodium tomentosum (Kunth) Govaerts., Tagetes minuta L., y Minthostachys mollis (Kunth) Griseb., para el control in vitro de Aspergillus niger y Fusarium oxysporum*. Ecuador: Quito: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Albán, A. (2021). *Alternativas para la reducción de Fusarium sp en el cultivo de alelí (Matthiola incana), utilizando técnicas de control fitosanitario establecidas en la finca Gemmolles SA, Cotopaxi*. Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; UTC.
- Almaraz, N., Ávila, J. A., Delgado, E. A., Naranjo, N., & Herrera, J. (2006). *El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. Vol. 1*, 39–50.
- Amaguaña, F. J., & Churuchumbi, E. F. (2018). *Estandarización fitoquímica del extracto de caléndula (Calendula officinalis)*. Ecuador: Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo Secundario de las Plantas. In *Reduca: Serie de Fisiología Vegetal*.
- Badaracco, P., Sortino, M., & Pioli, R. N. (2020). Estudio de compuestos vegetales con potencial acción antifúngica sobre patógenos de plantas cultivadas. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 36(3), 244–252.
- Badillo, G. (2017). *Evaluación de tres tipos de control para oidio (Oidium sp.) en rosa (Rosa sp.) var. Alba*. Ecuador: Quito: Universidad Central del Ecuador (UCE).
- Benítez, R., Sarria, R. A., Gallo, J. A., Pacheco, N. O. P., Sandoval, J. H. Á., & Aristizabal, C. I. G. (2019). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 15(1), 31–40.

- Cachi, K., & Cueva, M. (2018). *Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de las hojas de Solanum nigrum L. "hierba mora" en cepas de Pseudomonas aeruginosa.*
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos* (Cañedo V.). International Potato Center.
- Cantúa, J. A., Flores, A., & Valenzuela, J. H. (2019). Compuestos orgánicos volátiles de plantas inducidos por insectos: situación actual en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3), 729–742.
- Castro, M. (2019). *Hierba mora: características, hábitat y propiedades medicinales.* Lifeder. <https://www.lifeder.com/hierba-mora/>
- Celis, A., Mendoza, C. F., & Pachón, M. E. (2009). Uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses: revisión. *Temas Agrarios*, 14(1), 5–16.
- Chang, L., Garcia Lopez, A., Rosabal, Y., Espinosa, A., Ramos, M., & Remon, H. (2013). Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de hojas y tallos de Solanum nigrum L. que crece en Cuba. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(4), 30–35.
- Chauhan, R., Ruby, K. M., Shori, A., & Dwivedi, J. (2012). Solanum nigrum with dynamic therapeutic role: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 15(1), 65–71.
- Chávez, A. R., & Aquino, A. S. (2012a). Control de los hongos del suelo Rhizoctonia sp., Fusarium sp. y Sclerotium sp. con extractos vegetales. *SciELO - Investigación Agraria*, 14(1), 17–23.
- Chávez, A. R., & Aquino, A. S. (2012b). Control of soil fungi Rhizoctonia sp., Fusarium sp. and Sclerotium sp. with plant extracts. *SciELO: Investigación Agraria*, 14, 17–23.
- Chávez, I. (2013). Uso de extractos de Hierba mora y Marco para control de Rhopalosiphum maidis. *Universidad de Las Fuerzas Armadas ESPE.*
- Cisneros, M. (2019). *Evaluación In vitro de la actividad biológica antifúngica del extracto vegetal de Piper carpubya (Ruiz & Pav.) sobre Sphaerotheca pannosa*

