



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos totales de las especies vegetales Lengua de vaca (*Rumex obtusifolius*) y de Higuierilla (*Ricinus communis*) para el control de antracnosis (*Colletotrichum spp*) aislado del cultivo de tomate de árbol”

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO AGROPECUARIO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN: Gestión sostenible y aprovechamiento de los recursos naturales

SUBLINEA:

AUTOR: BRAYAN FERNANDO LEON ROSERO

ASESOR: Dra. YADIRA FERNANDA ORDOÑEZ VIVANCO

Ibarra, 14 agosto de 2024


Ibarra, 14 agosto de 2024

PhD. Yadira Ordóñez Vivanco

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 Ordóñez Vivanco

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).....

Ph.D. Yadira Fernanda Ordóñez

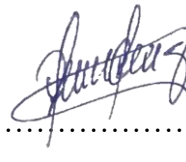
C.C.: 1103764864



(f).....

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.:1002658399



(f).....

MSc. Edwin Fernando Del Pozo Villacis

C.C.:1001756566

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Brayan Fernando León Rosero, 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, 14 agosto de 2024

f): 

BRAYAN FERNANDO LEON ROSERO

C.C.: 0401998166

AUTORÍA

Yo, BRAYAN FERNANDO LEON ROSERO, portador de la cédula de ciudadanía N° 0401998166, 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.

A handwritten signature in blue ink that reads "Brayan León". The signature is written in a cursive style.

f):

BRAYAN FERNANDO LEON ROSERO

C.C.: 0401998166

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo. BRAYAN FERNANDO LEON ROSERO, con C.C.: 0401998166, autor del trabajo de grado intitulado: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE LENGUA DE VACA (*Rumex obtusifolius*) Y DE HIGUERILLA (*Ricinus communis*) PARA EL CONTROL DE ANTRACNOSIS (*Colletotrichum spp*) AISLADO DEL CULTIVO DE TOMATE” previo a la obtención del título profesional de Ingeniero Agropecuario, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 14 agosto de 2024



f):

BRAYAN FERNANDO LEON ROSERO

C.C.: 0401998166

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 DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE LENGUA DE VACA (*Rumex obtusifolius*) Y DE HIGUERILLA (*Ricinus communis*) PARA EL CONTROL DE ANTRACNOSIS (*Colletotrichum spp*) AISLADO DEL CULTIVO DE TOMATE” , 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 01 de julio de 2024.

Para constancia firma:



f):

Brayan Fernando León Rosero
Estudiante que ejecuta el trabajo de Titulación
C.C/ Pasaporte: 0401998166
Carrera: Ingeniería Agropecuaria

Ibarra, 02 de julio de 2024

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación al incondicional apoyo de mi familia, quienes han sido mi roca inquebrantable en cada paso de este viaje académico. Su paciencia y aliento han sido la fuerza para culminar este proceso. Agradezco profundamente a Dios por su constante presencia, por ser mi fortaleza en tiempos de incertidumbre y por brindarme la sabiduría necesaria para superar los obstáculos que se presentaron en el camino. A mis padres, les debo todo; su sacrificio y apoyo incondicional han sido la base de este logro. A Dios, le doy gracias por cada desafío superado y por cada momento de fortaleza. Sin su guía, nada de esto sería posible. Este logro no solo es mío, sino de aquellos que estuvieron para mí y me sostuvieron con su amor y apoyo. Con sincera gratitud

Bryan.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis profesores que han impartido sus conocimientos en cada etapa de la Universidad y sobre todo a ser perseverante en lo que uno quiere ser en un futuro, , a mi familia por ser un apoyo incondicional en cada proceso de mi vida y con la motivación y ejemplo constante de seguir luchando ante cualquier adversidad, a los docentes que brindaron todo el apoyo y el tiempo dedicado a mí y poder lograr el proyecto de la mejor manera.

Bryan

ÍNDICE

CAPÍTULO I	30
INTRODUCCIÓN	30
CAPÍTULO II.....	32
OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo general	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
2.3. Hipótesis.....	32
CAPITULO III.....	33
3. ESTADO DEL ARTE	33
3.1. Morfología.....	34
3.2. Extractos vegetales.....	35
Especies vegetales en estudio.....	36
3.3. Lengua de vaca (<i>Rumex obtusifolius</i>).....	36
3.4. Higuera “ <i>Ricinus communis</i> ”	39
3.5. Impacto socioeconómico.....	42
3.6. Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>).....	42
CAPÍTULO IV.....	44
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
4.1. Materiales	44
4.2. METODOS.....	45
4.3. FASE DE LABORATORIO	47

4.4. Aislamiento del patógeno <i>Colletotrichum spp</i> aislado del fruto de tomate de árbol “ <i>Solanum betaceum</i> ”	48
4.5. Caracterización morfológica del hongo <i>Colletotrichum spp</i> aislado de frutos enfermos de tomate de árbol “ <i>Solanum betaceum</i> ”	49
4.6. Caracterización molecular del hongo <i>Colletotrichum spp</i> aislado de frutos enfermos de tomate de árbol “ <i>Solanum betaceum</i> ”.	50
CAPÍTULO V	56
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
5.1. Determinación del rendimiento de las especies vegetales <i>Rumex obtusifolius</i> y <i>Ricinus communis</i>	56
5.2. Caracterización molecular del patógeno <i>Colletotrichum spp.</i> aislado de tomate de árbol. 57	
5.3. Halo de inhibición de actividad fúngica de <i>Colletotrichum tamarilloi</i>	59
5.3.1. Análisis de normalidad y homogeneidad de los datos para el halo de inhibición del hongo patógeno <i>Colletotrichum tamarilloi</i> con extracto de la especie vegetal Lengua de vaca e Higuera.....	59
5.4. Análisis de varianza del crecimiento de halo de inhibición del hongo patógeno <i>C. tamarilloi</i> con el extracto de la especie <i>Rumex obtusifolius</i>	63
CAPÍTULO VI.....	72
CONCLUSIONES	72
CAPÍTULO VII	73
RECOMENDACIONES	73

CAPÍTULO VIII.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Caracterización morfológica del hongo <i>Colletotrichum spp.</i>	34
Tabla 2 Sitio de recolección georreferenciado de las especies vegetales <i>Ricinus communis</i> y <i>Rumex obtusifolius</i>	46
Tabla 3 Protocolo de aislamiento del hongo <i>Colletotrichum spp.</i>	48
Tabla 4 Preparación de muestra para microscopía óptica.....	49
Tabla 5 Fuentes de análisis de varianza ANOVA con Grados Libertad.....	52
Tabla 6 Tratamientos evaluados en la inhibición de Antracnosis por las especies vegetales de Higuera y Lengua de vaca.	53
Tabla 7 Resultados en porcentaje de rendimiento del extracto total de las especies vegetales <i>Rumex obtusifolius</i> y <i>Ricinus communis</i>	57
Tabla 8 Resumen de resultados de caracterización molecular de Antracnosis aislado de tomate de árbol	58
Tabla 9 Resultados de la prueba de normalidad y homogeneidad, test de Shapiro – Wilk y Levene en el día 4 de crecimiento del halo de inhibición el hongo <i>Colletotrichum tamarilloi</i> con el extracto de la especie vegetal <i>Ricinus communis</i>	59
Tabla 10 Resultados de la prueba de normalidad y homogeneidad, test de Shapiro – Wilk y Levene en los 4 días de crecimiento del halo de inhibición el hongo <i>Colletotrichum tamarilloi</i> con el extracto de la especie vegetal <i>Rumex obtusifolius</i>	61
Tabla 11 Análisis de fuentes de variación de la variable de crecimiento de halo de inhibición del hongo <i>Colletotrichum spp.</i> en el días 4 de la especie vegetal <i>Ricinus communis</i>	62
Tabla 12 Análisis de fuentes de variación de la variable de crecimiento de halo de inhibición del hongo patógeno <i>Colletotrichum spp.</i> en los días 4 de la especie vegetal <i>Rumex obtusifolius</i>	65
Tabla 13 Promedio de diámetro de halo de inhibición extracto vegetal <i>Rumex obtusifolius</i>	66
Tabla 14 Promedio de diámetro de halo de inhibición de extracto <i>Ricinus communis</i>	67
Tabla 15 Porcentaje del halo de inhibición de las especies vegetales <i>Ricinus communis</i> y <i>Rumex obtusifolius</i>	68
Tabla 16 Valores de crecimiento del hongo <i>Colletotrichum tamarilloi</i>	70

RESUMEN

Las plantas agrícolas enfrentan importantes desafíos debido a la presencia de microorganismos patógenos, lo que afecta significativamente su productividad. En el cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), la antracnosis, causada por *Colletotrichum tamarilloi*, se presenta como una de las enfermedades más prevalentes y destructivas. Este estudio evaluó la actividad antifúngica de extractos totales de dos especies vegetales, Lengua de vaca (*Rumex obtusifolius*) e Higuierilla (*Ricinus communis*), como alternativas sostenibles a los fungicidas sintéticos. Se emplearon cinco concentraciones seriadas de extractos junto con un tratamiento comercial (1 µL/ml de agua), un solvente orgánico (metanol) y un testigo absoluto.

