



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Evaluación de la actividad antifúngica del extracto total de una especie de la familia Ericaceae sobre el agente etiológico *Neopestalotiopsis javaensis*”

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO AGROPECUARIO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 4. Gestión sostenible y aprovechamiento de los recursos naturales

SUBLÍNEA: Desarrollo y sostenibilidad

AUTOR: RUANO PÉREZ JOSUÉ DAVID

ASESOR: Dra. YADIRA FERNANDA ORDOÑEZ VIVANCO, Ph.D.

Ibarra, septiembre de 2022

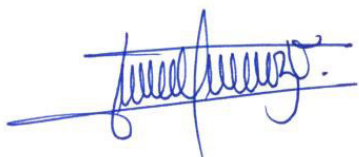
Ibarra, septiembre de 2022

Dra. Yadira Fernanda Ordoñez Vivanco, Ph.D.

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigente en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



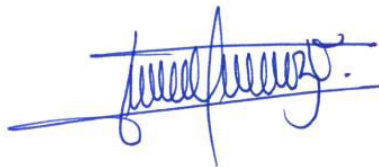
(f).....

Yadira Fernanda Ordoñez Vivanco, Ph.D.

C.C.: 1103764864

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):



(f).....

Yaira Fernanda Ordoñez Vivanco, Ph.D.

C.C.: 1100364864



(f).....

MSc. Lennys Beatriz Berutti Suarez

C.C.: 1757289986



(f).....

Diego Manuel León Tapia, Ph.D.

C.C.: 1711668895

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo JOSUÉ DAVID RUANO PÉREZ, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 de Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derecho de disponer de sus derechos o autorizar de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, septiembre de 2022



f):

JOSUÉ DAVID RUANO PÉREZ

C.C.: 1004579403

AUTORÍA

Yo, JOSUÉ DAVID RUANO PÉREZ, portador de la cédula de ciudadanía N° 1004579403, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.



f):

JOSUÉ DAVID RUANO PÉREZ

C.C.: 1004579403

DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación de Proyecto de Titulación: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO TOTAL DE UNA ESPECIE DE LA FAMILIA ERICACEAE SOBRE EL AGENTE ETIOLÓGICO *Neopestalotiopsis javaensis***, lo propuesto en el Código de Ética de la investigación y el aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha septiembre de 2022

Para constancia firma:



f):

Josué David Ruano Pérez

Estudiante que ejecuta el trabajo de Titulación

C.C/ Pasaporte: 1004579403

Carrera: Ingeniería Agropecuaria

Ibarra, septiembre de 2022

DEDICATORIA

A Dios, mis padres y hermanos quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera, por sus consejos, su paciencia y sobre todo a su apoyo incondicional para poder cumplir este sueño de ser un Ingeniero Agropecuario.

AGRADECIMIENTO

Agradecer principalmente a Dios por darme la vida y poner en mí la sabiduría y la fuerza para terminar mi carrera universitaria. A mis Padres, por ser la voz de aliento y superación para formarme como una persona.

Un sincero agradecimiento a mi asesora de tesis, la PhD. Yadira Ordoñez, quien con paciencia me supo guiar durante todo el proceso de mi trabajo de titulación.

Agradezco infinitamente a todos los docentes de mi carrera quienes con sus conocimientos me han ayudado a crecer profesionalmente.

ÍNDICE

RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
CAPÍTULO I	12
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO II	14
OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo general	14
2.2. Objetivos específicos	14
2.3. Hipótesis.....	14
CAPÍTULO III.....	15
ESTADO DEL ARTE	15
3.1. Métodos de obtención de extractos naturales	15
3.1.1. Digestión	15
3.1.2. Maceración	15
3.1.3. Percolación	16
3.1.4. Extracción con fluidos supercríticos	16
3.1.5. Infusión y Decocción	16
3.1.6. Extracción Soxhlet	17
3.2. Especie vegetal en estudio	17
3.2.1. <i>Pernettya prostrata</i>	17
3.2.2. Actividad biológica de la especie vegetal en estudio	18
3.3 Neopestalotiopsis.....	19

3.3.1. Propagación de <i>Neopestalotiopsis</i>	20
3.3.2. Síntomas	20
3.3.3. Morfología.....	20
3.4 Cultivo de aguacate <i>Persea americana</i> M.....	21
3.4.1. Características del aguacate.....	23
3.4.2. Importancia del aguacate.....	23
3.4.3. Enfermedad de la roña.....	24
3.4.4. Síntomas	24
3.4.5. Control de la roña.....	24
CAPÍTULO IV	26
MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. Materiales.....	26
4.1.1. Equipos de laboratorio.....	26
4.1.2. Materiales de laboratorio	26
4.1.3. Reactivos	27
4.2. Métodos.....	27
4.2.1. Recolección de la especie vegetal	27
4.2.2. Recolección e identificación taxonómica de especie vegetal	28
4.2.3. Obtención del extracto total.....	29
4.2.4. Aislamiento del hongo <i>Neopestalotiopsis javaensis</i> aislado de plantas enfermas de aguacate. <i>Persea americana</i>	31
4.2.5. Caracterización morfológica del hongo <i>Neopestalotiopsis javaensis</i> aislado de plantas enfermas de aguacate, <i>Persea americana</i>	32

4.2.6. Caracterización molecular del hongo <i>Neopestalotiopsis javaensis</i> aislado de plantas enfermas de aguacate, <i>Persea americana</i>	32
4.2.7. Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de extractos totales de una especie vegetal de la familia Ericaceae mediante ensayos de actividad biológica	33
4.3. Diseño experimental.....	34
4.3.1. Unidad experimental	34
4.3.2. Tratamientos	34
Variables	35
CAPÍTULO V	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1. Obtención del extracto total	37
5.2. Caracterización molecular del hongo <i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	37
5.2.1. Aislamiento del hongo <i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	37
5.2.2. Caracterización morfológica	39
5.2.3. Caracterización molecular	40
5.3. Determinación del crecimiento diario	41
5.4. Evaluación antifúngica <i>in vitro</i> del extracto total de <i>Pernettya prostrata</i>	42
CAPÍTULO VI	47
CONCLUSIONES	47
CAPÍTULO VII	48
RECOMENDACIONES.....	48
CAPÍTULO VIII.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Persea americana</i>	22
Tabla 2 Área de colecta de la especie <i>Pernettya prostrata</i>	29
Tabla 3 Tratamientos a evaluar.....	35
Tabla 4 Porcentaje del rendimiento de extracto total.....	37
Tabla 5 Crecimiento diario de <i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	42
Tabla 6 Datos de inhibición de crecimiento de <i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Pernettya prostrata</i>	18
Figura 2 Mapa de recolección de la especie vegetal.....	28
Figura 3 Obtención del extracto	30
Figura 4 Aislamiento de <i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	31
Figura 5 Evaluación de la actividad antifúngica in vitro	34
Figura 6 Aislamiento de <i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	38
Figura 7 Cultivo puro de <i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	38
Figura 8 Caracterización morfológica de <i>Neopestalotiopsis javaensis</i> A. Parte frontal de la colonia B. Parte posterior de la colonia	39
Figura 9 Fragmentos amplificados con primers ITS1/ITS4	41
Figura 10 Evaluación antifúngica del extracto de <i>Pernettya prostrata</i>	43
Figura 11 <i>Neopestalotiopsis javaensis</i> tratada con Oxidloruro de Cobre	45
Figura 12 Evaluación antifúngica del extracto de <i>Bidens andicola</i>	46
Figura 13 Evaluación antifúngica de <i>Gazania splendens</i>	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Recolección de la especie <i>Pernettya prostrata</i>	54
Anexo 2 Limpieza de la especie en estudio	54
Anexo 3 Selección de ejemplares para el montaje	55
Anexo 4 Prensado de los ejemplares del montaje para su secado	55
Anexo 5 Triturado de la especie en estudio para su secado	56
Anexo 6 Muestras listas para la estufa	57
Anexo 7 Secado de muestras en la estufa.....	57
Anexo 8 Peso total de la muestra seca.....	58
Anexo 9 Montaje de las muestras.....	58
Anexo 10 Montajes que reposan en el herbario de la PUCE-SI.....	59
Anexo 11 Elaboración de medio de cultivo PDA + Estreptomicina	59
Anexo 12 Selección de frutos con lesiones de roña	60
Anexo 13 Siembra de lesiones de roña en el medio de cultivo PDA +Estreptomicina.....	60
Anexo 14 Crecimiento micelial en el medio de cultivo PDA +Estreptomicina	61
Anexo 15 Cultivos puros de <i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	61
Anexo 16 Pesaje de muestras trituradas de <i>Pernettya prostrata</i>	62
Anexo 17 Muestras maceradas de <i>Pernettya prostrata</i>	62
Anexo 18 Filtrado de la muestra de <i>Pernettya prostrata</i>	63
Anexo 19 Muestra en el rotavapor para evaporar el solvente metanol	63
Anexo 20 Extracto total obtenido	64
Anexo 21 Elaboración de la concentración máxima del extracto	64

Anexo 22 Uso del ultrasonido para mejor recuperación del extracto.....	65
Anexo 23 Dilución del extracto total de <i>Pernettya prostrata</i> en las diferentes concentraciones	65
Anexo 24 Concentraciones de <i>Pernettya prostrata</i>	66
Anexo 25 Siembra del patógeno con la metodología de Kirby-Bauer	66
Anexo 26 Muestras para la evaluación antifúngica in vitro	67
Anexo 27 Muestras sin actividad antifúngica.....	67
Anexo 28 Control Positivo	68
Anexo 29 Muestras con menor cantidad del patógeno.....	68
Anexo 30 Identificación molecular	69
Anexo 31 Secuencia molecular	70

RESUMEN

A nivel mundial el consumo de aguacate ha estado en una tendencia creciente en los últimos años, por lo que en el Ecuador se ha incrementado su producción; sin embargo, la calidad del producto se ha visto afectada mayoritariamente por la aparición de la enfermedad conocida como “roña”, con el fin de buscar alternativas para este problema, se ha hecho uso de extractos vegetales que presentan actividad antifúngica y a su vez, ofrezcan alternativas al uso de fungicidas sintéticos y reduzcan la contaminación ambiental. El principal objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antifúngica del extracto total de la especie vegetal *Pernettya prostrata* perteneciente a la familia Ericaceae sobre el agente etiológico *Neopestalotiopsis javaensis*. Para cumplir con el objetivo planteado se recolectó la especie vegetal en la Laguna de Cuicocha, misma que fue sometida a un proceso de deshidratación para luego obtener el extracto total mediante el proceso de maceración dinámica usando metanol como solvente, se evaluaron cuatro concentraciones seriadas de 500, 250, 125 y 62.5 mg/ml siguiendo la metodología de Kirby-Bauer de difusión directa en agar sobre el agente etiológico previamente aislado *Neopestalotiopsis javaensis*. Se obtuvo un extracto total de *Pernettya prostrata* con un rendimiento del 31,48%, sin embargo, las cuatro concentraciones estudiadas del extracto total de *Pernettya prostrata* no mostraron actividad frente al agente etiológico en estudio.