- var. Rosae*. Universidad de las Fuerzas Armada ESPE. Carrera de Ingeniería en Biotecnología.
- Cotes, A. M., Zapata, J., Beltrán-Acosta, C., Kobayashi, S., Uribe, L., & Elad, Y. (2018). Control biológico de patógenos foliares. In *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros (Vol 1)* (pp. 58–143). Agrosavia Mosquera.
- Creus, E. G. (2004). Compuestos fenólicos. *Offarm*, 23(6), 80–84.
- Cuasés, M. (2018). *Actividad antifúngica del extracto acuoso de la planta hierba mora (solanum nigrum) sobre cepas de candida albicans ATCC® 10231™*. Estudio *in vitro*. Universidad Central del Ecuador.
- Cumbal, B. (2021). *Evaluación de tres productos de síntesis biológica para el control de oídio (Sphaerotheca pannosa) en el cultivo de rosas (Rosa sp.), var. Gotcha, en el cantón Pedro Moncayo, provincia de Pichincha 2021*. Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC).
- Domínguez, D., García, R., Mora, M. E., & Salgado, M. L. (2016). Identificación y alternativas de manejo de la cenicilla del rosal. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 22–42.
- Escobar, L. (2017). *Estudio in vitro del efecto inhibitorio del extracto de hierba mora (Solanum Nigrum) sobre el Streptococcus Mutans*. Universidad Central del Ecuador.
- Fernández, D., Romero, D., de Vicente, A., Pérez, A., Torés, J. A., López, F., & Rivera, M. (2017). Resistencia a fungicidas en el oídio de cucurbitáceas. *Agrícola Vergel: Fruticultura, Horticultura, Floricultura*, 405, 335–338.
- Fiallos, H. (2011). *Inhibición de Botrytis cinerea en rosas a base de extractos alcohólicos y acuoso de hierba mora (Solanum Nigrum)*.
- Garcés de Granada, E., Correa de Restrepo, M., Coba de Gutiérrez, B., Orozco de Amézquita, M., Zapata, A. C., Anacona Chingana, A., & Sabogal, S. P. (2003). *Morfología y clasificación de los hongos*.
- García, A. (1942). La Yerba Mora. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 5(16y17), 55–56.
- González, L. C. (1980). *Introducción a la Fitopatología*. Bib. Orton IICA/CATIE.

- Granados, M. (2018). *Identificación morfológica de hongos fitopatógenos*. Universidad de Costa Rica.
- Groenewald, S., Van den Berg, N., Marasas, W. F. O., & Viljoen, A. (2006). Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Australasian Plant Pathology*, 35(4), 401–409.
- Guevara, A. I. (2015). *Aplicación de enzimas y metabolitos secundarios para el control del oído (Oidium sp) en el cultivo de mora (Rubus glaucus Benth.)*. Universidad Técnica de Ambato.
- Hernández, A. D., Pineda, A. J., & Noriega, H. W. (2019). Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de " ají paprika" *Capsicum annum* L.(Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú. *Arnaldoa*, 26(2), 689–698.
- Juárez, G. P., Sosa, M. E., & López, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 14–23.
- Lemus, Y., Rodríguez, G., Cuervo, R., Vanegas, J. A. D., & Zuluaga, C. L. (2008). Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*). *Revista Guillermo de Ockham*, 6(1).
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.
- Leyva, S. G., Vega, H. E., Villaseñor, H. E., Tlapal, B., Vargas, M., Camacho, M., & Tovar, J. M. (2017). CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DE PUDRICIÓN DE RAÍZ DEL TRIGO EN EL BAJÍO, MÉXICO. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 33(2), 142–151.
- Luján, C. G., Martínez, A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86–96.

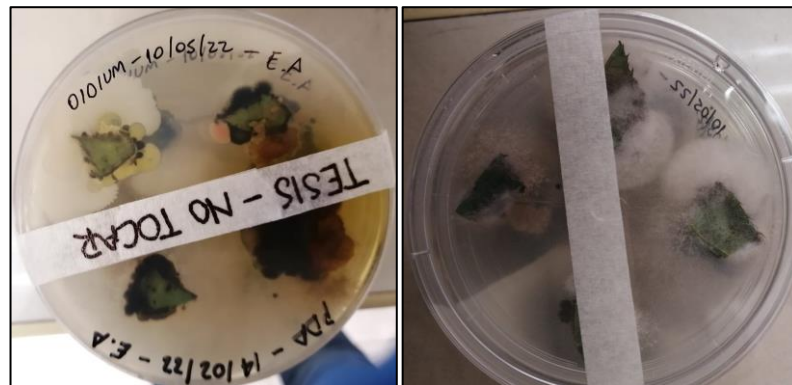
- Meyer, J. M., Rezende, F. M., Soares, S. A., & TOMBA, A. C. B. (2013). Metabolismo secundário. *Botânica No Inverno*, 210.
- Monzón, A., & Rodríguez, J. (2018). *INFECCIONES CAUSADAS POR EL GÉNERO Fusarium*. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf>
- Morales, P. (2012). Vegetales silvestres de uso alimentario: determinación de compuestos bioactivos y valoración de la capacidad antioxidante. In *Dialnet* (Vol. 13). Universidad Complutense de Madrid.
- Moreno, S., Salcedo, S., Cárdenas, M., Hernández, J., & Núñez, M. (2012). Antifungal effects of capsaicin and chile piquin extracts (*Capsicum annuum* L. Var. Aviculare) in vitro on *Aspergillus flavus* growth. *Polibotánica*, 34, 191–204.
- Ordóñez, A. (2019). *Análisis del efecto de la α -Solanina en las características citomorfológicas de células vivas adheridas y su relación con la expresión del gen Shroom3*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Paixão, A., Mancebo, B., Sánchez, L. M., Walter, A., de Fontes-Pereira, A. M. A., Soca, M., Roque, E., Costa, E., & Nicolau, S. (2014). Tamizaje fitoquímico de extractos metanólicos de *Tephrosia vogelii* Hook, *Chenopodium ambrosoides*, *Cajanus cajan* y *Solanum nigrum* L. de la provincia de Huambo, Angola. *Revista de Salud Animal*, 36(3), 164–169.
- Pereira, R. J. (2014). *COMPOSTOS BIOATIVOS VEGETAIS*. Universidade Federal do Tocantins.
- Perilla, L. A., & Sanabria, A. M. (2007). *Condiciones que favorecen el desarrollo del mildew polvoso (sphaerotheca pannosa var rosae) en los cultivos de rosa de la sabana de Bogotá*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Ramírez, A., Isaza, G., Pérez, J. E., & Martínez, M. M. (2017). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana del *Solanum Dolichosepalum* Bitter (Frutillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 0.

- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263–268.
- Rentería, M. E., Guerra, M. Á., Ochoa, A., Moreno, S. F., Meza, A. del C., & Guzmán, J. M. (2019). Descripción y comparación entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía cultivada en Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 16–34.
- Suárez, L. E. C., Cendales, D. R. M., & Orozco, C. I. (2006). Compuestos fenólicos aislados de la especie *Solanum validinervium* (Solanaceae) Sección Geminata. *Revista Colombiana de Química*, 35(1), 59–65.
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*, 31(1), 85–86.
- Toapanta, G. (2018). *APLICACIÓN DE PEROXIDO DE HIDROGENO PARA EL CONTROL DE OIDIO (Oidium sp.) EN EL CULTIVO DE MORA (Rubus glaucus Benth.) BAJO CUBIERTA PLASTICA*. Ecuador: Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
- Torres, G. A. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 17(1–3), 11–16.
- Vélez, M., Campos, R., & Sánchez, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3), 489–499.
- Vélez, P. (2014). *Aislamiento y caracterización de solanina por Espectroscopía de Infrarrojos en berenjena (Solanum melongena L.)*. Quito/PUCE/2014.
- Villa, A., Pérez, R., Morales, H. A., Basurto, M., Soto, J. M., & Martínez, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205.

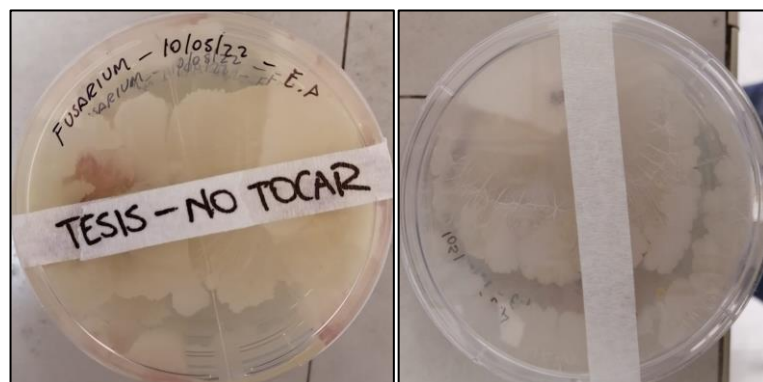
ANEXOS



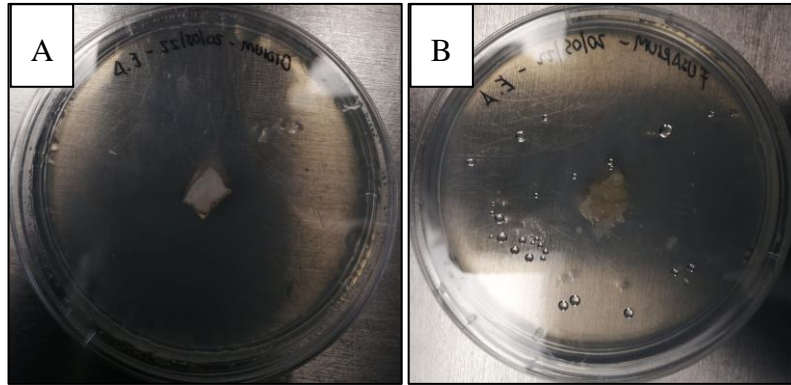
Anexo 1 Material vegetal muestreado. A) Hojas de rosa (*Rosa* sp.); B) Flores de alelí (*Matthiola incana*).



Anexo 2 Material fúngico aislado de las hojas de rosa (*Rosa* sp.) en medio PDA.



Anexo 3 Material fúngico aislado de los tallos de alelí (*Matthiola incana*) en medio PDA.