Los resultados indicaron que *Ricinus communis* mostró una inhibición efectiva del crecimiento de *Colletotrichum tamarilloi*, con porcentajes de inhibición de T1: 91.2 %, T2: 88.8 %, T3: 83 %, T4: 63.4 %, T5: 29.7 %, T6: 100 %, T7: 29.9 %, y T8: 0 %, evidenciando una clara relación dosis-respuesta. Por otro lado, *Rumex obtusifolius* presentó porcentajes de inhibición de T1: 50.8 %, T2: 48.3 %, T3: 46.7 %, T4: 44.9 %, T5: 44.1 %, T6: 100 %, T7: 20 %, y T8: 0 %. Aunque los valores obtenidos con *Rumex obtusifolius* fueron ligeramente inferiores a los de *Ricinus communis*, ambos extractos demostraron una capacidad inhibitoria significativa, especialmente en las concentraciones más altas. Estos hallazgos sugieren que, aunque los extractos naturales evaluados presentan un potencial considerable como agentes antifúngicos, es necesario optimizar sus formulaciones para igualar la efectividad de los fungicidas comerciales y convertirse en alternativas viables en el manejo de enfermedades fúngicas en el tomate de árbol.

Palabras clave: Antracnosis, *Colletotrichum tamarilloi*, *Rumex obtusifolius*, *Ricinus communis*, extractos vegetales.

ABSTRACT

Plants in agriculture face significant challenges due to the presence of pathogenic microorganisms, which greatly affect their productivity. In tree tomato (*Solanum betaceum*) cultivation, anthracnose, caused by *Colletotrichum tamarilloi*, is one of the most prevalent and destructive diseases. This study evaluated the antifungal activity of total extracts from two plant species, Broadleaf Dock (*Rumex obtusifolius*) and Castor Bean (*Ricinus communis*), as sustainable alternatives to synthetic fungicides. Five serial concentrations of the extracts were tested, along with a commercial treatment (2 $\mu\text{L}/\text{ml}$), an organic solvent (methanol), and an absolute control.

The results indicated that *Ricinus communis* effectively inhibited the growth of *Colletotrichum tamarilloi*, with inhibition percentages of T1: 91.2%, T2: 88.8%, T3: 83%, T4: 63.4%, T5: 29.7%, T6: 100%, T7: 29.9%, and T8: 0%, showing a clear dose-response relationship. On the other hand, *Rumex obtusifolius* showed inhibition percentages of T1: 50.8%, T2: 48.3%, T3: 46.7%, T4: 44.9%, T5: 44.1%, T6: 100%, T7: 20%, and T8: 0%. Although the values obtained with *Rumex obtusifolius* were slightly lower than those of *Ricinus communis*, both extracts demonstrated significant inhibitory capacity, especially at higher concentrations. These findings suggest that, while the natural extracts evaluated have considerable potential as antifungal agents, further optimization of their formulations is necessary to match the effectiveness of commercial fungicides and become viable alternatives for managing fungal diseases in tree tomato cultivation.

Keywords: Anthracnose, *Colletotrichum tamarilloi*, *Rumex obtusifolius*, *Ricinus communis*, plant extracts.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La antracnosis del tomate, ocasionada por diversos patógenos pertenecientes al género *Colletotrichum*, tales como *Colletotrichum coccodes* y *Colletotrichum gloeosporioides*, es una enfermedad fúngica que afecta significativamente la producción de tomate a nivel global.

Esta patología compromete la calidad y la cantidad de los cultivos, influyendo negativamente en la rentabilidad económica de los productores agrícolas. La amplia distribución geográfica de estos patógenos, así como su capacidad para infectar una variedad de hospederos, hacen que la antracnosis del tomate represente una amenaza considerable para la seguridad alimentaria y la estabilidad económica en el sector agrícola (Nieto et al., 2019).

La respuesta convencional ante la antracnosis ha sido el uso intensivo de fungicidas químicos. Sin embargo, esta práctica conlleva una serie de problemas, como el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos, la contaminación ambiental y la acumulación de residuos de pesticidas en los productos agrícolas. Ante estos desafíos, existe una creciente necesidad de desarrollar estrategias alternativas y sostenibles para el manejo de la enfermedad, con el objetivo de reducir la dependencia de los agroquímicos y mitigar sus impactos negativos en la salud humana y el medio ambiente (Niño y Angela, 2018).

En este contexto, los extractos vegetales han surgido como una alternativa prometedora para el control de la antracnosis del tomate. Estos extractos, ricos en compuestos bioactivos, presentan propiedades antifúngicas que pueden contribuir eficazmente al manejo de la enfermedad. Compuestos como terpenoides, ácidos fenólicos, saponinas, flavonoides, alcaloides y taninos han mostrado actividad inhibidora contra los hongos fitopatógenos, actuando mediante mecanismos como la inhibición de la síntesis de ergosterol y la ruptura de membranas celulares (Villacis et al., 2017).

El interés en los extractos vegetales como alternativa al control de enfermedades en los cultivos se justifica no solo por su eficacia en el control de la antracnosis, sino también por su papel en la promoción de prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. Estos

extractos ofrecen una solución que no solo aborda el problema fitopatológico, sino que también tiene en cuenta la conservación de los ecosistemas agrícolas y la salud humana. Su aplicación puede fortalecer la resistencia de las plantas, mejorar la calidad de los productos agrícolas y reducir el impacto negativo de la agricultura en el entorno (Pinto et al., 2017).

Los extractos vegetales usados como herramientas para el control de enfermedades en los cultivos. Estudios previos han demostrado la eficacia de estos extractos contra una variedad de patógenos, incluidos los responsables de la antracnosis del tomate. Esta investigación representa un avance significativo en la búsqueda de soluciones efectivas y sostenibles para los desafíos fitopatológicos en la agricultura contemporánea (Aguilar et al., 2017).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de dos extractos vegetales sobre el agente causal de la Antracnosis (*Colletotrichum spp.*).

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el rendimiento de los extractos totales obtenidos de las especies de *Rumex obtusifolius* y *Ricinus communis*.
- Caracterizar morfológica y molecularmente el patógeno causal de Antracnosis *Colletotrichum spp.*
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos vegetales, mediante pruebas in vitro contra cepas de *Colletotrichum spp.* aisladas de plantas de tomate de árbol afectadas por antracnosis.

2.3. Hipótesis

Hipótesis alternativa (H1): El extracto total de las especies vegetales permiten reducir o inhibir la actividad fúngica de *Colletotrichum spp.*

Hipótesis nula (H0): El extracto total de las especies vegetales no permiten reducir o inhibir la actividad fúngica de *Colletotrichum spp.*

CAPITULO III

3. ESTADO DEL ARTE

La antracnosis del tomate, ocasionada principalmente por especies de hongos del género *Colletotrichum*, es una enfermedad fúngica ampliamente estudiada debido a su impacto significativo en la producción de tomate a nivel mundial. Diversos estudios han abordado aspectos clave relacionados con la etiología, epidemiología, manejo y control de esta enfermedad (SIPSA, 2014).

En términos de la etiología de la antracnosis del tomate, investigaciones previas han identificado una variedad de especies de *Colletotrichum* que pueden causar la enfermedad, incluyendo *Colletotrichum coccodes* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Estudios taxonómicos y moleculares han contribuido a la caracterización y clasificación precisa de estos patógenos, proporcionando información valiosa para la comprensión de su diversidad genética y su distribución geográfica (Castro et al., 2019).