Palabras clave: *Pernettya prostrata*, *Neopestalotiopsis javaensis*, extracto vegetal, roña, actividad antifúngica

ABSTRACT

Worldwide, avocado consumption has been on a growing trend in recent years, which is why its production has increased in Ecuador; however, the quality of the product has been affected mainly by the appearance of the disease known as "scab". In order to find alternatives to this problem, plant extracts have been used that have antifungal activity and, in turn, offer alternatives to the use of synthetic fungicides and reduce environmental pollution. The main objective of this research was to evaluate the antifungal activity of the total extract of the plant species *Pernettya prostrata* belonging to the Ericaceae family on the etiological agent *Neopestalotiopsis javaensis*. In order to achieve the objective, the plant was collected in the Cuicocha Lake, which was subjected to a dehydration process to obtain the total extract through the dynamic maceration process using methanol as a solvent. It was evaluated at four serial concentrations of 500, 250, 125 and 62.5 mg/ml following the Kirby-Bauer methodology of direct diffusion in agar on the previously isolated etiological agent *Neopestalotiopsis javaensis*. A total extract of *Pernettya prostrata* was obtained with a yield of 31.48%; however, the four concentrations of the total extract of *Pernettya prostrata* did not show activity antifungal against the etiological agent under study.

Keywords: *Pernettya prostrata*, *Neopestalotiopsis javaensis*, plant extract, scab, antifungal activity

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El consumo de aguacate a nivel mundial, particularmente en Estados Unidos, Alemania, Francia, España y otros países, ha causado un gran incremento en las superficies de producción de aguacate. Estados Unidos importó 3.000 millones de dólares en aguacates a nivel mundial en el año 2021 (Forbes Staff, 2022). En América Latina, se encuentra la mayor parte de producción de aguacate en el mundo y es la región con el mayor volumen de exportación de aguacate. América Latina alberga la mayor parte de la producción mundial de aguacate y es la región de exportación de aguacate más grande. El aguacate Hass es la variedad más cultivada en América Latina y la más buscada por los consumidores estadounidenses y europeos en varios mercados de exportación. Es uno de los frutales de mayor interés para la producción en los valles interandinos del Ecuador, por lo que se ha calculado una superficie estimada de 3.005 hectáreas (Viera et al., 2016).

Sin embargo, el cultivo del aguacate es muy propenso a las enfermedades generando aumentos en los costos de producción y disminuyendo significativamente la rentabilidad del cultivo. La calidad de los frutos se ve afectada por las plagas y enfermedades las cuales limitan su comercialización y exportación. Existen varios patógenos que perjudican al fruto del aguacate y siendo uno de ellos es *Neopestalotiopsis javaensis*, su incidencia se puede observar en la epidermis del fruto, haciendo que disminuya de forma considerable la calidad del producto. La enfermedad denominada roña del aguacate fue expuesta por primera vez en Florida en 1918 y hoy en día la presencia de esta enfermedad cubre todas las regiones en producción de aguacate a nivel mundial (Everett et al., 2011). Sin embargo, para entender el proceso patológico es importante una identificación del agente causal de esta enfermedad en aguacate para determinar sus manifestaciones y comprender las interacciones huésped-patógeno-ambiente. La etiología de la enfermedad proporciona los componentes básicos para establecer su tratamiento y control (Molano, 2007). El agente *Neopestalotiopsis javaensis* cuando afecta a los cultivos de aguacate, la producción se reduce tanto que la enfermedad

impide que los frutos alcancen el tamaño deseado y hace que su aspecto sea poco comercial (Molano, 2007).

En el campo existen dos alternativas para el control de plagas las cuales son, el control químico que es a base de productos químicos autorizados y el control cultural. Son actividades que permiten de cierta forma reducir los riesgos fitosanitarios de plagas y enfermedades, para de esta forma llegar a obtener un aguacate que cumpla con requerimientos de los diferentes países para su comercialización (Molano, 2007).

Hasta ahora se han evaluado los extractos de origen vegetal en el cultivo de aguacate para el manejo de la antracnosis, la presente investigación busca usar una parte de la diversidad que alberga nuestro país, ya que nos ofrece una gran biodiversidad de plantas. Estas plantas son fuente de varios compuestos bioactivos para la obtención de extractos naturales que nos ayudan para el control orgánico de las enfermedades del aguacate. Estos son compuestos que se producen por medio de la extracción de principios activos que se encuentran en tejidos vegetales, por medio de un método de extracción establecido (Ávila,2020).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica del extracto total de una especie vegetal de la familia ERICACEAE sobre el agente etiológico *Neopestalotiopsis javaensis*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el rendimiento del extracto total de una especie vegetal de la familia Ericaceae por medio de un solvente orgánico.
- Caracterizar molecularmente el hongo *Neopestalotiopsis javaensis* aislado de plantas enfermas de aguacate (*Persea americana*).
- Evaluar la actividad antifúngica in vitro del extracto total de una especie vegetal de la familia Ericaceae mediante ensayos de actividad biológica

2.3. Hipótesis

Hipótesis Alternativa (Ha): El extracto de la especie vegetal presenta actividad antifúngica.

Hipótesis Nula (Ho): Ninguno de los extractos presentan actividad antifúngica.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1. Métodos de obtención de extractos naturales

Se encuentran diferentes métodos de extracción en el laboratorio, sin embargo, existen procesos de extracción que son los más comunes usados de acuerdo al disolvente que se vaya a utilizar ya sea un solvente orgánico o agua:

Extracción por medio de agua: método de la infusión, método por medio de destilación por arrastre con vapor de agua y decocción.

Extracción por medio de solventes orgánicos: Maceración dinámica, extracción Soxhlet lixiviación, digestión y por fluido supercrítico (González, 2004).

3.1.1. Digestión

Este método particular se aplica a plantas que contienen ingredientes activos que son complejos de extraer porque están aislados en áreas consistentes de la planta, o plantas que requieren calentamiento prolongado (Velasategui, 2005).

3.1.2. Maceración

Metodología que se realiza con una temperatura controlada y a su vez protegida de la luz. Esta consiste en que el material vegetal previamente fragmentado se encuentre en remojo en el solvente de elección hasta que se introduzca y disuelva los compuestos solubles, es necesario tapar y dejar en reposo un período que va entre 2 a 14 días con agitación ocasional, el tiempo que se encuentre en maceración dependerá del material vegetal en uso. Posteriormente el líquido debe ser filtrado, se prensa el residuo, se extrae el solvente en el rotavapor y de esta forma se logra obtener el extracto (González, 2004).

3.1.3. Percolación

Este método, también llamado lixiviación, permite el uso de solventes orgánicos fríos para almacenar compuestos termolábiles que pueden estar dentro del materia vegetal. Para hacer uso de esta metodología, el material vegetal debe colocarse en un recipiente cónico antes de agregar el solvente seleccionado. Por esta razón no se recomienda este método para el hinchamiento de resinas o materiales (González, 2004).

3.1.4. Extracción con fluidos supercríticos

Los fluidos supercríticos no es más que es una sustancia que se encuentra a una presión y temperatura que está por encima del punto crítico. Estos tienen la propiedad de propagarse a través de la muestra como un gas y disuelve los materiales como un líquido. Cambian bruscamente la densidad al mínimo cambio de temperatura o de presión. Por estas propiedades lo hacen un buen reemplazante a los solventes orgánicos que normalmente son utilizados para los métodos de extracción (Velasco, et al., 2007)

El proceso consiste en triturar el material vegetal en una cámara cuyo material es de acero y dejar circular un fluido supercrítico a través de la muestra en estudio (Sánchez, 2009).

3.1.5. Infusión y Decocción

El método de infusión consiste en verter agua hirviendo sobre el material vegetal que es colocado previamente en un recipiente con tapa, para así disminuir las pérdidas de las sustancias activas, y dejar en reposo de 5 a 15 minutos (Guerra, 2005).

El procedimiento llamado decocción consiste en llevar el material vegetal a la temperatura de ebullición del agua y mantener la temperatura por un período que va entre los 15 a 30 minutos (Selles, et al., 1992).

3.1.6. Extracción Soxhlet

Este método de extracción de muestras sólidas es el más utilizado para la obtención de extractos. La muestra es introducida en el Soxhlet a través de varios procesos que permiten la recuperación de los compuestos activos. Para ello, la selección del solvente deber ser uno muy soluble, así pues, se facilita la extracción por movimiento frecuente y evaporación (Gonzáles, 2004).

3.2. Especie vegetal en estudio

3.2.1. *Pernettya prostrata*

La especie *Pernettya prostrata* pertenece a los cerca de 125 géneros y 4500 especies de Ericáceas en todo el mundo. La familia Ericaceae se encuentra distribuida en México, Venezuela, Chile, Ecuador, Colombia, Perú, Bolivia y Mesoamérica y encuentra en pantanos, zonas montañosas, bosques tropicales y subtropicales. *Pernettya prostrata* es una especie originaria de Ecuador y es conocida comúnmente como veneno de lobo, mortño venenoso, reventadera y chirradera (Romoleroux, et al., 2019).