Anexo 4 Preparación de los cultivos puros a partir de las cepas aisladas del material vegetal. A) *Oidium* sp.; B) *Fusarium* sp.



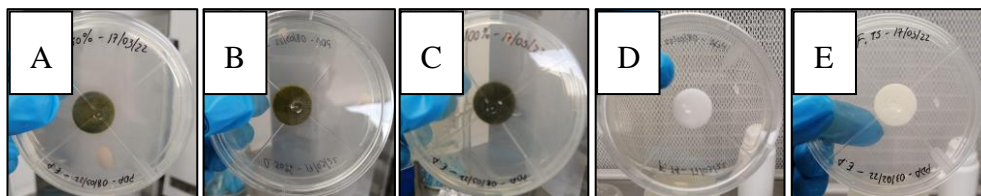
Anexo 5 Proceso de obtención del extracto alcohólico. A) Secado del material vegetal; B) Maceración de la hierba mora; C) Filtración del extracto obtenido; D) Material vegetal recuperado de la filtración.



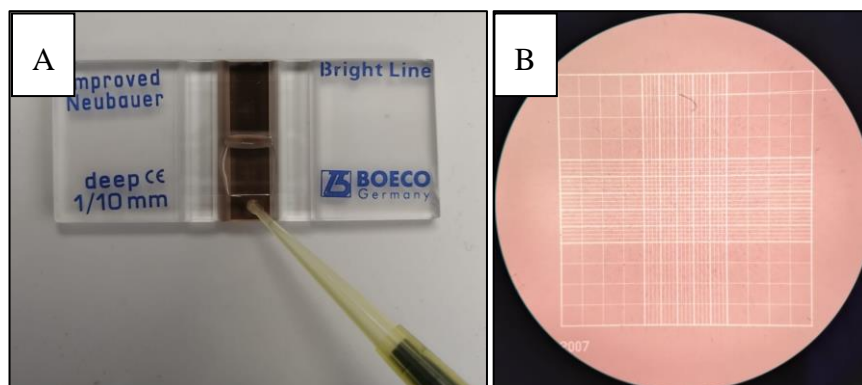
Anexo 6 Obtención del extracto alcohólico de hierba mora. A) Extracto filtrado; B) Evaporación del alcohol; C) Extracto concentrado al 100 %.



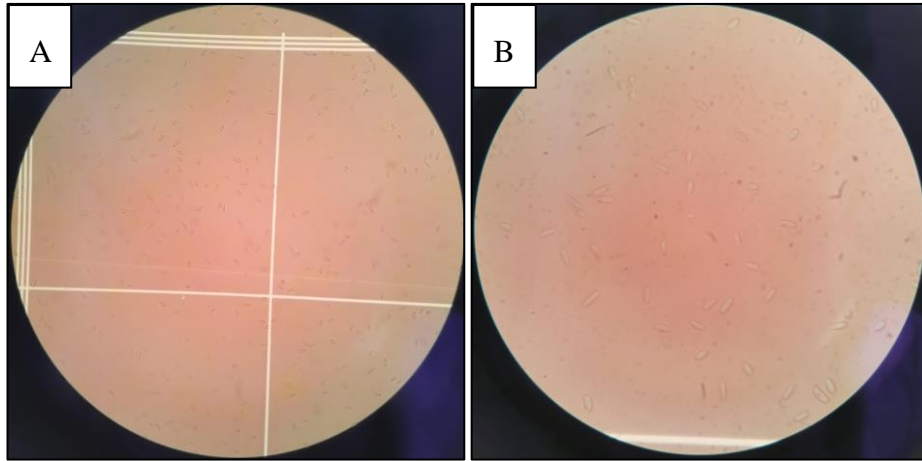
Anexo 7 *Tratamientos usados en el ensayo experimental.*



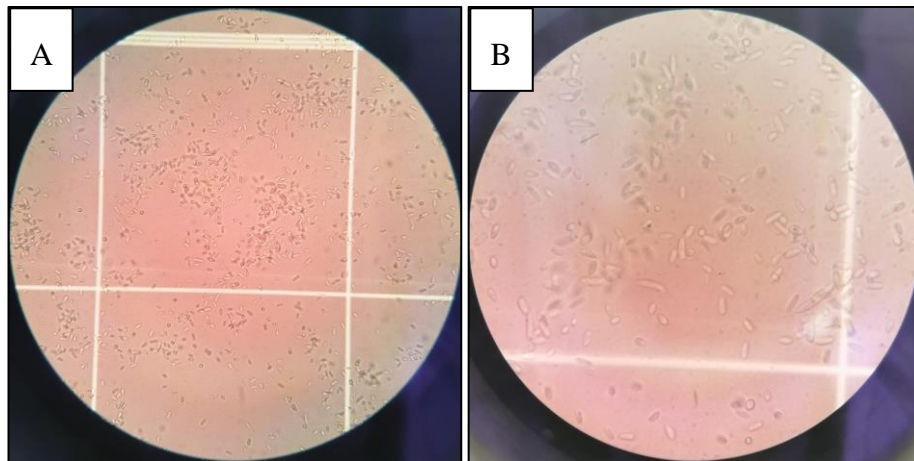
Anexo 8 *Técnica de difusión en disco. A) Tratamiento 1; B) Tratamiento 2; C) Tratamiento 3; D) Tratamiento 4; E) Tratamiento 5.*