La epidemiología de la antracnosis del tomate ha sido objeto de numerosas investigaciones que han analizado factores como la dispersión de esporas, la sobrevivencia del patógeno en el suelo y residuos de cultivos, así como las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad. Estudios sobre la dinámica de la infección y la propagación de la enfermedad han permitido identificar estrategias de manejo preventivo y predictivo para reducir su impacto en los cultivos (SIPSA, 2014).

En cuanto al manejo y control de la antracnosis del tomate, se han explorado diversas estrategias que van desde prácticas culturales y medidas de manejo integrado de plagas, el uso de fungicidas químicos y bio fungicidas. Investigaciones sobre la eficacia de diferentes métodos de control han proporcionado información crucial para el desarrollo de programas de manejo de enfermedades adaptados a las condiciones locales y las necesidades de los productores (SIPSA, 2014).

Además de los enfoques convencionales de control, como el uso de fungicidas químicos, se ha observado un creciente interés en el uso de extractos vegetales y compuestos naturales como alternativas sostenibles para el manejo de la antracnosis del tomate. Estudios recientes han investigado la actividad antifúngica de una amplia variedad de extractos vegetales y compuestos bioactivos, evaluando su eficacia en la inhibición del crecimiento y desarrollo de los patógenos causantes de la enfermedad (Niño y Angela, 2018).

3.1. Morfología

Los hongos del género *Colletotrichum* presentan hifas hialinas, conidios fusiformes, y estructuras fructíferas llamadas acérvulos. Estas características permiten su clasificación y estudio, siendo fundamentales para entender su capacidad de infección en diversas plantas (Pérez et al., 2017).

En la tabla 1 se observa las características morfológicas del hongo *Colletotrichum spp*

Tabla 1 Caracterización morfológica del hongo *Colletotrichum spp*.

Características Morfológicas	Descripción
Micelio	Hifas septadas, hialinas en sus fases jóvenes y que se vuelven marrones a medida que envejecen. Las hifas pueden ser rectas o ligeramente onduladas (Pérez et al., 2017).
Conidios	Conidios de forma cilíndrica a fusiforme, hialinos (transparentes) y unicelulares. Suelen medir entre 10-20 μm de largo y 3-5 μm de ancho (Pérez et al., 2017).
Acérvulos	Estructuras fructíferas negras o marrón oscuro que emergen del tejido vegetal infectado. Están cubiertos por una masa mucilaginosa donde se encuentran los conidios (Pérez et al., 2017).
Setas	Estructuras largas, oscuras y rígidas que emergen de los acérvulos. Generalmente miden entre 50-100 μm de largo (Pérez et al., 2017).
Esclerocios	Estructuras de resistencia formadas por la agrupación de hifas endurecidas. Son de color oscuro y pueden medir entre 0.5-3 mm (Pérez et al., 2017).
Crecimiento en medios de cultivo	En medios de cultivo como Sabouraud Dextrose Agar (SDA), el crecimiento puede ser rápido, produciendo una colonia algodonosa de color blanco al inicio y que se torna gris o marrón con el tiempo (Pérez et al., 2017).

3.2. Extractos vegetales

Los extractos vegetales son soluciones concentradas obtenidas a partir de diferentes partes de plantas que contienen compuestos bioactivos. Estos compuestos poseen diversas propiedades, entre ellas antifúngicas, lo que los hace potencialmente efectivos para el control de hongos fitopatógenos en diferentes cultivos. La extracción de estos compuestos permite realizar pruebas para determinar su eficacia contra los patógenos específicos que afectan a las plantas (Avila, 2016).

Siendo poseedores de compuestos bioactivos, interfieren en procesos biológicos clave del hongo fitopatógeno, como la integridad de la membrana celular y la actividad enzimática, induciendo su muerte o inhibición. Además, estimulan respuestas de defensa en la planta, fortaleciendo su resistencia a las infecciones fúngicas. Esta dualidad los convierte en una opción prometedora para el control de enfermedades en la agricultura (Avila, 2016).

La capacidad de interferencia con procesos vitales en los hongos fitopatógenos, y afectando principalmente a su desarrollo. Al poseer diferentes compuestos o bioactivos confiere a los extractos una estrategia de manejo de diferentes enfermedades, poseyendo así diferentes características ya sea como antifúngicos, antibacterianos (Castro et al., 2019).

3.2.1. Propiedades de los extractos vegetales

La exploración del potencial antifúngico de los extractos vegetales es un área de interés dentro de las investigaciones agrícolas, especialmente en ambientes controlados como de laboratorio estos extractos han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos, ofreciendo una alternativa prometedora para el manejo de enfermedades que afectan los cultivos. brindando un control eficiente en la planta (Ramos y otros, 2020).

Dentro del amplio espectro de bioactivos presentes en las plantas, se destacan los flavonoides, los alcaloides y los terpenoides como constituyentes de interés en la investigación farmacológica y agronómica (Srivastava & Srivastava, 2020).

Los extractos pueden poseer los siguientes bioactivos:

a. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos, como los flavonoides y los taninos, poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Su mecanismo de acción incluye la alteración de la permeabilidad de la membrana celular del hongo y la inhibición de enzimas clave. Se ha determinado una eficacia

significativa contra una gran variedad de hongos fitopatógenos en estudios de laboratorio (Celis et al. 2009).

Estas características, esenciales para la protección de los cultivos frente a plagas y enfermedades, subrayan el papel fundamental de los extractos vegetales en el fortalecimiento de la resistencia y la promoción de la salud de las plantas en general (Suarez, 2019).

b. Compuestos Alcaloides

Los alcaloides son compuestos nitrogenados los cuales actúan principalmente sobre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Esta interferencia provoca una disrupción en la replicación del ADN y en la producción de proteínas, lo que conduce a la acumulación de proteínas defectuosas dentro de la célula fúngica y, eventualmente, a la muerte celular (SIPSA, 2014).

c. Compuestos Terpenoides

Son metabolitos secundarios producidos por el metabolismo de la planta. Posee la capacidad de interferir en la estructura y función de las membranas celulares del patógeno. Debilitan la estructura celular y aumenta su permeabilidad disminuyendo así el transporte celular, provocando eventualmente la disminución en el desarrollo y por último la muerte (Niño et al., 2017).

Especies vegetales en estudio

3.3. Lengua de vaca (*Rumex obtusifolius*)

La lengua de vaca es una planta perenne de naturaleza silvestre que se encuentra en diversos lugares del mundo. Es una planta adaptable a distintos climas y suelos, lo que facilita su cultivo, además de su resistencia y fácil crecimiento, Se caracteriza por sus grandes hojas verdes de borde ondulado, sus pequeñas flores de color verde o rojo y sus semillas marrones (Cárdenas, 2017).

La lengua de vaca, una planta perenne de gran adaptabilidad puede recolectarse en cualquier época del año, se recomienda hacerlo antes de la floración debido a que en este periodo las hojas jóvenes concentran mayores cantidades de los principios activos. Luego, se procede a secarla al aire libre, envolviéndola en papel periódico y colgándola en un lugar fresco y oscuro. Una vez que la lengua de vaca está completamente seca, se almacena en un lugar resguardado de la luz y la humedad para conservar su calidad y propiedades (Jiménez et al., 2004).

Las hojas de la *Rumex obtusifolius* son la principal parte utilizada para la elaboración de extractos. Estas hojas son abundantes en provitamina A, clorofila, carotenoides, flavonoides, sales minerales y ácidos orgánicos, entre otros compuestos beneficiosos. Entre los componentes activos

con propiedades fungicidas se encuentran: aceites esenciales, flavonoides, ácidos orgánicos, sales minerales (Cárdenas, 2017).

El extracto de *R. obtusifolius* posee diferentes componentes activos como:

- Aceites esenciales: Ricos en terpenoides volátiles con actividad antibacteriana y antifúngica (Jiménez et al., 2004).
- Flavonoides: Compuestos con actividad antioxidante y antiinflamatoria (Jiménez et al., 2004).
- Ácidos orgánicos: Ácido oxálico, ácido cítrico y ácido málico, entre otros, con propiedades antimicrobianas (Jiménez et al., 2004).
- Sales minerales: Calcio, hierro, potasio, manganeso y otros, que contribuyen a la salud general de las plantas (Jiménez et al., 2004).