Pernettya prostrata es un arbusto que llega hasta los tres metros de altura, presenta tallos terrestres y subterrestres, hojas alternas, con margen revoluto, ligeramente pubescente en el haz, presentan inflorescencias terminales, axiales u bisexuales, sus frutos se encuentran en bayas mostrando colores oscuros que van de violetas aproximándose a colores negros (Romoleroux, et al., 2019).

La especie en estudio también es conocida por su naturaleza alucinógena, los frutos de esta planta son tan similares a los frutos de mortño que muchas personas se confunden y luego sufren el problema de envenenamiento. En Ecuador los indígenas de los pueblos Saraguro y Shuar utilizan las hojas para tratar el dolor de cabeza. Su toxicidad se debe a la presencia de otras especies de andrometoxina o grayanotoxina de la misma familia. También es conocido que los frutos por su característica alucinógena se usaban en los rituales indígenas (Rincón, et al., 2014).

Figura 1

Pernettya prostrata



3.2.2. Actividad biológica de la especie vegetal en estudio

Belandria (2011), investigó la actividad antibacteriana de extractos naturales utilizando técnicas de dilución en agar, macro dilución, quimiotaxis y biospeckle de las especies *Gauteria buxifolia*, *Chaetolepys spp*, *Baccaris latifolia*, *Pernettya prostrata* y cinco extractos etanólicos que a su momento eran desconocidas. El extracto etanólico realizado de las hojas de la especie *Pernettya prostrata* mostró actividad contra la cepa de prueba, la única especie que mostró actividad antibacteriana.

Rincón, et al., (2014), evaluó la actividad antioxidante y tóxica de la especie *Pernettya prostrata*. Las pruebas de toxicidad en *Artemia salina* han resultado útiles para determinar la actividad biológica de productos naturales que están estrechamente relacionados con la actividad biológica, incluidas las líneas de células tumorales humanas. En las pruebas de toxicidad, se observó que la fracción aérea de la planta aumenta la toxicidad para los micro crustáceos, pero la fracción obtenida con acetato de etilo es la más activa en la prueba de inhibición de alimentación contra *Sitophilus zeamais* (gorgojo del maíz) y *Tribolium castaneum* (escarabajo rojo de la harina). La fracción de *Pernettya prostrata* fue baja y nula.

Pero se encontró que *Tribolium castaneum* era más sensible a los extractos y fracciones de *Pernettya prostrata*.

Ávila (2020), evaluó la actividad antifúngica y antimicrobiana del extracto de *Pernettya prostrata* sobre *Phytophthora infestans* a una concentración de 500 y 250 mg/ml en la cual inhibieron el crecimiento acelerado en los tres primeros días de estudio, demostrando así el potencial del extracto total como fuente de moléculas bioactivas.

El extracto total de la especie *Pernettya prostrata*, es una fuente de principios activos, por el cual pueden ayudar al descubrimiento de antifúngicos de origen natural, la cual nos proporciona la alternativa para disminuir el impacto ambiental provocado por la mayoría de antifúngicos sintéticos (Ávila, 2020).

3.3 Neopestalotiopsis

Neopestalotiopsis es un género que pertenece a la familia *Amphisphaeriaceae* que proviene de la división *Ascomycota* en el reino *Fungi* que es considerado mayoritariamente como un patógeno. Forma parte de los tres subgéneros de *Pestalotiopsis*. Este patógeno prefiere los climas templados y tropicales. Su reproducción es por medio asexual. *Neopestalotiopsis* se clasifica como un hongo hemi-biotrófico debido a que puede buscar nuevas formas de alimentarse y nutrirse como mecanismo para poder sobrevivir. Por lo que, es capaz de encontrarse en materia orgánica fresca como en materia orgánica en proceso de descomposición (Maharachchikumbura, et al., 2012).

En este género fúngico existe una gran variedad de fenotipos, por lo que se opta por buscar la similitud morfológica en sus conidios ya sea para agruparlos por género o para subdividirlos por especies. Para realizar la agrupación por especies se tiene en cuenta el largo y ancho de los conidios, número, color y sus flagelos (Maharachchikumbura, et al., 2014).

Agrios (2005), Nos dice que este género presenta estructuras protectoras en sus conidios a las cuales se las denomina como conidiomas. Estos conidiomas pueden ser variables según la especie puede depender de un acérvulo hacia un picnidio que son reconocibles por ser puntos de color café oscuro a negro (Maharachchikumbura, et al., 2011).

El género *Neopestalotiopsis* en general posee conidios de forma cilíndrica que llegan a medir entre 22 a 30 micrómetros y tienen una ligera curvatura en sus extremos. Los septos intermedios tienen un color característico que va desde un café oscuro a un color olivo con transparencia (Jeewon, et al., 2002).

3.3.1. Propagación de *Neopestalotiopsis*

La forma en la que se disemina puede realizarse por el viento y el agua hacia las plantas (Campaña, 2019). Por lo que en época de invierno en donde las precipitaciones son mayores es donde se encuentra la mayor cantidad de plantas que se han visto afectas, esto se da por los flagelos que presentan los conidios lo que ayuda a la movilización por el medio líquido (Bhagariya y Prajapati, 2019).

3.3.2. Síntomas

Los síntomas que llegan a presentar las plantas cuando han sido infectadas por *Neopestalotiopsis* son: Poco desarrollo vegetativo, marchitez, tonalidades que van desde un pardo oscuro en hojas y tallos, la necrosis es la fase final de la enfermedad que ocasiona *Neopestalotiopsis* (Bhagariya y Prajapati, 2019).

En el cultivo de aguacate *Neopestalotiopsis* es asociado con la enfermedad de la roña la cual es ocasionada el conjunto de varios hongos fitopatógenos que son *Colletotrichum sp.*, *Alternaria sp.*, *Pestalotiopsis sp.*, *Nigrospora sp.* y *Curvularia sp.* El cual *Pestalotiopsis sp.* Se puede encontrar en cualquiera de sus tres subgéneros (Martínez, et al., 2017).

3.3.3. Morfología

Agrios (2005), nos dice que este género presenta estructuras protectoras en sus conidios a las cuales se las denomina como conidiomas. Estos conidiomas pueden ser variables según la especie puede depender de un acérvulo hacia un picnidio que son reconocibles por ser puntos de color café oscuro a negro (Maharachchikumbura, et al., 2011).

El género *Neopestalotiopsis* en general posee conidios de forma cilíndrica que llegan a medir entre 22 a 30 micrómetros y tienen una ligera curvatura en sus extremos. Los septos intermedios tienen un color característico que va desde un café oscuro a un color olivo con transparencia (Jeewon, et al., 2002).

3.4 Cultivo de aguacate *Persea americana* M.

El aguacate tuvo influencia en las partes altas del centro y este de México y parte de Guatemala, región identificada como Mesoamérica, sitio en donde se sembraba por primera vez este cultivo. La llegada del aguacate a Europa y América del Sur fue durante el período colonial introducido por los españoles. El consumo de aguacate aumentó a finales del siglo XIX y principios del XX. La primera fase de la huerta comenzó tan pronto como se aceptaron técnicas de propagación más eficientes, como el injerto, y se descubrió el aguacate 'Fuerte'. (Barrientos y López, 2000).

Los aguacates pertenecen a la familia Lauraceae, y el género *Persea* incluye actualmente alrededor de 85 especies, la mayoría de las cuales se encuentran desde *Persea Borbonia* en el sur de los Estados Unidos hasta *Persea lingue* en Chile, también se encuentra en las Islas Canarias (España) y posiblemente otros al sur de Asia (Barrientos y López, 2000).

Aguacate de la variedad *Persea americana* Mill. Pertenece al subgénero *Persea*, conocido como aguacate verdadero, y es más grande que los otros subgéneros. Además de *la Persea americana* Mill de aguacates, están *Persea nubigena* (aguacate de montaña), *Persea steyermarkii* (aguacate de montaña), *Persea schiedeana* (*chinini*, *chinene*, *chenene*, *yas*, *hib*), *Persea floccosa* (aguacate cimarrón) (Barrientos y López, 2000).

En la Tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica de *Persea americana* Mill. Descrita por Bernal y Díaz (2005).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Persea americana

Categoría taxonómica	Descripción
Reino	Vegetal
División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotiledónea
Subclases	Dipétala
Orden	Ranales
Familia	Laurácea
Genero	Persea
Especie	<i>Persea americana</i>
Nombre Científico	<i>Persea americana</i> Mill.
Nombre común	Palta, aguacate, avocado.

Nota: Bernal y Díaz (2005).

3.4.1. Características del aguacate

Forma

El fruto del aguacate es una baya y varía dependiendo de las distintas variedades, no solo teniendo en cuenta su reproducción ya sea natural o artificial que tuvo la especie, sino sumando las condiciones ambientales en las que crece el cultivo, se convierte en una baya que toma una forma redondos, ovalados, en forma de pera, varios tamaños (Mejía, 2011).

Tamaño y peso

En general, el peso promedio de la mayoría de las variedades ronda los 100g, aunque las variedades de 10cm a 13cm se venden más pesadas, y también hay variedades que pesan más de 2kg, teniendo en cuenta que los pesos oscilan entre los 150g y los 350g (Vega, 2013).

Color

Hay varias variaciones en el color del fruto del aguacate, su cáscara puede variar en color de verde oscuro a verde claro, pero cuando está maduro se notan colores café, rojizo, morado y negro, su pulpa tiene colores blanquecinos, verde claro, amarillo verdoso, amarillo débil y amarillo fuerte. (Mejía, 2011).

Sabor

Tiene un sabor parecido a las avellanas y nueces, se recolecta de forma manual ya que es una fruta delicada. Para esto, use una escalera y corte su tallo por encima de la base de la fruta. Estos frutos no maduran en el árbol, sino después de la cosecha. (Vega, 2013).