Anexo 9 *Cámara de Neubauer. A) Preparación de la muestra; B) Observación de la cámara de Neubauer bajo el microscopio con 4x aumentos*



Anexo 10 *Conteo de conidios de Oidium. A) Observación con 40x aumentos; B) Observación con 100x aumentos.*



Anexo 11 *Conteo de conidios de Fusarium. A) Observación con 40x aumentos; B) Observación con 100x aumentos.*

Tabla 24

Crecimiento de la muestra 1 de Oidium sp. frente a los tratamientos establecidos.

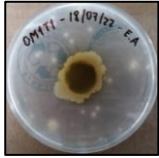
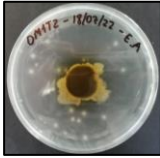
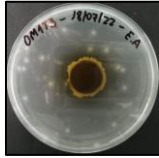
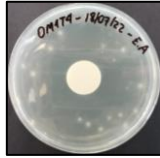
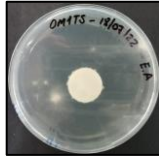
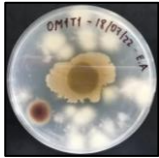
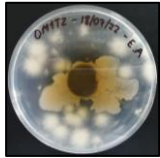
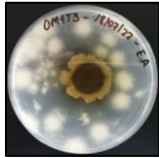
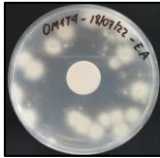

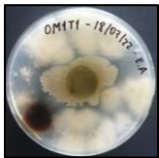

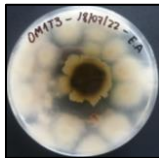

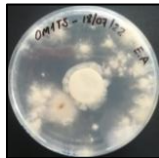





Tiempo	OM1T1	OM1T2	OM1T3	OM1T4	OM1T5
48 horas					
72 horas					
96 horas					
144 horas					

Tabla 25

Crecimiento de la muestra 3 de Oidium sp. frente a los tratamientos establecidos.

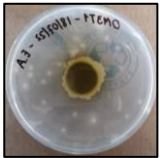
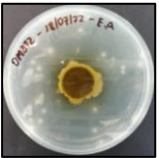
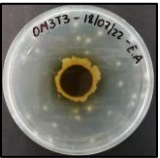
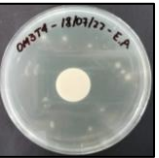
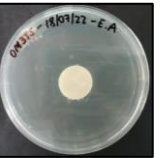

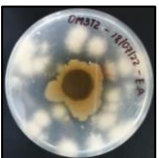
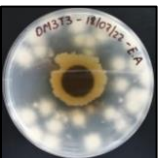

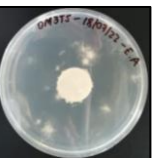
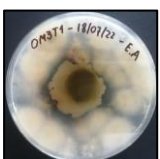
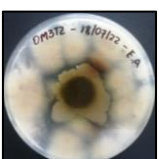
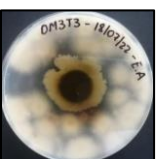







Tiempo	OM3T1	OM3T2	OM3T3	OM3T4	OM3T5
48 horas					
72 horas					
96 horas					
144 horas					

Tabla 26

Crecimiento de la muestra 1 de Fusarium sp. Frente a los tratamientos establecidos.

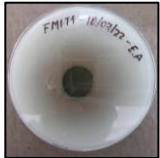





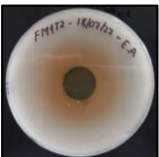
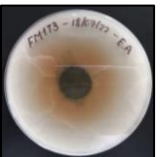
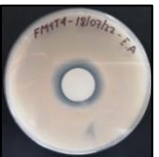


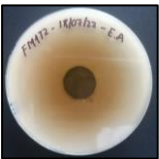
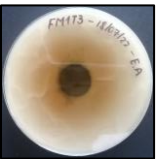



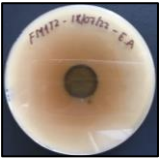
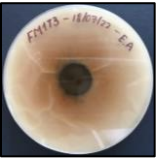
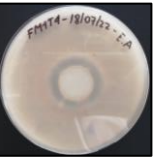
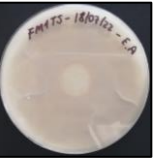
Tiempo	FM1T1	FM1T2	FM1T3	FM1T4	FM1T5
48 horas					
72 horas					
96 horas					
144 horas					

Tabla 27

Crecimiento de la muestra 3 de Fusarium sp. Frente a los tratamientos establecidos.