El extracto de *R. obtusifolius* posee doble funcionalidad beneficiando la sostenibilidad agrícola en los cultivos, sino también la reducción del impacto ambiental con la reducción de usos de pesticidas químicas que son usados en las explotaciones agrícolas, apoyando a los principios de la agricultura sostenible (Soto, 2015).

3.3.1. Propiedades Antifúngicas de Lengua de vaca

La lengua de vaca (*Rumex obtusifolius*) es una planta que ha sido objeto de interés en la investigación agrícola debido a su potencial para contener compuestos con propiedades antifúngicas. Si bien la investigación específica sobre los componentes antifúngicos de esta planta aún está en desarrollo, se han realizado estudios que sugieren su efectividad contra varios hongos fitopatógenos (Mena et al., 2020).

Mena et al., 2020, menciona que la actividad antifúngica de la lengua de vaca se manifiesta en la capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo de hongos que causan enfermedades en los cultivos agrícolas. Esta capacidad inhibidora ha sido demostrada en estudios in vitro, donde extractos de *Rumex obtusifolius* han mostrado efectos significativos sobre la viabilidad y la proliferación de hongos patógenos.

Uno de los posibles mecanismos mediante los cuales la lengua de vaca ejerce su actividad antifúngica es a través de la interacción con la membrana celular de los hongos. Se ha postulado que ciertos compuestos presentes en la planta pueden afectar la integridad de la membrana celular de los hongos, provocando daño estructural y disfunción en su funcionamiento. Este daño a la

membrana celular puede llevar a la pérdida de homeostasis y a la eventual lisis de la célula fúngica (Mena et al., 2020).

Además de su efecto sobre la membrana celular, se ha sugerido que los compuestos antifúngicos presentes en la lengua de vaca podrían interferir con procesos metabólicos cruciales para la supervivencia de los hongos. Estos compuestos podrían dirigirse a procesos como la síntesis de proteínas, la producción de energía o la regulación del crecimiento, lo que resulta en la inhibición del crecimiento fúngico y la reducción de la virulencia del patógeno (Mena et al., 2020).

Si bien aún se necesita una investigación más detallada para identificar y caracterizar los componentes específicos responsables de las propiedades antifúngicas de la lengua de vaca, su potencial como fuente de agentes antifúngicos naturales es prometedor. La utilización de extractos de esta planta en el manejo integrado de enfermedades en la agricultura podría ofrecer una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente para el control de enfermedades fúngicas en los cultivos agrícolas (Mena et al., 2020).

3.3.2. Toxicidad

Rumex obtusifolius contiene varios compuestos tóxicos, siendo los más representativos el ácido oxálico, las antraquinonas y los taninos. El ácido oxálico es un ácido orgánico que puede formar cristales dañinos para los tejidos, causando dolor abdominal, vómitos y diarreas. Los taninos, una clase de polifenoles, pueden precipitar proteínas y causar irritación en las mucosas, llevando a síntomas como náuseas, vómitos y daño hepático. Estos compuestos hacen que el *R. obtusifolius* presente riesgos toxicológicos significativos cuando son ingeridos en concentraciones altas o ante sensibilidades a estos polifenoles (Srivastava y Srivastava, 2020).

a) Ácido oxálico

Este compuesto es conocido por su capacidad para formar complejos insolubles con minerales como el calcio, lo que puede reducir la biodisponibilidad de estos nutrientes en el cuerpo. Lo que puede contribuir a la formación de cálculos renales y empeorar condiciones como la artritis, el reumatismo, la gota y la hiperacidez, especialmente en personas con predisposición a estas afecciones (Srivastava & Srivastava, 2020).

Taninos

Los taninos son compuestos astringentes presentes en *Rumex obtusifolius* reduce la absorción de proteínas y otros nutrientes esenciales en el tracto digestivo, lo que puede provocar irritación gastrointestinal y desnutrición en casos extremos (Cárdenas, 2017).

3.4. Higuierilla “*Ricinus communis*”

La planta de *R. communis*, es originaria de la región tropical de África y se ha adaptado a una amplia gama de climas, desde cálidos y secos hasta templados y húmedos. Su óptimo desarrollo se observa en climas cálidos y subtropicales, donde las temperaturas oscilan entre los 20°C y los 30°C. Aunque puede tolerar temperaturas más bajas durante cortos períodos, las heladas pueden dañarla severamente. Prefiere altitudes que van desde el nivel del mar a los 2500 metros, siendo más común en zonas bajas o de altitudes moderadas (Hidalgo, 2020).

En cuanto a sus hábitats naturales, la higuierilla es una planta que prefiere suelos bien drenados y fértiles, pero también muestra una sorprendente capacidad de adaptación a suelos marginales, como aquellos con baja fertilidad o que presentan problemas de salinidad. Se encuentra comúnmente en áreas con precipitaciones anuales que van desde los 500 hasta los 1500 milímetros, aunque puede tolerar períodos de sequía moderada debido a su sistema radicular profundo y su capacidad para almacenar agua en sus tejidos. Además, es una planta que puede prosperar en una variedad de entornos, desde terrenos planos hasta pendientes suaves. Su adaptabilidad también se refleja en su capacidad para crecer tanto en áreas soleadas como en áreas parcialmente sombreadas (Hidalgo, 2020).

Se aprovechan principalmente las semillas y, en menor medida, las hojas de la planta. Tras la recolección, se procede a la extracción de los componentes bioactivos mediante métodos adecuados como la maceración, la destilación o la extracción por solventes. Posteriormente, el extracto resultante se somete a un proceso de secado controlado para eliminar la humedad y garantizar su estabilidad y conservación a largo plazo, evitando la degradación de los compuestos fitoquímicos de interés. (Carballido, 2020).

Se prefiere recolectar las semillas de higuierilla en su estado fenológico óptimo, cuando han alcanzado su madurez fisiológica. Este estado se identifica cuando las cápsulas que contienen las semillas comienzan a secarse y adquieren un color parduzco o marrón. En este momento, las semillas concentran la mayor cantidad de compuestos bioactivos, como los ácidos ricinoleicos, que poseen propiedades fungicidas (Hidalgo, 2020).

Carballido, 2020 menciona que, las semillas se someten a un proceso de secado gradual y controlado para evitar la pérdida de calidad y actividad biológica de los compuestos.

Las partes útiles de la planta de higuera para su aplicación como fungicida son principalmente las semillas, que contienen altas concentraciones de ácido ricinoleico, y las hojas ricas en ricinina y flavonoides. Estas semillas se recolectan cuando alcanzan su madurez fisiológica, se despojan de la cáscara externa y se someten a un proceso de extracción para obtener el aceite de ricino, que es rico en ácido ricinoleico (Realpe, 2014).

El proceso de extracción del aceite de ricino para su uso como fungicida implica generalmente el prensado en frío o la extracción por solventes de las semillas de higuera. En el prensado en frío, las semillas se trituran y se presan para liberar el aceite, que se separa de los residuos sólidos mediante filtración. En la extracción por solventes, se utilizan solventes orgánicos para extraer el aceite de las semillas, y luego el solvente se elimina mediante evaporación. El aceite obtenido contiene ácido ricinoleico, que actúa como agente fungicida al interferir con los procesos metabólicos de los hongos. Este aceite se puede aplicar directamente sobre las plantas afectadas o ser formulado en productos comerciales para su uso en el control de enfermedades fúngicas (Realpe, 2014).

3.4.1. Propiedades Fúngicas de la Higuera

Componentes bioactivos: La higuera, presenta propiedades fungicidas atribuidas principalmente a sus componentes bioactivos, entre los cuales destaca el ácido ricinoleico. Este ácido, presente en el aceite de ricino extraído de las semillas, ha mostrado actividad antimicótica contra una amplia variedad de hongos fitopatógenos. (Chang et al., 2013).

Mecanismos de acción: el ácido ricinoleico como fungicida implica la interferencia en la función de las membranas celulares de los hongos. Se cree que el ácido ricinoleico afecta la permeabilidad de las membranas, causando la fuga de nutrientes esenciales y metabolitos, lo que conduce a la desestabilización de la estructura celular y, finalmente, a la muerte del hongo. (Chang et al., 2013).