3.4.2. Importancia del aguacate

Los aguacates se han convertido en un importante producto de exportación a lo largo de los años. El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) trabaja de manera eficaz con los productores para mejorar las variedades de aguacate que existen en el país, dándole mayor énfasis a la variedad Hass ya que es el producto la mayor demanda en el mundo (INIAP, 2020), son sus propiedades comerciales como su sabor, rendimiento y

oferta durante gran parte del año; lo que lo coloca a la vanguardia de los productos no tradicionales del Ecuador para la exportación (Coello, 2015).

La exportación de aguacate en 2018 obtuvo 350 millones de dólares ya que el Ministerio de Agricultura y Ganadería incentiva su producción, es el mejor elemento para la diversificación de cultivos, siendo una nueva alternativa para dinamizar la economía de los agricultores. Las exportaciones de aguacate fluctuaron debido a factores internos y externos de la economía, por lo que las exportaciones disminuyeron de 2011 a 2015, pero han aumentado de manera persistente durante los últimos cinco años, lo que resultó en una demanda mundial del 10%; a medida que la demanda crece año tras año, atrae a más productores (Flores, et al. 2021).

3.4.3. Enfermedad de la roña

La roña se encuentra en las áreas de cultivo de aguacate. La enfermedad se ve favorecida por lluvias intensas, humedad relativa local y los trips que permiten la introducción de los patógenos. Este efecto fúngico afecta a las hojas y frutos nuevos, reduciendo su calidad (Molano, 2007).

3.4.4. Síntomas

Las lesiones aparecen en frutas que son redondas o de forma irregular, de color marrón o marrón claro y parecen corcho, estas lesiones pueden estar interconectadas y afectar a la mayoría de las frutas. Mientras que las lesiones en las hojas y los brotes nuevos se observan lesiones de color marrón oscuro, rodeadas de un halo amarillo, estas lesiones producen hojas arrugadas y en condiciones severas se pueden observar manchas necróticas en las hojas. No obstante, las afecciones solo afectan al exterior, por lo que la calidad de la pulpa no se ve afectada (Molano, 2007).

3.4.5. Control de la roña

Las ramas improductivas del interior del árbol deben podarse para facilitar la ventilación y la entrada de luz solar, además, de retirar las ramas enfermas. Uno de los controles químicos

que suele aplicarse es oxiclورو de cobre, las dosis se aplican en una proporción de 100 g/100 L de agua con fines preventivos o 500-700 g/100 L de agua cuando existe presencia del agente causal de la roña, el tratamiento se aplica al inicio de la floración y se repite en función del aspecto, cuaje y desarrollo del fruto (INIAP, 2014).

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Equipos de laboratorio

- Molino de cuchillas Retsch modelo GM 200
- Estufa BioBase modelo BJPX-Spring
- Plato agitador magnético MSH-30D WiseStir
- Rotavapor Buchi Rotavapor R-215
- Ultrasonido Wise Clean
- Cámara de flujo laminar (N-Biotek)
- Autoclave vertical (N-Biotek modelo: NB-1080)
- Balanza analítica (ADAM modelo: PW 254)

4.1.2. Materiales de laboratorio

- Matraz de Erlenmeyer
- Balón aforado
- Papel filtro
- Cajas Petri
- Hisopos estériles
- Frasco boeco
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Asa bacteriológica
- Porta objetos
- Micro pipetas
- Puntas

4.1.3. Reactivos

- Papa dextrosa agar PDA
- Metanol $\geq 99.9\%$
- Estreptomicina
- Agua destilada
- Lugol
- Alcohol 70 %
- Hipoclorito de sodio 2 %

4.2. Métodos

4.2.1. Recolección de la especie vegetal

La presente investigación se realizó en los laboratorios de la PUCESI, en la provincia de Imbabura, la especie vegetal *Pernettya prostrata*, perteneciente a la familia Ericaceae fue recolectada en la parroquia Quiroga, perteneciente al cantón Cotacachi.

Para la recolección, se seleccionó la especie vegetal *Pernettya prostrata* ya que, según reportes de literatura, presenta actividad biológica tanto en bacterias como en hongos (Ávila, 2020), se recolectaron alrededor de ocho muestras vegetales de 45 cm de longitud de ramas terminales que presentaban flores y frutos, con ayuda del GPS se georreferenció el lugar de recolección de las especies. Las muestras destinadas para la obtención del extracto total se etiquetaron y almacenaron en bolsas de papel para luego ser tratadas, mientras que, las muestras que quedaran como ejemplares de Herbario fueron desinfectadas con alcohol al 70%, colocadas sobre papel periódico y sobre ellas papel absorbente de cocina, por último, se colocaron en tablas de madera ajustadas (Ávila, 2020).

Las muestras botánicas que reposarían en el Herbario fueron transportadas a la PUCESI, en donde se sometieron a la deshidratación por 2 horas a 50°C, se utilizó una clave dicotómica para identificar taxonómicamente la especie *Pernettya prostrata*, se colocó el código de

Herbario de la PUCE-SI, *Pernettya prostrata* reposa con el código de identificación N° 0007833.

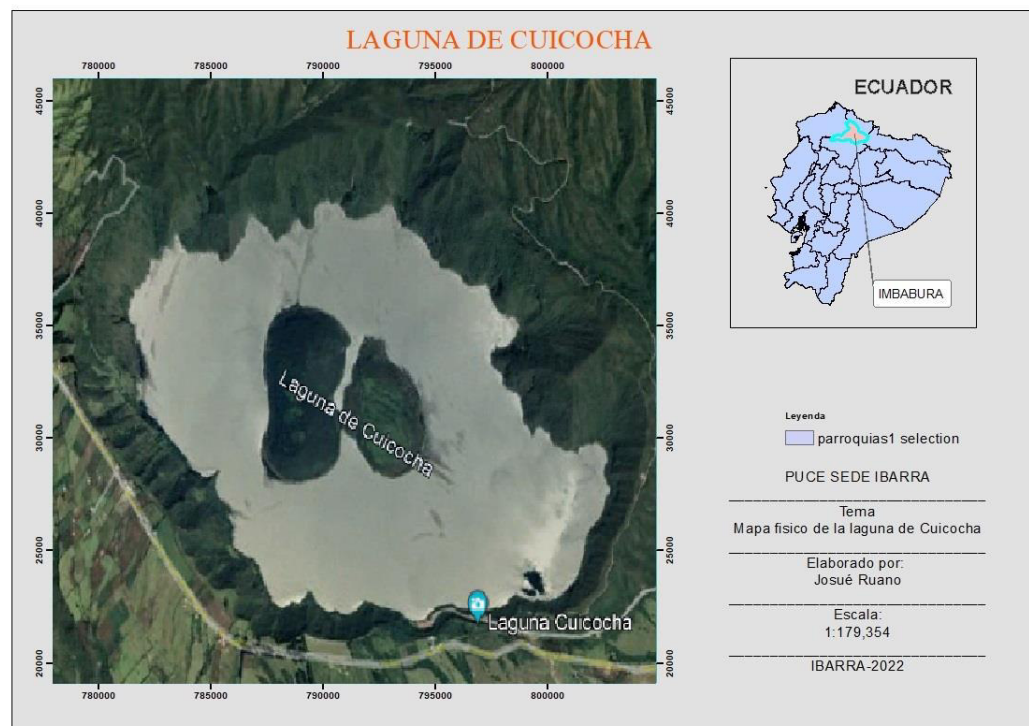
Las muestras vegetales de la especie *Pernettya prostrata* que fueron utilizadas para la obtención de extractos fueron sometidas a un proceso de limpieza manual para eliminar partes dañadas y material extraño, las partes aéreas se colocaron en cajas de papel y fueron sometidas a un proceso de deshidratación en una cámara de secado con flujo de aire durante 96 horas a una temperatura máxima de 50°C (Ávila, 2020).

4.2.2. Recolección e identificación taxonómica de especie vegetal

Las muestras de *Pernettya prostrata* fueron recolectadas en la laguna de Cuicocha perteneciente a la parroquia de Quiroga del cantón Cotacachi provincia de Imbabura.

Figura 2

Mapa de recolección de la especie vegetal



En la Figura 2 se muestra el mapa de recolección de la especie vegetal y las coordenadas de georreferenciación para la recolección de las muestras de la especie *Pernettya prostrata* para el estudio se detallan la Tabla 2.

Tabla 2

Área de colecta de la especie Pernettya prostrata

Nombre común	Familia	Especie	Altitud	Lugar de recolección	Coordenadas UTM
Mortño de perro, veneno de lobo, reventadera	Ericaceae	<i>Pernettya prostrata</i>	3250 msnm	Laguna de Cuicocha – Cotacachi – Imbabura	17N 795064 E32524

4.2.3. Obtención del extracto total

Una vez deshidratada la especie vegetal, se procedió a triturar los trozos grandes como frutos en un mortero pre esterilizado y posteriormente se colocaron en un molino de cuchillas Retsch modelo GM 200, las muestras fueron almacenadas en una bolsa de papel, se pesaron y rotularon, se utilizó un método de maceración dinámica para obtener un extracto total de la especie vegetal. Para llevar a cabo este método, se eligió el metanol como solvente orgánico debido a que es un solvente de baja selectividad que puede extraer más compuestos de la especie vegetal (Ávila, 2020)

Con el fin de obtener el extracto total, se pesó una muestra de 25 g de *Pernettya prostrata*, se colocó en un matraz, se agregó metanol en una proporción de 1:10 (peso/volumen), y se colocó la muestra en un agitador magnético a 800 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente (Ávila, 2020). Posteriormente se filtró al vacío con el objeto de separar el solvente

del sólido, se conservó el solvente, y el sólido se sometió a dos extracciones seguidas en las mismas condiciones que la primera, se mezclaron los tres sobrenadantes y se coloca en un rota vapor a 40°C hasta conseguir la evaporación total del solvente, se obtuvo un concentrado sólido que es el extracto total de interés, mismo que fue almacenado en un frasco ámbar hasta su uso (Ávila, 2020).

Para la determinación del rendimiento del extracto total se usó la ecuación 1, representada en porcentaje % con relación al peso de materia seca.