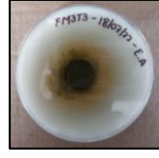


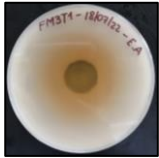
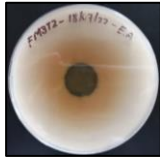
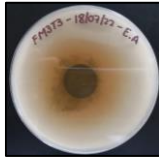

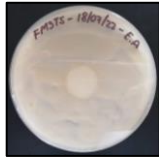
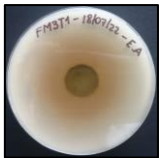
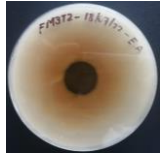
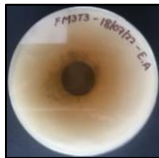


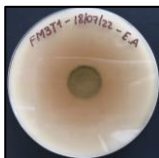
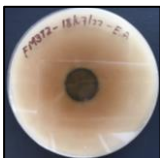
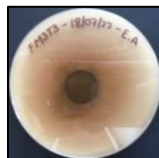


Tiempo	FM3T1	FM3T2	FM3T3	FM3T4	FM3T5
48 horas					
72 horas					
96 horas					
144 horas					

Tabla 28*Medición del halo de inhibición en Oidium sp.*

Hongo	Intervalo de crecimiento	Diámetro del halo de inhibición (mm)					
		Código	T1 [50%]	T2 [75%]	T3 [100%]	T4 (C+)	T5 (C-)
<i>Oidium sp.</i>	48 horas	OM1	20	20	20	33	20
		OM2	20	20	20	26	20
		OM3	20	20	20	32	20
	72 horas	OM1	20	20	20	27	20
		OM2	20	20	20	24	20
		OM3	20	20	20	29	20
	96 horas	OM1	20	20	20	24	20
		OM2	20	20	20	23	20
		OM3	20	20	20	27	20
	144 horas	OM1	20	20	20	20	20
		OM2	20	20	20	20	20
		OM3	20	20	20	20	20

Tabla 29*Medición del halo de inhibición en Fusarium sp.*

Hongo	Intervalo de crecimiento	Diámetro del halo de inhibición (mm)					
		Código	T1 [50%]	T2 [75%]	T3 [100%]	T4 (C+)	T5 (C-)
<i>Fusarium sp.</i>	48 horas	FM1	20	22	25	30	20
		FM2	20	22	27	33	20
		FM3	20	22	28	31	20
	72 horas	FM1	20	20	22	23	20
		FM2	20	20	25	22	20
		FM3	20	20	26	22	20
	96 horas	FM1	20	20	20	20	20
		FM2	20	20	20	20	20
		FM3	20	20	20	20	20
	144 horas	FM1	20	20	20	20	20
		FM2	20	20	20	20	20
		FM3	20	20	20	20	20

Tabla 30*Repetición 1 del conteo de conidios de Oidium sp.*

Código	Número de conidios por cuadrante				Sumatoria	[conidios/mL]
	CSI	CSD	CII	CID		
OM1T1	35	42	50	42	169	4,23E+08
OM2T1	57	46	71	62	236	5,90E+08
OM3T1	44	65	49	61	219	5,48E+08
OM1T2	60	76	84	96	316	7,90E+08
OM2T2	47	72	49	58	226	5,65E+08
OM3T2	38	36	46	43	163	4,08E+08
OM1T3	98	112	123	137	470	1,18E+09
OM2T3	47	40	54	38	179	4,48E+08
OM3T3	48	35	33	31	147	3,68E+08
OM1T4	23	26	34	26	109	2,73E+08
OM2T4	15	17	20	14	66	1,65E+08
OM3T4	20	13	16	15	64	1,60E+08
OM1T5	135	143	117	125	520	1,30E+09
OM2T5	125	117	132	108	482	1,21E+09
OM3T5	115	121	131	124	491	1,23E+09

Nota: El factor de dilución usado para todos los tratamientos fue de 10³.