Actividad contra cepas bacterianas: La actividad fungicida de la higuera ha demostrado ser efectiva contra diversas cepas de hongos fitopatógenos, incluyendo especies de *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Antracnosis* y *Mildiu*. Estos hongos pueden causar enfermedades graves en una amplia gama de cultivos agrícolas, y la capacidad de la higuera para combatirlos la convierte en una opción prometedora para el control de enfermedades en la agricultura (Chang et al., 2013).

Sinergia con otros fungicidas: el aceite de ricino extraído de la higuera puede tener sinergias con otros fungicidas convencionales. Combinado con otros compuestos antifúngicos, el aceite de ricino puede potenciar la actividad fungicida y reducir la posibilidad de resistencia fungicida, lo que lo convierte en una herramienta valiosa en programas de manejo integrado de enfermedades. (Cárdenas et al., 2013).

Aplicaciones agrícolas: el aceite de ricino de la higuera y sus extractos vegetales pueden utilizarse en formulaciones fungicidas para el control de enfermedades en cultivos como tomates, pimientos, vid, y frutales. Estas aplicaciones pueden realizarse tanto preventiva como curativamente, ofreciendo una alternativa eficaz y sostenible para el manejo de enfermedades fúngicas en la agricultura (Cárdenas et al., 2013).

3.3.3. TOXICIDAD

La higuera (*Ricinus communis*) contiene varios compuestos tóxicos, siendo los más representativos la ricina, la ricinina y el ácido ricinoleico. La ricina es una proteína altamente tóxica que inhibe la síntesis proteica en los ribosomas, lo que puede llevar a síntomas severos como náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal. La ricinina, un alcaloide derivado de la piridina, afecta el sistema nervioso central, provocando convulsiones, debilidad y somnolencia. El ácido ricinoleico, aunque menos tóxico en comparación, actúa como un potente laxante, causando diarrea, cólicos y deshidratación. Estos compuestos hacen que la higuera sea una planta de considerable riesgo toxicológico (CFSPH, 2010).

A. Ricina

Es una proteína altamente tóxica que inhibe la síntesis de proteínas en las células, lo que lleva a la muerte celular. La exposición a la ricina, incluso en pequeñas cantidades, puede ser fatal si no se trata rápidamente. Los síntomas de envenenamiento incluyen náuseas, vómitos, diarrea, y fallos multiorgánicos, que pueden conducir a la muerte en un plazo de 36 a 72 horas si se ingiere, inhala o se inyecta (Fernández y otros, 2006).

B. Ricinina

La ricinina es un alcaloide menos tóxico también presente en la planta de ricino, pero no tiene la misma potencia letal que la ricina. La exposición a la ricinina puede causar síntomas como temblores, convulsiones, y depresión del sistema nervioso central (Fernández y otros, 2006).

3.5. Impacto socioeconómico

La presencia del hongo *Colletotrichum spp.*, conocido comúnmente como Antracnosis, tiene una relevancia socioeconómica considerable en el ámbito agrícola y alimentario. Este patógeno fúngico afecta a una amplia gama de cultivos de importancia económica, incluyendo el tomate, el mango, el banano, entre otros. Su presencia puede ocasionar pérdidas significativas en la producción agrícola debido a la degradación de la calidad de los productos y la disminución del rendimiento en los cultivos afectados (Brieva y Granobles, 2023).

Las consecuencias económicas directas de la infección por antracnosis. se reflejan en las pérdidas sufridas por los agricultores, quienes enfrentan la depreciación del valor de sus cosechas y una disminución en sus ingresos. La enfermedad puede afectar la calidad visual y nutricional de los productos, lo que reduce su atractivo para los compradores y, en última instancia, impacta negativamente en los márgenes de ganancia de los productores (Brieva y Granobles, 2023).

El control efectivo de antracnosis. es crucial para garantizar la seguridad alimentaria, mantener la competitividad de los productores agrícolas y satisfacer la demanda del mercado. Por lo tanto, la investigación y el desarrollo de estrategias de manejo integrado de esta enfermedad son fundamentales para proteger los cultivos, asegurar la calidad de los productos agrícolas y mantener la estabilidad económica de las comunidades agrícolas. Además, la implementación de prácticas de control sostenibles y eficaces contribuye a fortalecer la resiliencia de los sistemas agrícolas ante los desafíos ambientales y económicos a los que se enfrentan (Murray et al, 2019) .

3.6. Tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es originario de los Andes de Sudamérica, específicamente de áreas que incluyen Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia. Se cultiva extensamente en estas regiones y se ha extendido a otros países debido a su valor nutricional y versatilidad culinaria (Ali & Khan, 2022).

En Ecuador, el tomate de árbol es una fruta muy valorada, tanto por su sabor como por su uso en la gastronomía local. Se cultiva principalmente en las regiones andinas del país, donde las condiciones climáticas y altitud son ideales para su desarrollo. El tomate de árbol es un cultivo importante en provincias como Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, y Pichincha (Revelo et al., 2014).

El clima templado de la Sierra ecuatoriana, con temperaturas moderadas y buena exposición solar, favorece la producción de este fruto durante todo el año. En Ecuador, el tomate de árbol se consume principalmente en forma de jugos, pero también se utiliza en salsas, postres, y en la preparación de mermeladas (Revelo et al., 2014).

3.3.4. Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum betaceum* (ACIR, 2015)

3.3.5. Importancia del cultivo

El tomate de árbol es una fruta de gran importancia en Ecuador, no solo por su valor nutricional sino también por su contribución económica. Es una fuente significativa de vitaminas A y C, antioxidantes y minerales, lo que lo convierte en un alimento saludable y popular en la dieta ecuatoriana. Económicamente, el cultivo de tomate de árbol proporciona ingresos a pequeños y medianos agricultores, ya que la fruta es muy demandada tanto en el mercado local como para la exportación. Además, el tomate de árbol se utiliza en la preparación de jugos, salsas, postres y otros productos alimenticios, ampliando su mercado y relevancia económica en el país (Lee et al., 2022; Jones & Smith, 2022).

CAPÍTULO IV

4. 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
- Asa bacteriológica
- Porta objetos
- Micropipetas
- Puntas para Micropipetas

4.1.3. Reactivos

- Agar Sabouraud (SDA)
- Metanol
- Agua destilada
- Alcohol 70 %

- Hipoclorito de sodio 2%
- Fungicida químico (Difenoconazole + Pyraclostrobin 1 µL/ml)

4.2. METODOS

4.2.1. Recolección de la especie vegetal

Se llevó a cabo una observación directa con el objetivo de lograr una correcta identificación de las dos especies botánicas. Una vez completada la fase de recolección de estas dos especies, se procedió a crear una ficha de campo que contendrá información relevante de las especies de *Rumex obtusifolius* y *Ricinus communis*.

4.2.2. Secado

Se depositaron las muestras recogidas en un periodo de cuarentena por un mínimo de 3 horas aproximadamente para poder evitar una contaminación hacia otro tipo de muestras que se encuentren en el herbario. En las deshidratadoras se procedió al secado con una temperatura que no debe sobrepasar los 50 °C, para ello se debe utilizar papel absorbente en cada una de las muestras evitando así contaminación (Ruano, 2020).