Ecuación 1

Porcentaje de rendimiento

$$\%rendimiento = \frac{\text{gramos de extracto seco}}{\text{gramos de la muestra}} \times 100$$

Figura 3

Obtención del extracto



4.2.4. Aislamiento del hongo *Neopestalotiopsis javaensis* aislado de plantas enfermas de aguacate. *Persea americana*

Para el aislamiento del hongo *Neopestalotiopsis javaensis* plantas enfermas de aguacate, *Persea americana* se siguió el procedimiento adaptado de Correa Juárez, (2019).

- Los frutos se lavaron con agua destilada esterilizada y se deja secar dentro de la cámara de flujo laminar.
- Se tomó lesiones de roña de no más de 3mm de diámetro.
- El tejido se desinfectó por 90 segundos en una solución de hipoclorito al 2% seguido por un lavado de 30 segundos con agua destilada esterilizada.
- Se sumergió el tejido en alcohol al 70% por 60 segundos y se lava con agua esterilizada por 30 segundos. Se seca con papel filtro esterilizado.
- Se sembró en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Adicionado con 100mg de sulfato de estreptomicina.
- Se incubó las placas a 25°C en condiciones de oscuridad y se revisaron a intervalos de 24h hasta observar crecimiento de micelio. Cuando el micelio sea evidente, se realiza transferencias de micelio a placas Petri conteniendo PDA para obtener cultivos puros. Se incuba a 25°C en condiciones de oscuridad durante 4 semanas.

Figura 4

Aislamiento de Neopestalotiopsis javaensis



4.2.5. Caracterización morfológica del hongo *Neopestalotiopsis javaensis* aislado de plantas enfermas de aguacate, *Persea americana*

Para la caracterización morfológica se usó las placas Petri de *Neopestalotiopsis javaensis* con el medio de cultivo PDA, para identificar el micelio de la especie en estudio se procedió a comparar tanto el color, aspecto y las características representativas de forma macroscópica, tanto en el anverso como al reverso del cultivo de *Neopestalotiopsis javaensis*.

Procedimiento que se realizó con la ayuda de una lupa y en el cual se identificaron las características mencionadas por (Agrios,2005).

Para la forma microscópica se colocó una gota de agua destilada en un portaobjeto y con la ayuda de un asa bacteriológica se hizo un raspado de micelio y se colocó en el portaobjeto y se procedió a identificar acérvulos, mismos que son similares a la investigación de (Darapanit et al., 2021)

4.2.6. Caracterización molecular del hongo *Neopestalotiopsis javaensis* aislado de plantas enfermas de aguacate, *Persea americana*

La extracción de ADN se realizó por método de PCR utilizando aproximadamente 100mg de muestra de micelio. Protocolo adaptado de (Andrés Bustamante et al., 2011.)

- Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de micro volúmenes y visualización en gel de agarosa.
- El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20ng/uL para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Se utilizaron los primers universales ITS1/ITS4 para la amplificación del ADN de los aislados fúngicos.
- Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER
- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos.

- Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

4.2.7. Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de extractos totales de una especie vegetal de la familia Ericaceae mediante ensayos de actividad biológica

Para determinar la actividad antifúngica del extracto total de la especie vegetal *Pernettya prostrata*, el ensayo se realizó siguiendo el método de Kirby -Bauer.

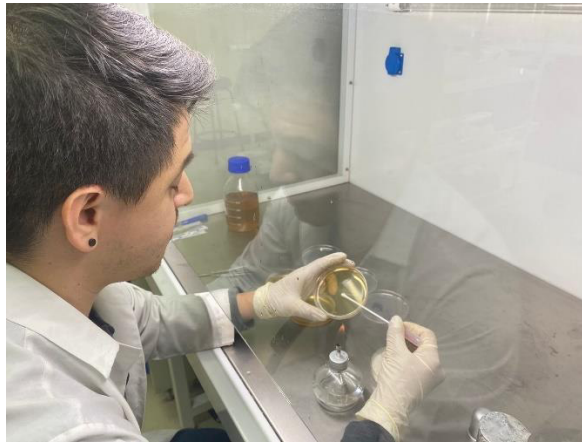
Para realizar el procedimiento se tomó micelio de *Neopestalotiopsis javaensis* con un hisopo esterilizado y se lo colocó sobre cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA) durante 7 días a una temperatura de 25°C, ya que el hongo en este tiempo habría cubierto la caja Petri en su totalidad por ser un hongo de rápido crecimiento.

Para tener una medición de las pruebas en las cajas Petri con papa dextrosa agar, se rotuló la caja Petri con la concentración del extracto a probar.

Una vez terminado con la siembra de *Neopestalotiopsis javaensis* se procede a colocar los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro previamente sumergidos en la concentración del extracto a evaluar, con la ayuda de un mechero y pinzas estériles ya que estas nos ayudan a que queden fijos en la caja Petri, finalmente se sellaron con Para film y se mantuvieron a temperatura de 25°C durante 7 días, cada día se tomó medidas del diámetro de Norte a Sur y de Este a Oeste para determinar si el extracto presentó efectos fungicidas o fungistáticos.

El ensayo se realizó bajo condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar, cinco repeticiones por cada concentración del extracto como se muestra en la Figura 5.

Figura 5 Evaluación de la actividad antifúngica in vitro



4.3. Diseño experimental

4.3.1. Unidad experimental

Se evaluó cuatro concentraciones diferentes del extracto de *Pernettya prostrata* por medio de difusión directa en agar, método de Kirby – Bauer. Y también se tuvo un control comercial y un testigo.

4.3.2. Tratamientos

En la investigación se utilizó el diseño completamente al azar. En donde se evaluó un extracto total de *Pernettya prostrata*, haciendo diluciones seriadas, dando un total de siete tratamientos, en donde, son 4 concentraciones, un testigo, producto comercial y el solvente orgánico. Las unidades experimentales son treinta, cinco repeticiones de cada concentración contra el organismo vivo que corresponden al hongo seleccionado.

Tabla 3*Tratamientos a evaluar*

Código	Tratamiento
T1	concentración 500 mg/ml
T2	concentración 250 mg/ml
T3	concentración 125 mg/ml
T4	concentración 62,5 mg/ml
T5	testigo
T6	control positivo
T7	solvente orgánico

Variables**Variable/s Independiente/s**

La concentración del extracto vegetal

Variable/s dependiente/s

Para ello se determinó al calcular el radio de la colonia de forma diaria, es decir cada 24h, hasta el día en que el micelio del tratamiento testigo cubra toda la superficie de la caja Petri. Las medidas del radio de la colonia dentro de las cajas Petri se las tomara en 4 direcciones (Norte, Sur, Este y Oeste) de las cuales se promediará los datos.

El crecimiento diario se calculó con la siguiente formula, (Benítez, et al., 2007).

Ecuación 2

Crecimiento diario

$$T_c = \frac{C_f - C_i}{T_f - T_i}$$

C_f: Crecimiento final en cm

C_i: Crecimiento inicial en cm

T_f: Tiempo final en donde termina el crecimiento

T_i: Tiempo inicial donde inicia el crecimiento

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención del extracto total

Se obtuvo un extracto metanólico de la especie vegetal *Pernettya prostrata* con un rendimiento de 31,48 expresado en porcentaje, partiendo de 25 gramos de materia vegetal seca, el porcentaje de rendimiento es similar al obtenido en el trabajo investigación “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos totales de especies de la familia Ericaceae y Rosaceae como alternativa ambiental al uso de plaguicidas” (Ávila, 2020). El rendimiento fue calculado aplicando la Ecuación 1, en la Tabla 4 se detallan los valores.

Tabla 4

Porcentaje del rendimiento de extracto total

Especie vegetal	Materia vegetal deshidratada (g)	Extracto seco (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
<i>Pernettya prostrata</i>	25	7,87	31,48

5.2. Caracterización molecular del hongo *Neopestalotiopsis javaensis*

5.2.1. Aislamiento del hongo *Neopestalotiopsis javaensis*

Los frutos enfermos de roña (Anexo 12) fueron obtenidos de la Parroquia San Vicente de Pusir, cantón Bolívar provincia del Carchi, haciendo uso del protocolo establecido y adaptado de Correa Juárez (2019)., protocolo detallado en el apartado 4.2.4., se logró el aislamiento del hongo *Neopestalotiopsis javaensis*.

Figura 6

Aislamiento de Neopestalotiopsis javaensis



En la Figura 6 se puede observar el crecimiento micelial al día quinto después de realizar la siembra en el medio de cultivo PDA, en el cual no se observa ningún tipo de contaminación, luego se realizó la siembra con transferencia de hifas para obtener cultivos puros en PDA para su caracterización molecular y posterior uso en la evaluación antifúngica *in vitro*.

Figura 7

Cultivo puro de Neopestalotiopsis javaensis



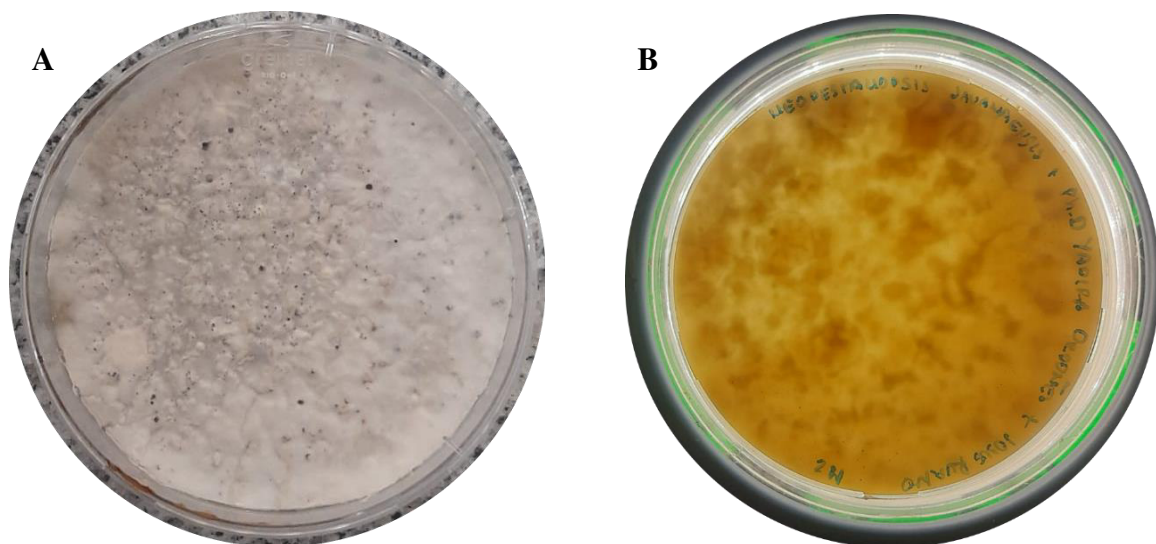
En la Figura 7 se puede observar el aislamiento puro del agente etiológico *Neopestalotiopsis javaensis*, al día séptimo desde la siembra, tiempo que le tomó cubrir el total de la caja Petri, en el cual se observa colonias de color blanquecino de aspecto algodonoso.