Tabla 31*Repetición 2 del conteo de conidios de Oidium sp.*

Código	Número de conidios por cuadrante				Sumatoria	[conidios/mL]
	CSI	CSD	CII	CID		
OM1T1	39	45	64	59	207	5,18E+08
OM2T1	51	53	61	57	222	5,55E+08
OM3T1	56	51	78	49	234	5,85E+08
OM1T2	38	59	64	71	232	5,80E+08
OM2T2	52	46	48	50	196	4,90E+08
OM3T2	52	42	37	39	170	4,25E+08
OM1T3	128	152	134	125	539	1,35E+09
OM2T3	52	44	41	44	181	4,53E+08
OM3T3	47	42	55	48	192	4,80E+08
OM1T4	31	35	25	33	124	3,10E+08
OM2T4	23	31	26	19	99	2,48E+08
OM3T4	16	14	15	14	59	1,48E+08
OM1T5	140	127	122	136	525	1,31E+09
OM2T5	104	117	96	113	430	1,08E+09
OM3T5	113	128	135	126	502	1,26E+09

Nota: El factor de dilución usado para todos los tratamientos fue de 10³.

Tabla 32*Repetición 3 del conteo de conidios de Oidium sp.*

Código	Número de conidios por cuadrante				Sumatoria	[conidios/mL]
	CSI	CSD	CII	CID		
OM1T1	44	27	33	40	144	3,60E+08
OM2T1	43	50	51	54	198	4,95E+08
OM3T1	35	48	41	49	173	4,33E+08
OM1T2	64	49	56	75	244	6,10E+08
OM2T2	61	56	45	59	221	5,53E+08
OM3T2	41	30	49	33	153	3,83E+08
OM1T3	115	96	139	148	498	1,25E+09
OM2T3	38	36	43	39	156	3,90E+08
OM3T3	43	36	40	45	164	4,10E+08
OM1T4	36	45	24	30	135	3,38E+08
OM2T4	17	22	16	18	73	1,83E+08
OM3T4	22	13	18	15	68	1,70E+08
OM1T5	133	117	127	119	496	1,24E+09
OM2T5	116	109	124	101	450	1,13E+09
OM3T5	132	124	120	119	495	1,24E+09

Nota: El factor de dilución usado para todos los tratamientos fue de 10³.

Tabla 33*Repetición 1 del conteo de conidios de Fusarium sp.*

Código	Número de conidios por cuadrante				Sumatoria	[conidios/mL]
	CSI	CSD	CII	CID		
FM1T1	314	282	326	389	1311	3,28E+08
FM2T1	306	249	278	272	1105	2,76E+08
FM3T1	236	249	306	213	1004	2,51E+08
FM1T2	65	80	73	63	281	7,03E+08
FM2T2	69	60	71	68	268	6,70E+08
FM3T2	61	73	64	69	267	6,68E+08
FM1T3	69	79	64	80	292	7,30E+08
FM2T3	64	84	71	78	297	7,43E+08
FM3T3	54	53	56	58	221	5,53E+08
FM1T4	25	16	13	19	73	1,83E+08
FM2T4	21	18	12	16	67	1,68E+08
FM3T4	26	14	13	15	68	1,70E+08
FM1T5	72	61	67	73	273	6,83E+08
FM2T5	78	54	66	61	259	6,48E+08
FM3T5	56	61	59	70	246	6,15E+08

Nota: El factor de dilución usado para el tratamiento 1 (T1) fue de 10², para el resto de tratamientos fue de 10³.

Tabla 34*Repetición 2 del conteo de conidios de Fusarium sp.*

Código	Número de conidios por cuadrante				Sumatoria	[conidios/mL]
	CSI	CSD	CII	CID		
FM1T1	306	268	287	273	1134	2,84E+08
FM2T1	284	243	292	248	1067	2,67E+08
FM3T1	288	312	294	305	1199	3,00E+08
FM1T2	54	62	47	59	222	5,55E+08
FM2T2	54	63	59	78	254	6,35E+08
FM3T2	51	76	63	54	244	6,10E+08
FM1T3	55	39	48	57	199	4,98E+08
FM2T3	59	65	72	53	249	6,23E+08
FM3T3	59	83	62	77	281	7,03E+08
FM1T4	15	11	17	22	65	1,63E+08
FM2T4	15	13	19	25	72	1,80E+08
FM3T4	32	25	19	28	104	2,60E+08
FM1T5	83	68	75	78	304	7,60E+08
FM2T5	84	63	77	67	291	7,28E+08
FM3T5	47	63	66	78	254	6,35E+08

Nota: El factor de dilución usado para el tratamiento 1 (T1) fue de 10^2 , para el resto de tratamientos fue de 10^3 .