4.2.3. Montaje

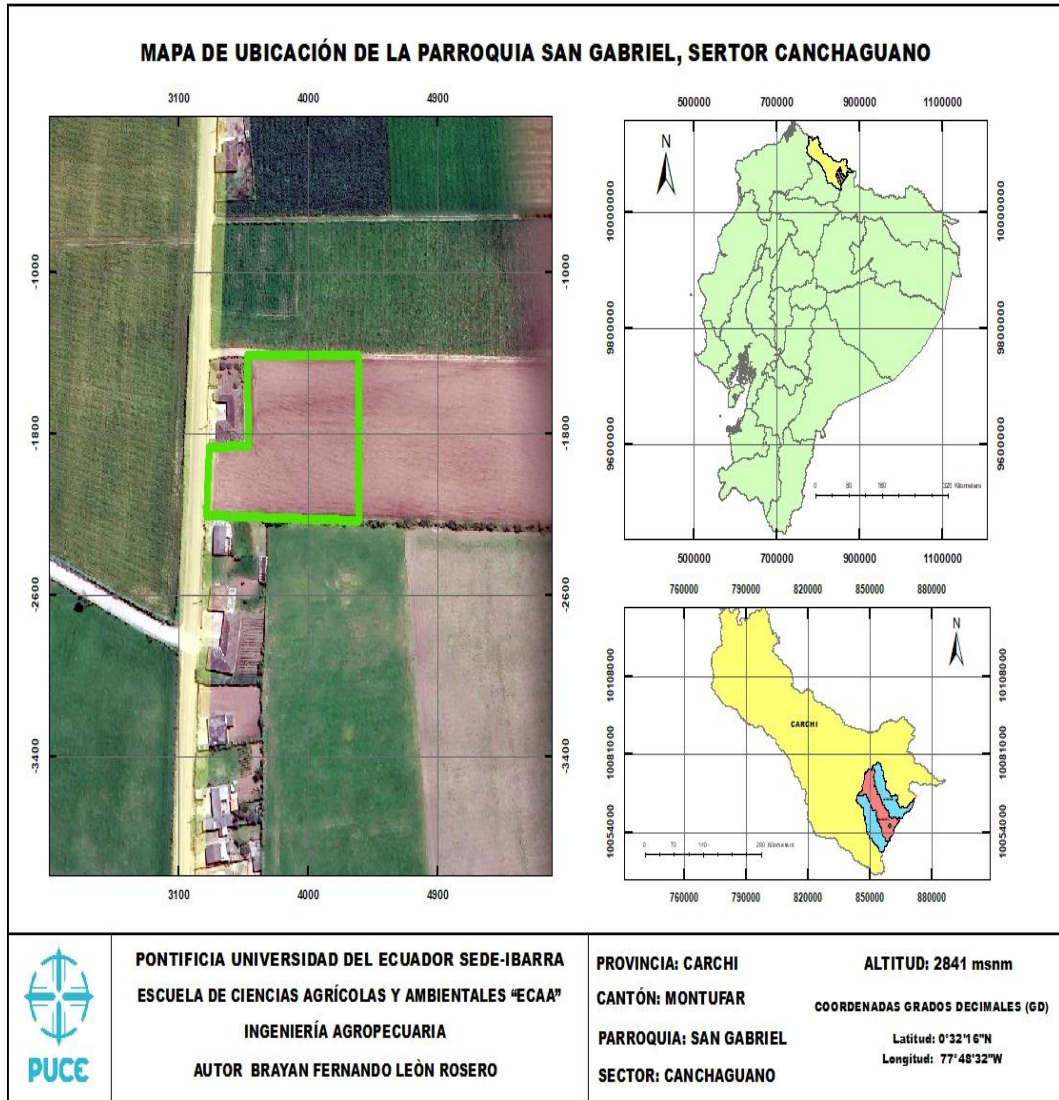
Una vez deshidratadas las muestras, se colocaron en cartulina dúplex de tamaño A3 aquí se procedió a colocar las especies con cuidado y para esto se utilizarán adhesivos especiales, si las muestras poseen partes gruesas se deberá ubicar la muestra con mucho cuidado en la cartulina. Una vez pegadas las muestras a las láminas se colocó la etiqueta, el sobre y los sellos de verificación (Ruano, 2020).

4.2.4. Recolección e identificación taxonómica de las especies vegetales

Las muestras vegetales de *Ricinus communis* y *Rumex obtusifolius* se recolectaron en la Ciudad de San Gabriel, perteneciente al cantón Montufar, sector Canchaguano en la provincia del Carchi (figura 1).

Figura 1

Mapa del sitio de recolección de especies



Nota. Realizado en base de datos de Google Earth 2024, con apoyo del programa ArcGIS.

En la figura 1 se observa el sitio de recolección de las dos especies vegetales *Ricinus communis* y *Rumex obtusifolius*, con las respectivas coordenadas georreferenciadas detalladas en la Tabla 2.

Tabla 2 Sitio de recolección georreferenciado de las especies vegetales *Ricinus communis* y *Rumex obtusi-folius*.

Nombre común	Familia	Especie	Altitud	Lugar de recolección	Coordenadas
--------------	---------	---------	---------	----------------------	-------------

Lengua de vaca	Polygonaceae	<i>Rumex obtusifolius</i>	2841 msnm	Ciudad San Gabriel, Cantón Montúfar, provincia del Carchi – Ecuador	0° 32'16" N 77° 48'32" W
Higuerilla	Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i>	2841 msnm	Ciudad San Gabriel, Cantón Montúfar, provincia del Carchi – Ecuador	0° 32'16" N 77° 48'32" W

Nota. Georreferencia con GPS digital de precisión 2024

4.3. FASE DE LABORATORIO

Para obtener los extractos totales de las dos especies vegetales de *Ricinus communis* y *Rumex obtusifolius* se siguió el protocolo propuesto por Ordóñez et al. (2023).

4.4.1. Triturado

Una vez que las muestras, como las hojas se encontraron completamente deshidratadas, se procedió a triturarlas con el objetivo de reducir el tamaño de las partículas y, de esta manera, aumentar la superficie de contacto con el solvente. Para llevar a cabo este procedimiento, se introdujo las muestras en un dispositivo triturador durante aproximadamente un minuto. Al finalizar este periodo, se tomó el peso correspondiente de la muestra que ha sido desecada. Con base en este peso se continuo con el proceso de obtención del extracto necesario Ordóñez et al. (2023).

4.4.2. Obtención del extracto total

Con el propósito de llevar a cabo la extracción, se empleó solventes orgánicos con un punto de ebullición mínimo como es el metanol. Este enfoque es fundamental para garantizar la completa preservación de las muestras, ya que este paso es de gran relevancia en la obtención de los extractos totales de las plantas (Oróñez et al., 2023).

El proceso de obtención de los extractos consistió en tomar 30 gramos de *Ricinus communis* y *Rumex obtusifolius* respectivamente, que fueron depositados matraz, previamente se cargó con 300 ml de metanol, manteniendo la relación peso/ volumen de 1:10. Tras esta etapa, se colocó el matraz en un agitador durante un máximo de 24 horas. Una vez transcurrido este periodo, se llevó a cabo la filtración de la muestra con la ayuda de una máquina de vacío. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones y, al final, se obtuvo una filtración adecuada para dar paso a la siguiente fase, que implica la evaporación (Oróñez et al., 2023).

La fase de evaporación tuvo como objetivo separar el solvente y obtener el extracto total, en forma seca. Para llevar a cabo este proceso, se utilizó un Rotavapor a una temperatura controlada de 40°C, lo que permitió obtener el extracto en su estado seco. Una vez obtenidos los extractos secos, se almaceno en frascos ámbar y en un entorno que carezca de luz y sea completamente seco para garantizar su conservación óptima y se etiqueto con la información correspondiente Ordóñez et al. (2023).

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

Ecuación 1

Porcentaje de rendimiento

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

4.4. Aislamiento del patógeno *Colletotrichum spp* aislado del fruto de tomate de árbol “*Solanum betaceum*”.

Para el aislamiento del hongo *Colletotrichum spp*, se siguió el protocolo propuesto por Celis et al. (2009) Tabla 3:

Tabla 3 Protocolo de aislamiento del hongo *Colletotrichum spp*

Pasos	Descripción
Limpieza de frutos	Los frutos enfermos se lavaron con agua destilada esterilizada y se dejaron secar dentro de una cámara de flujo laminar (Celis et al., 2019).
Selección de tejido enfermo	Se tomaron partes enfermas, producto del tizón tardío, con un diámetro no mayor a 3 mm (Celis et al., 2019).
Desinfección del tejido	El tejido se desinfectó en una solución de hipoclorito al 2% durante un máximo de 90 segundos. Posteriormente, se lavó durante 30 segundos con agua destilada esterilizada (Celis et al., 2019).
Tratamiento con alcohol	El tejido se sumergió en alcohol al 70% por 60 segundos. Se lavó nuevamente con agua destilada esterilizada durante 30 segundos y se secó con papel filtro esterilizado (Celis et al., 2019).