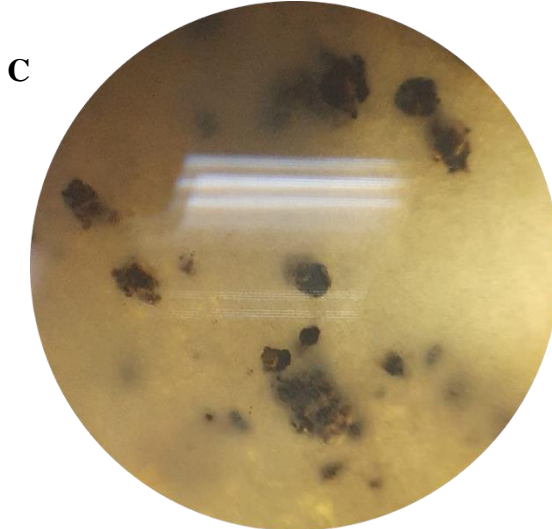
5.2.2. Caracterización morfológica

Después de mantener las placas con las colonias en incubación a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, en el medio de cultivo PDA y obtenidos los cultivos puros se procedió a realizar la caracterización morfológica de *Neopestalotiopsis javaensis*, para ello, el color de la colonia fue evaluado por la parte frontal y la parte posterior de la caja Petri.

Figura 8

Caracterización morfológica de *Neopestalotiopsis javaensis* A. Parte frontal de la colonia
B. Parte posterior de la colonia





En la Figura 8 A se puede observar la parte frontal de la caja Petri con el medio de cultivo PDA, en donde se distingue colores blanquecinos de textura algodonosa mientras que en la Figura 8 B se encuentra la vista posterior de la caja Petri en donde se puede observar colores amarillos pardos, en la Figura 8 C se puede observar los acérvulos de color café claro hasta tonalidades oscuras, caracterización morfológica realizada en la presente investigación concuerda con los resultados obtenidos por (Darapanit et al., 2021).

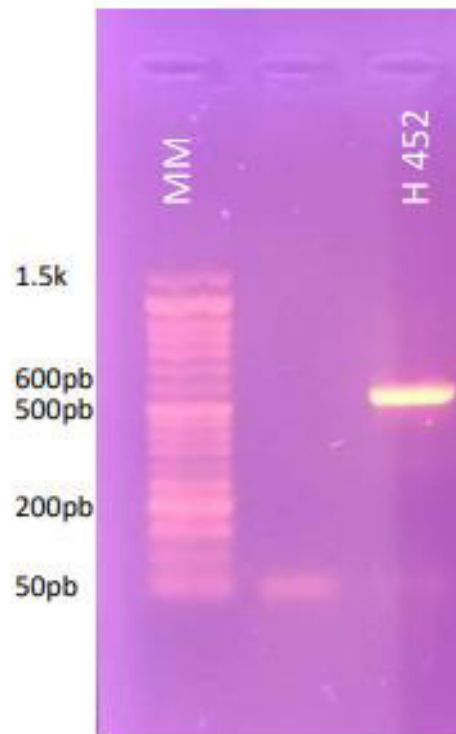
5.2.3. Caracterización molecular

Una vez aislado y caracterizado morfológicamente el hongo, se envió una muestra al laboratorio IDGen con la finalidad de realizar la caracterización molecular, según los resultados entregados por IDGen la caracterización se la realizó mediante reacción PCR en donde se visualizó fragmentos de aproximadamente 600pb en las muestras amplificadas haciendo uso de primers ITS1/ITS4 para hongos, obteniendo como resultado que el hongo aislado es *Neopestalotiopsis javaensis* con un 100% de identidad, la calidad de la muestra enviada fue de 99.6%.

En la Figura 9, se muestra el marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA marker, usado para la caracterización molecular, así como los fragmentos obtenidos en el gel de electroforesis, datos reportados por el laboratorio IDGen.

Figura 9

Fragmentos amplificados con primers ITS1/ITS4



Nota: Elaborado por Laboratorios IDGen, 2022

5.3. Determinación del crecimiento diario

La tasa de crecimiento por día se determinó según la fórmula descrita por Benítez, et al., (2007), descrita en la Ecuación 2

Tabla 5*Crecimiento diario de Neopestalotiopsis javaensis*

Especie en estudio	Día	Valores de crecimiento (cm/día)	Tasa Crecimiento diario (cm/día)
<i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	1	0,50	
	2	1,20	0,65
	3	1,90	0,64
	4	2,56	0,62
	5	3,13	0,61
	6	3,80	0,63
	7	4,40	0,6

En la Tabla 5 se muestran los días en los que se realizaron las mediciones del crecimiento diario de la especie en estudio, como se puede observar en la tasa de crecimiento por día en cm/día, el hongo *Neopestalotiopsis javaensis* presenta una tendencia a decrecer a medida que transcurren los días, presentando la menor tasa de crecimiento entre el día 6 y 7 de 0,6 cm/día, al día séptimo se logró la placa llena, Acosta (2022), reporta un crecimiento total del hongo al octavo día, lo que presenta similitud con la presente investigación.

5.4. Evaluación antifúngica *in vitro* del extracto total de *Pernettya prostrata*

Una vez sembrado el hongo *Neopestalotiopsis javaensis* en caja Petri, con medio de cultivo PDA y colocados los discos impregnados con el extracto total de *Pernettya prostrata* a las

concentraciones de 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml y 62,5 mg/ml, se había planificado tomar mediciones con un lapso de 24 horas durante 7 días a partir del séptimo día ya que los datos de crecimiento diario, nos muestra que el hongo necesita de éste tiempo para llenar la placa, sin embargo, en este tiempo el hongo cubrió la caja Petri en su totalidad, como se muestra en la Tabla 6, en la Figura 10 se puede observar el crecimiento del hongo al séptimo día, con lo que se puede concluir que ninguna de las concentraciones antes indicadas del extracto total de *Pernettya prostrata* mostraron inhibición de crecimiento del hongo *Neopestalotiopsis javaensis* con el método de Kirby-Bauer trabajado, a pesar de los resultados obtenidos, es importante tener presente el aporte de Aguilar, et al., (2013), quién considera un efecto fungistático por parte de los extractos se da al retrasar la adaptación y el crecimiento normal de los hongos, una respuesta de inhibición del crecimiento resulta ser tipo fungistático, aquellos extractos que provoquen la muerte del fitopatógeno se considera un efecto fungicida.

Figura 10

Evaluación antifúngica del extracto de Pernettya prostrata



Tabla 6*Datos de inhibición de crecimiento de Neopestalotiopsis javaensis*

Código	Concentración mg/ml	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
C1	500	0	0	0	0	0	0	0
C2	250	0	0	0	0	0	0	0
C3	125	0	0	0	0	0	0	0
C4	62,5	0	0	0	0	0	0	0

El control positivo usado en la presente investigación fue Oxiclورو de Cobre a una concentración de 8 mg/ml, se puede observar halos de inhibición al crecimiento de *Neopestalotiopsis javaensis*, la imagen reportada en la Figura 11 fue tomada al día decimo primero de la siembra, los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en el Manual de Cultivo de Aguacate elaborado por INIAP en 2014 (INIAP, 2014) en el que se reporta el uso de éste antifúngico para control de este agente etiológico, la concentración del control positivo usada en la presente investigación, se debe a que los agricultores utilizan éste para control de roña, información obtenida por levantamiento de información.

Figura 11

Neopestalotiopsis javaensis tratada con Oxicloruro de Cobre



Con los resultados antes obtenidos, se optó por realizar un ensayo con una cantidad menor del patógeno sin obtener resultados favorables respecto a la inhibición del crecimiento del hongo *Neopestalotiopsis javaensis*.

Con el afán de buscar otras alternativas de extractos vegetales que pudiesen presentar inhibición del crecimiento del hongo en estudio se decidió realizar pruebas con tres extractos totales de la familia Asteraceae como *Bidens andicola*, *Gazania splendens*, *Acmella ciliata*, ya que Miranda (2021), evaluó la actividad antimicrobiana de estos extractos frente al agente etiológico *Streptococcus sp*, en cuya investigación el extracto total de *Bidens andicola* reportó una inhibición de *Streptococcus sp* del 34,7%, mientras que *Gazania splendens* y *Acmella ciliata* presentaron una inhibición del 12,3% y 4,4% respectivamente, la concentración evaluada fue de 250 mg/ml; a una concentración de 500 mg/ml los resultados de inhibición son superiores, en este sentido, se evaluó los extractos totales de *Bidens andicola* y *Gazania splendens* pertenecientes a la familia Asteraceae a una concentración de 250 mg/ml frente al hongo *Neopestalotiopsis javaensis*, mismos que no mostraron inhibición del crecimiento del hongo antes mencionado, observándose que al séptimo día después de la

siembra el hongo llega a cubrir toda la caja Petri, las imágenes de los resultados se reportan en la Figura 12 y 13.