Tabla 35*Repetición 3 del conteo de conidios de Fusarium sp.*

Código	Número de conidios por cuadrante				Sumatoria	[conidios/mL]
	CSI	CSD	CII	CID		
FM1T1	284	245	263	227	1019	2,55E+08
FM2T1	289	238	266	241	1034	2,59E+08
FM3T1	297	244	301	288	1130	2,83E+08
FM1T2	58	63	45	48	214	5,35E+08
FM2T2	82	55	67	58	262	6,55E+08
FM3T2	49	45	56	52	202	5,05E+08
FM1T3	66	44	52	49	211	5,28E+08
FM2T3	67	46	51	52	216	5,40E+08
FM3T3	48	39	53	56	196	4,90E+08
FM1T4	21	13	14	16	64	1,60E+08
FM2T4	23	14	18	20	75	1,88E+08
FM3T4	18	12	23	21	74	1,85E+08
FM1T5	73	59	64	67	263	6,58E+08
FM2T5	60	48	54	68	230	5,75E+08
FM3T5	61	57	54	49	221	5,53E+08

Nota: El factor de dilución usado para el tratamiento 1 (T1) fue de 10^2 , para el resto de tratamientos fue de 10^3 .

ANOVA Multifactorial - [conidios/mL]					
Análisis de Varianza para [conidios/mL] - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamientos	2,23722E18	4	5,59304E17	3,50	0,0158
B:BLOQUE	2,43989E17	2	1,21995E17	0,76	0,4733
RESIDUOS	6,07668E18	38	1,59913E17		
TOTAL (CORREGIDO)	8,55789E18	44			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para [conidios/mL] por Tratamientos					
Método: 95,0 porcentaje LSD					
Tratamientos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
T4 (C+)	9	1,45657E8	1,33297E8	X	
T1 [50%]	9	3,59098E8	1,33297E8	X	
T2 [75%]	9	3,63718E8	1,33297E8	X	
T3 [50%]	9	4,77722E8	1,33297E8	XXX	
T5 (C-)	9	8,25122E8	1,33297E8	X	

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 [50%] - T2 [75%]		-4,62E6	3,8162E8
T1 [50%] - T3 [50%]		-1,18624E8	3,8162E8
T1 [50%] - T4 (C+)		2,13441E8	3,8162E8
T1 [50%] - T5 (C-)	*	-4,66024E8	3,8162E8
T2 [75%] - T3 [50%]		-1,14004E8	3,8162E8
T2 [75%] - T4 (C+)		2,18061E8	3,8162E8
T2 [75%] - T5 (C-)	*	-4,61404E8	3,8162E8
T3 [50%] - T4 (C+)		3,32066E8	3,8162E8
T3 [50%] - T5 (C-)		-3,474E8	3,8162E8
T4 (C+) - T5 (C-)	*	-6,79466E8	3,8162E8

* indica una diferencia significativa.

Anexo 12 Resultados del ANOVA de la variable de interés para *Oidium sp.* en Statgraphics.

Analizar Experimento - [conidios/mL]					
Análisis de Varianza para [conidios/mL] - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamientos	1,70328E18	4	4,2582E17	99,41	0,0000
B:BLOQUE	4,79698E15	2	2,39849E15	0,56	0,5759
RESIDUOS	1,62773E17	38	4,28349E15		
TOTAL (CORREGIDO)	1,87085E18	44			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					
Pruebas de Múltiple Rangos para [conidios/mL] por Tratamientos					
Método: 95,0 porcentaje LSD					
Tratamientos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
T4 (C+)	9	1,84111E8	2,18161E7	X	
T1 [50%]	9	2,78111E8	2,18161E7	X	
T3 [100%]	9	6,00889E8	2,18161E7	X	
T2 [75%]	9	6,15111E8	2,18161E7	X	
T5 (C-)	9	6,50556E8	2,18161E7	X	
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites		
T1 [50%] - T2 [75%]	*	-3,37E8	6,24581E7		
T1 [50%] - T3 [100%]	*	-3,22778E8	6,24581E7		
T1 [50%] - T4 (C+)	*	9,4E7	6,24581E7		
T1 [50%] - T5 (C-)	*	-3,72444E8	6,24581E7		
T2 [75%] - T3 [100%]		1,42222E7	6,24581E7		
T2 [75%] - T4 (C+)	*	4,31E8	6,24581E7		
T2 [75%] - T5 (C-)		-3,54444E7	6,24581E7		
T3 [100%] - T4 (C+)	*	4,16778E8	6,24581E7		
T3 [100%] - T5 (C-)		-4,96667E7	6,24581E7		
T4 (C+) - T5 (C-)	*	-4,66444E8	6,24581E7		
* indica una diferencia significativa.					

Anexo 13 Resultados del ANOVA de la variable de interés para *Fusarium* sp. en Statgraphics.