Siembra en medio de cultivo	Se sembraron las muestras en cajas Petri con medio de cultivo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Celis et al., 2019).
Incubación	Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 25°C, las cuales se revisaron en intervalos de 24 horas para observar el crecimiento del micelio. Una vez visible el micelio, se transfirieron a nuevas cajas Petri con SDA para obtener cultivos puros que se incubaron nuevamente a 25°C en condiciones de oscuridad durante aproximadamente 4 semanas (Celis et al., 2019).

4.5. Caracterización morfológica del hongo *Colletotrichum spp* aislado de frutos enfermos de tomate de árbol “*Solanum betaceum*”

Se realizó la caracterización morfológica del hongo *Colletotrichum spp*, siguiendo el protocolo propuesto por Celis et al. (2019) Tabla 4.

La recolección de las muestras se obtuvo de tejidos vegetal enfermo o de frutos infectados.

Tabla 4 Preparación de muestra para microscopía óptica

Pasos	Descripción
Preparación de muestras para microscopía óptica	Una pequeña porción de la muestra se colocó sobre un portaobjetos limpio y se cubrió con un cubreobjetos Celis et al. (2019).
Mejora de la visualización	Se añadió una gota de azul de metileno cuando fue necesario, para mejorar la visualización de las estructuras fúngicas bajo el microscopio Celis et al. (2019).
Observación microscópica inicial	El portaobjetos preparado se colocó en el microscopio óptico, comenzando con una baja magnificación (10x o 20x) para localizar las estructuras generales del patógeno Celis et al. (2019).
Observación de detalles morfológicos	Se incrementó la magnificación (40x o 100x) para observar detalles más finos, como esporangios, zoosporas, hifas y estructuras de reproducción Celis et al. (2019).
Registro de características	Se tomaron notas detalladas de las características morfológicas observadas, incluyendo tamaño, forma, color, textura y disposición de las estructuras fúngicas Celis et al. (2019).

4.6. Caracterización molecular del hongo *Colletotrichum spp* aislado de frutos enfermos de tomate de árbol “*Solanum betaceum*”.

La caracterización molecular del patógeno *Colletotrichum spp.* se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Laboratorios IDGen (2024).

- Se extrajo el ADN por métodos convencionales, utilizando aproximadamente 100 mg de muestra.
- Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de micro volúmenes y visualización en gel de agarosa al 1%.
- El ADN se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20 ng/μL para su amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers ITS1/ITS4.
- Los productos de PCR fueron purificados antes de la secuenciación por el método SANGER.
- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos.
- Se compararon las secuencias ensambladas de las muestras con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI para su identificación taxonómica.

4.7. Contabilización de esporas de *Colletotrichum spp*

Se realizó la metodología propuesta por Villacis y otros, (2017):

Se inoculó *Colletotrichum spp.* en placas de Petri que contenían Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) esterilizado.

Las placas fueron incubadas a una temperatura controlada entre 25-28°C durante un período de 7-10 días, hasta que se logró una esporulación adecuada y el micelio cubrió por completo la superficie del medio.

Sobre la superficie esporulada del hongo, se agregaron 10 ml de agua destilada estéril.

Con el uso de asas estériles, el micelio fue raspado suavemente para liberar las esporas en la solución.

La suspensión obtenida se recolectó en un tubo de ensayo estéril, que fue debidamente tapado.

El tubo de ensayo se agitó vigorosamente a mano para garantizar una mezcla uniforme de las esporas en la solución.

Para la cuantificación, se tomaron 10 μL de la suspensión de esporas y se depositaron en una cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer se observó bajo un microscopio, enfocándose en las cuadrículas grandes.

Se realizó un conteo de las esporas en 4 de las cuadrículas grandes de la cámara de Neubauer.

Se registraron los números de esporas contadas y se calculó el promedio para determinar la concentración de esporas en la suspensión. La concentración de esporas en la suspensión se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de esporas/ml} = \frac{\# \text{ de esporas contadas en promedio por cuadrícula}}{0.0001 \text{ ml}}$$

En este caso, se contaron 100 esporas por cuadrícula. Por lo tanto, la concentración de esporas en la suspensión es:

$$\text{Concentración de esporas/ml} = \frac{100}{0.0001 \text{ ml}} = 1 \times 10^6 \text{ esporas/ml}$$

La suspensión fue diluida antes del conteo (1:10), por ende, multiplicamos la concentración obtenida por el factor de dilución para determinar la concentración original de la suspensión.

$$\text{Concentración original} = 1 \times 10^6 \text{ esporas/ml} \times 10 = 1 \times 10^7 \text{ esporas/ml}$$

En este caso, la concentración de esporas es 1×10^7 esporas/ml, lo cual es la concentración deseada.

4.8. Diseño experimental

En esta investigación, se implementó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), un método que asigna aleatoriamente los tratamientos a las unidades experimentales, con el fin de reducir sesgos y asegurar la validez de las inferencias estadísticas (Gavilanes, 2018).

Se estableció prueba de Tukey al 5% para comparar las medias de los tratamientos en relación con la variable de crecimiento del hongo patógeno *Colletotrichum spp.* aislado de plantas afectadas.

4.9. ANALISIS ESTADISTICO

4.9.1. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la práctica fueron sistematizados y analizados estadísticamente utilizando el software Infostat/E, y se realizó el análisis para cada variable de inhibición del patógeno usando los extractos de *Ricinus communis* y *Rumex obtusifolius*. Los presentes datos fueron evaluados mediante pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene. Una vez verificados los supuestos para cada variable, se procedió con el análisis de varianza (ANOVA). Además, se aplicó la prueba de Tukey al nivel de significancia del 5% para comparaciones múltiples

4.9.2. Análisis de varianza ANOVA

Se utilizó el análisis de varianza ANOVA para evaluar las variables en conjunto con la prueba de Tukey al 5% como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5 Fuentes de análisis de varianza ANOVA con Grados Libertad.

Fuentes de variación (FV)	Grados de libertad (GL)
Tratamientos	7
Error	16
Total	23

4.9.3. Tratamientos

Se utilizó un total de 8 tratamiento, ver tabla 6, de los cuales 5 pertenecen a las concentraciones de los extractos vegetales de *Ricinus communis* y *Rumex obtusifolius*. Se realizó diluciones seriadas de 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62.5 mg/ml y 31,25 mg/ml, añadiendo un control

con solvente orgánico (Metanol), un control positivo un fungicida químico (Pyraclostrobin + Difeconazole) y el testigo absoluto (Oróñez et al., 2023).

Tabla 6 *Tratamientos evaluados en la inhibición de Antracnosis por las especies vegetales de Higuierilla y Lengua de vaca.*

Tratamiento	Concentraciones
T 1	Concentración 500 mg/ml
T 2	Concentración 250 mg/ml
T 3	Concentración 125 mg/ml
T 4	Concentración 62,5 mg/ml
T 5	Concentración 31,25 mg/ml
T 6	Solvente orgánico
T 7	Control positivo (1µl/ml)
T 8	Testigo absoluto

4.9.4. Unidad experimental

Una caja Petri corresponde a una unidad experimental, en la cual se colocó agar Sabouraud Dextrose Agar más el patógeno aislado. Las dimensiones de la caja son 100 mm de diámetro, altura de 15 mm.

Son 8 tratamientos y tres repeticiones para cada una de las concentraciones, producto comercial, solvente orgánico y el testigo absoluto.

4.10. Variables

a. Variables independientes

Concentración de los extractos vegetales de Lengua de Vaca (*Rumex obtusifolius*) e Higuierilla (*Ricinus communis*).

b. Variables dependientes

- Inhibición del hongo patógeno

Para determinar la inhibición del hongo patógeno en esta investigación, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Selección del Hongo Patógeno: Se eligió un hongo patógeno específico para el estudio, basándose en su relevancia agronómica. .

- Preparación de Cultivos: Se prepararon cultivos puros del hongo en medios adecuados, asegurando su viabilidad y uniformidad a lo largo del experimento.
- Preparación de Muestras y Tratamientos: Se prepararon diversas muestras y tratamientos utilizando extractos de “*Ricinus communis*” y “*Rumex obtusifolius*” en las concentraciones establecidas para el estudio.
- Aplicación de Tratamientos: Los tratamientos fueron aplicados de manera controlada sobre las muestras de hongo, siguiendo estrictamente un diseño experimental completamente al azar.
- Evaluación de la Inhibición: Se midió y registró el crecimiento del hongo bajo cada tratamiento a intervalos específicos de tiempo (diariamente, cada 24 horas, etc.), con el objetivo de evaluar la inhibición del hongo patógeno.