Figura 12

Evaluación antifúngica del extracto de Bidens andicola



Figura 13

Evaluación antifúngica de Gazania splendens



CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Mediante maceración dinámica usando metanol como solvente, se logró determinar un rendimiento del 31,48 % de la especie *Pernettya prostrata*, este rendimiento se debe al hecho de que el metanol es un solvente polar con el cual es posible extraer moléculas con mayor grado de polaridad.
- A partir de plantas enfermas de *Persea americana* M, se aisló el hongo *Neopestalotiopsis javaensis* mismo que fue caracterizado molecularmente.
- Ninguna de las cuatro concentraciones del extracto total de la especie *Pernettya prostrata* en el rango experimentado mostró inhibición del crecimiento del agente etiológico *Neopestalotiopsis javaensis*, por lo cual no se le considera funcional para realizar una caracterización posterior y obtener biomoléculas responsables de la actividad antifúngica.
- El extracto total de la especie *Pernettya prostrata* no muestra de inhibición frente al el agente etiológico *Neopestalotiopsis javaensis*, por lo cual no se lo considera funcional para realizar una caracterización posterior y obtener biomoléculas responsables de la actividad antifúngica.
- Ninguno de los cuatro extractos totales de especies vegetales obtenidas de *Pernettya prostrata*, *Acmella ciliata*, *Bidens andicola* y *Gazania splendens* mostraron actividad biológica contra el agente etiológico *Neopestalotiopsis javaensis*.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Evaluar nuevas especies vegetales, mismas que pueden presentar inhibición del crecimiento del hongo *Neopestalotiopsis javaensis*
- Estudiar nuevas especies vegetales, con el objeto de impulsar el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales, mismos que aporten la investigación y la población en general.
- En base a los resultados de otras investigaciones realizadas con el extracto total de la especie vegetal *Pernettya prostrata*, éste constituye una fuente de principios activos, por el cual se sugiere continuar con sus estudios en otros agentes patógenos ya que pueden aportar con descubrimientos de nuevos agentes antifúngicos de origen natural, mismos que aportarán en los tópicos agrícolas y sanitarios.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, M. (2020). “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos totales de especies de la familia Ericaceae y Rosaceae como alternativa ambiental al uso de plaguicidas” (Tesis de grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador)
- Aguilar-Alonso, P., Navarro-Cruz, A. R., Sánchez-Flores, A. B., Meneses-Sánchez, M. D. L. C., & Ávila-Sosa, R. (2013). Originarias del estado de puebla sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, Ciencia UAT.
- Agrios, G. (2005). Plant Pathology. University of Florida, Plant Pathology. Florida: Elsevier.
- Acosta González, U. (2022). Caracterización de aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. y efecto de fungicidas en pre y post-infección en el cultivo de fresa (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Chapingo).
- Barrientos, A; López, L. (2000). Historia y genética del aguacate. El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa, Distrito Federal, México, 19-31.
- Bernal, E; Díaz, D. 2005. Tecnología para el cultivo del aguacate. Bogotá, Colombia: CORPOICA
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, L. C., & Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. Nova, 5(8), 147-153.
- Belandria, O. (2011). Evaluación comparativa de la quimiotaxis y el antibiograma con el método “Biospeckle” sobre bacterias (tesis pregrado, Universidad de los Andes).
- Bhagariya, D. A., & Prajapati, V. P. (2019). First Report of *Pestalotiopsis clavispora* (GF Atk.) Steyaert Causing Crown Rot Disease on Strawberry in India. International Journal of Economic Plants, 6(3), 140-142.

- Campaña, J. (2019). Aislamiento, caracterización morfológica y molecular del agente fúngico *Neopestalotiopsis saprophytica* de la frutilla (*Fragaria* sp.) en Pichincha-Ecuador. (Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito)
- Coello, V. (2015). “Efecto de la adición de Ácido Ascórbico y Butil Hidroxitolueno (BHT) en la oxidación enzimática y rancidez oxidativa de pasta de aguacate (*Persea americana*) variedades Hass y Bacon”. (Tesis de grado, Universidad técnica de Ambato)
- Correa Juárez, M. (2019). Identificación molecular y caracterización morfológica de *Sphaceloma perseae* en la franja aguacatera de Michoacán. (Tesis de post-grado, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo)
- Darapanit, A., Boonyuen, N., Leesutthiphonchai, W., Nuankaew, S., & Piasai, O. (2021). Identification, pathogenicity and effects of plant extracts on *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis* causing fruit diseases. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02113-5>
- De Marcano, A., Vargas, N., & Pire, A. (2005). Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22(4), 315-324.
- Everett, K. R., Rees-George, J., Pushparajah, I. P., Manning, M. A., & Fullerton, R. A. (2011). Molecular identification of *Sphaceloma perseae* (Avocado scab) and its absence in New Zealand. *Journal of Phytopathology*, 159(2), 106-113.
- Flores, J. J. Á., Cevallos, H. V., Montealegre, V. J. G., & Romero, H. C. (2021). Análisis de la producción de aguacate en el Ecuador y su exportación a mercados internacionales en el periodo 2008 al 2018. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 4(S1), 164-172.
- Forbes Staff. (2022). Reanuda Estados Unidos importaciones de aguacate mexicano. *Forbes Mexico*.

- González, A. (2004). Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas Amazónicas. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Guerra, A. (2005). Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos, así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP. (2014). Aguacate - Iniap tecnología.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INIAP (2020) Cultivo de aguacate variedad Hass tiene demanda internacional. Dirección Nacional de Comunicación Coordinación de Comunicación INIAP.
- Jeewon, R., Liew, E. C., & Hyde, K. D. (2002). Phylogenetic relationships of Pestalotiopsis and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. Molecular phylogenetics and evolution, 25(3), 378- 392.
- Maharachchikumbura, S. S., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K.D. (2011). Pestalotiopsis—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Diversity, 50(1), 167-187.
- Maharachchikumbura, S. S., Guo, L.-D., Cai, L., Chukeatirote, E., Wu, W. P., Sun, X., Hyde, K. D. (2012). A multi-locus backbone tree for Pestalotiopsis, with a polyphasic characterization of 14 new species. Fungal Diversity, 56(1), 95-129.
- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). Pestalotiopsis revisited. Studies in Mycology, 79, 121-186.
- Martínez-Hernández, M. D. S., Morales-García, J. L., Pedraza-Santos, M. E., & Morales-Montelongo, K. L. (2017). Control químico in vitro de los patógenos relacionados con el síndrome de roña en aguacate en diferentes zonas de Michoacán, México. In Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate, Ciudad Guzmán, Jalisco, México (pp. 193-196).

- Miranda, E. (2021). “Actividad antibacteriana in vitro de los extractos totales de tres especies de la familia Asteraceae sobre el agente etiológico, *Streptococcus* sp, causal de la linfadenitis en *Cavia porcellus*” (Tesis de grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador)
- Mejía, E. (2011). Aguacate (*Persea americana* Miller). Universidad de Caldas. Bayer S.A. Colombia.5-38.
- Molano, P. J. T. (2007). Enfermedades del aguacate. *Revista politécnica*, 3(4), 51-70. Plantas Amazónicas. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Rincón Aguilar, C. M., Patiño Ladino, O. J y Plazas González, E. A. (2014). Estudio químico preliminar y evaluación de la actividad antioxidante, antialimentaria y tóxica, de la especie *Pernettya prostrata* (Ericaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 138-150.
- Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Erler, R., Navarrete, H. (2019) . *Pernettya prostrata* En: Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi. EDITORIAL
- Sánchez, F. (2009). II Congreso Nacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia-Palmira. Extracción de Aceites Esenciales.
- Selles, E., Sánchez, J., Solan , C., Suiñe, J., & Tico, J. (1992). Tratado de Farmacia Galénica. Madrid.
- Vega, N. (2013). Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de aceite de aguacate en la ciudad de Guayaquil. (Tesis de grado, Universidad católica de Santiago de Guayaquil)
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-66.
- Velastegui, J. (2005). Alternativas ecológicas para el manejo integrado fitosanitario. Editorial Agroexpress Editorial Quito

Viera, A., Sotomayor, A., & Viera, W. (2016). Potencial del cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill) en Ecuador como alternativa de comercialización en el mercado local e internacional.

ANEXOS

Anexo 1

Recolección de la especie Pernettya prostrata



Anexo 2

Limpieza de la especie en estudio



Anexo 3

Selección de ejemplares para el montaje



Anexo 4

Prensado de los ejemplares del montaje para su secado



Anexo 5

Triturado de la especie en estudio para su secado



Anexo 6

Muestras listas para la estufa



Anexo 7

Secado de muestras en la estufa



Anexo 8

Peso total de la muestra seca



Anexo 9

Montaje de las muestras



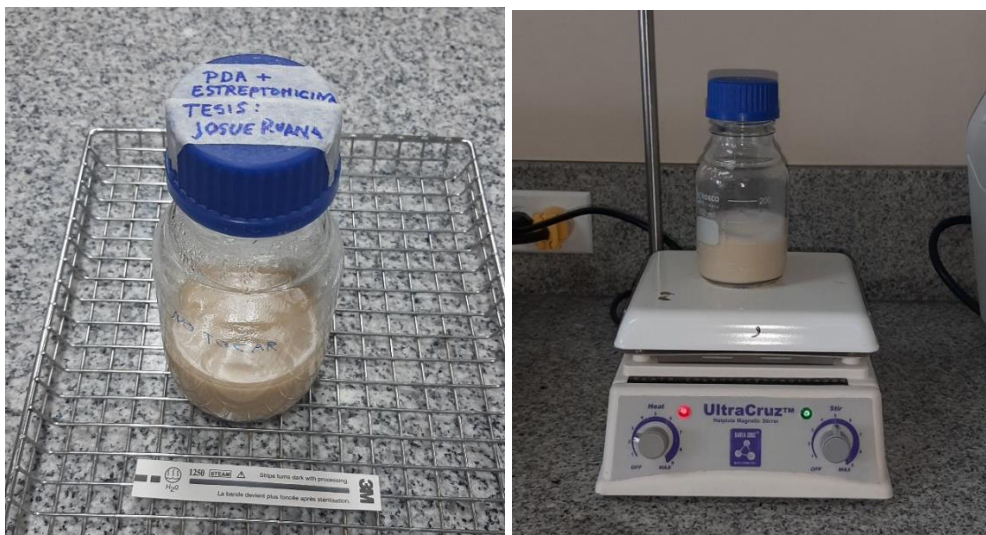
Anexo 10

Montajes que reposan en el herbario de la PUCE-SI



Anexo 11

Elaboración de medio de cultivo PDA + Estreptomicina



Anexo 12

Selección de frutos con lesiones de roña



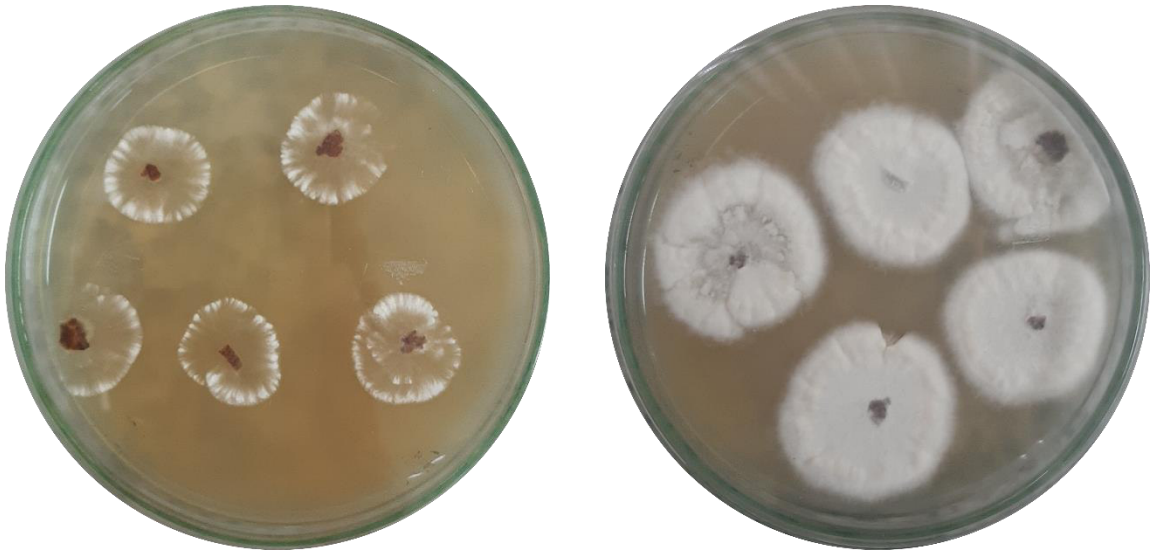
Anexo 13

Siembra de lesiones de roña en el medio de cultivo PDA +Estreptomicina



Anexo 14

Crecimiento micelial en el medio de cultivo PDA +Estreptomicina



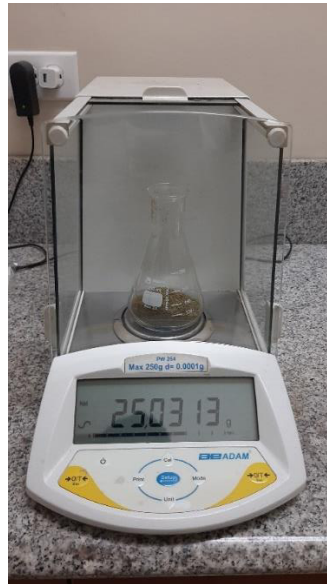
Anexo 15

Cultivos puros de Neopestalotiopsis javaensis



Anexo 16

*Pesaje de muestras trituradas de *Pernettya prostrata**



Anexo 17

*Muestras maceradas de *Pernettya prostrata**



Anexo 18

Filtrado de la muestra de Pernettya prostrata



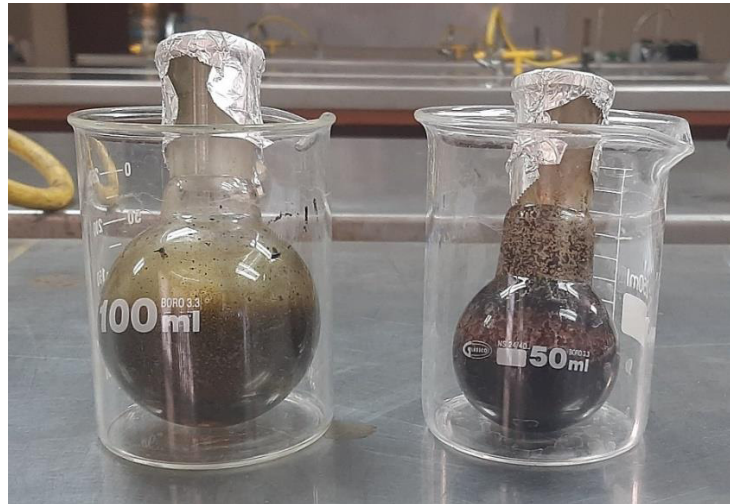
Anexo 19

Muestra en el rotavapor para evaporar el solvente metanol



Anexo 20

Extracto total obtenido



Anexo 21

Elaboración de la concentración máxima del extracto



Anexo 22

Uso del ultrasonido para mejor recuperación del extracto



Anexo 23

*Dilución del extracto total de *Pernettya prostrata* en las diferentes concentraciones*



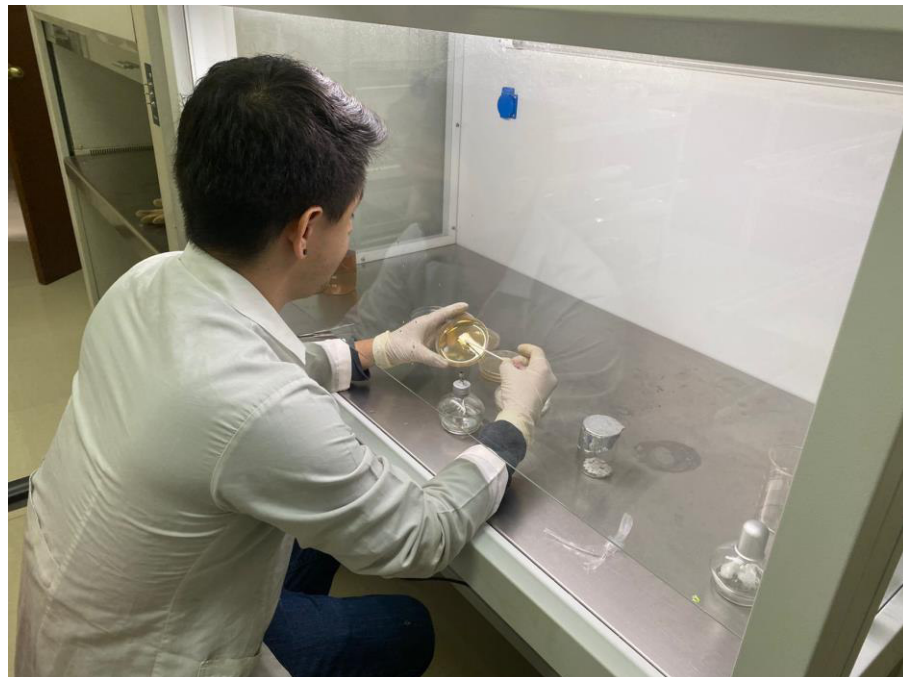
Anexo 24

Concentraciones de Pernettya prostrata



Anexo 25

Siembra del patógeno con la metodología de Kirby-Bauer



Anexo 26

Muestras para la evaluación antifúngica in vitro



Anexo 27

Muestras sin actividad antifúngica



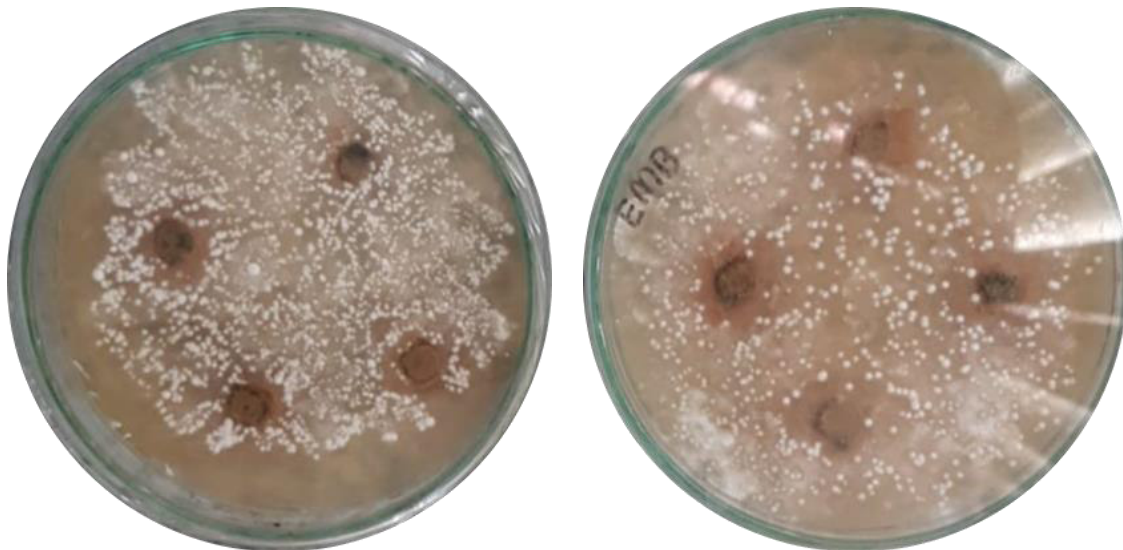
Anexo 28

Control Positivo



Anexo 29

Muestras con menor cantidad del patógeno



Anexo 30

Identificación molecular



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Aislamiento e Identificación molecular de microorganismos–Josué Ruano
Informe No.: A-316
Técnico Responsable: Francisco Garrido, Ing.
Fecha: 18/08/2022

Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	NºAccesión
H452	Sin etiqueta	521	99.6	<i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	ITS	100	MH855207.1

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen

Anexo 31

Secuencia molecular