4.11. Crecimiento diario del hongo

Se realizaron mediciones cada 24 horas del crecimiento diario del hongo, todo esto hasta que el patógeno cubrió en su totalidad la caja Petri. Las mediciones del crecimiento micelial del hongo se tomaron en sentido norte, sur, este y oeste. Dicho parámetro se midió en función a la ecuación numero 2 propuestas por Ordóñez et al. (2023).

Ecuación 2

Crecimiento diario del patógeno

$$Tc = \frac{Cf - Ci}{Tf - Ti}$$

Cf: Crecimiento final en cm

Ci: Crecimiento inicial en cm

Tf: Tiempo final en donde termina el crecimiento

Ti: Tiempo inicial donde inicia el crecimiento

4.8. Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de extractos totales de dos especies vegetales tanto de la familia Polygonaceae y de la familia Euphorbiaceae mediante ensayos de actividad biológica.

Para llevar a cabo la prueba antifúngica in vitro de las especies vegetales, se realizó en función a la metodología correspondiente de Kirby Bauer. Se cultivó el hongo *Colletotrichum*

spp en placas de Petri utilizando medio de cultivo SDA. Se incubaron las cajas Petri a 25° C por 7 días, tiempo estimado que el hongo cubrió la caja en su totalidad (Oróñez et al., 2023).

Se emplearon discos de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con extractos totales de *Rumex obtusifolius* y *Ricinus communis* respectivamente, aplicados en cinco seriadas concentraciones: 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62.5 mg/mL y 31.25 mg/mL, con tres repeticiones para cada concentración. Cada concentración se etiquetó con la respectiva información (Oróñez et al., 2023).

Las mediciones se realizaron cada 24 horas durante un periodo de 4 días, a temperatura de 24 ° C con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, lo que permitió evaluar con precisión la acción biológica del extracto (Oróñez et al., 2023).

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación del rendimiento de las especies vegetales *Rumex obtusifolius* y *Ricinus communis*.

Se determino los rendimientos de extractos media el uso de la Ecuación 1, cuyos valores se los detalla en la tabla 7. Los extractos obtenidos dieron un rendimiento de 28, 86% a partir de 30 gramos de material vegetal de Lengua de vaca. Igualmente, se obtuvo un 28, 39% de rendimiento para la especie de Higuierilla.

Al comparar estos resultados con los mencionados por (Villacis y otros, 2017), se observa que los rendimientos obtenidos de las especies vegetales, están ligadas a los diferentes métodos de extracción, la etapa fenológica de la planta y de que parte de la planta se realiza. . De la misma forma, López (2018) determinó un rendimiento del 23,2 % para lengua de vaca utilizando la técnica de realización de extractos acuosos. Asimismo, Ramos et. al (2020) obtuvieron un rendimiento promedio del 29,6% en la extracción de higuierilla con la técnica de extractos metanólicos.

Cabe señalar que, aunque el rendimiento porcentual es útil para comparar la eficiencia de diferentes métodos de extracción, no proporciona información sobre la calidad química o biológica de los extractos obtenidos.

Ecuación 1

Porcentaje de rendimiento

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

$$\textit{Urtica dioica} \%rendimiento = \frac{8,02g}{30g} \times 100$$

$$\textit{Solanum nigrum} \%rendimiento = \frac{9,99g}{30g} \times 100$$

Tabla 7 Resultados en porcentaje de rendimiento del extracto total de las especies vegetales *Rumex obtusifolius* y *Ricinus communis*

Especie vegetal	Materia vegetal deshidratada (g)	Extracto seco (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
<i>Rumex obtusifolius</i>	30	8,65	28,86
<i>Ricinus communis</i>	30	8,51	28,39

Dilución seriada del extracto de las especies vegetales

A partir del extracto total de las dos especies vegetales, Lengua de vaca e Higuera, se procedió a preparar diluciones seriadas del extracto. La primera concentración (500mg/mL) se obtuvo mezclando 500 mg de extracto vegetal con 1 mL de metanol. Para la segunda concentración (250mg/mL), se utilizó 0,5 mL de la primera solución y se le añadió 0,5 mL de metanol. La tercera concentración (125mg/mL) se preparó tomando 0,5 mL de la segunda solución y añadiendo 0,5 mL de metanol. La cuarta concentración (62,5mg/mL) se hizo combinando 0,5 mL de la tercera solución con 0,5 mL de metanol, y finalmente, la última concentración (31,25mg/mL) se obtuvo mezclando 0,5 mL de la cuarta solución con 0,5 mL de metanol.

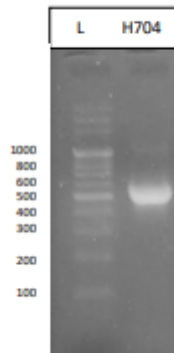
5.2. Caracterización molecular del patógeno *Colletotrichum spp.* aislado de tomate de árbol.

La caracterización molecular del patógeno aislado de plantas enfermas mediante la técnica de PCR y secuenciación sanger proporcionó que el patógeno aislado se trata de *Colletotrichum tamarilloi*, resultados significativos y relevantes para entender la naturaleza del patógeno y su relación con las plantas hospederas (O'Connell y Bailey, 2007).

Se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de amplificación, visualizándose bandas de aproximadamente 500 pb para el marcador ITS (figura 2). A partir de las lecturas resultantes de la secuenciación SANGER se obtuvieron secuencias de que permitieron determinar la identidad de la cepa fúngica.

Figura 2

Visualización en gel de agarosa 2% de ampliación indicando fragmentos de aproximadamente 500 pb amplificados con primers ITS1/ITS4 para la muestra. L: Marcador de peso molecular de 100 bp



Nota. Elaborado por Laboratorios IDGen, 2024

El aislado fúngico fue identificado como *Colletotrichum tamarilloi* con base en el fragmento secuenciado de ITS como se observa en la tabla 8.

Tabla 8 Resumen de resultados de caracterización molecular de Antracnosis aislado de tomate de árbol

Código ID-Gen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	N.º Accesoión
H704	N/A	607	100	<i>Colletotrichum tamarilloi</i>	ITS	100	NR_111732.1

La obtención de ADN de alta calidad permitió la amplificación exitosa de fragmentos de aproximadamente 500 pb con los primers ITS1/ITS4, (Laboratorios IDGen, 2024). La calidad del ADN es crucial para garantizar la precisión y representatividad de las secuencias genéticas obtenidas del patógeno aislado (Sambrook et al., 1989).

5.3. Halo de inhibición de actividad fúngica de *Colletotrichum tamarilloi*.

5.3.1. Análisis de normalidad y homogeneidad de los datos para el halo de inhibición del hongo patógeno *Colletotrichum tamarilloi* con extracto de la especie vegetal Lengua de vaca e Higuierilla

Se realizó un análisis de normalidad y homogeneidad de los datos para evaluar la inhibición del crecimiento del hongo *C. tamarilloi*. utilizando extractos de las especies vegetal *Rumex obtusifolius* y *Ricinus communis*. Los resultados de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene se presentan en la tabla 9 y 10 para los cuatro días de evaluación.

Para el extracto de *Ricinus communis*, los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk indicaron valores de W calculados de 0,95, 0,96, 0,97 y 0,97 para los días 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Todos los p-valores asociados a estos W fueron mayores a 0,05, lo que sugiere que los datos siguen una distribución normal en cada uno de los días evaluados. Esto respalda el uso de análisis paramétricos.

En cuanto a la homogeneidad de varianza, las pruebas de Levene arrojaron p-valores de 0,501, 0,709, 0,864 y 0,875 para los días 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Estos resultados indican que las varianzas entre los grupos son homogéneas, permitiendo suponer que las condiciones para los análisis estadísticos paramétricos son adecuadas. Esto significa que los análisis posteriores sobre el efecto del extracto de higuierilla en la inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum tamarilloi* pueden llevarse a cabo con confianza en los resultados obtenidos.

Tabla 9 Resultados de la prueba de normalidad y homogeneidad, test de Shapiro – Wilk y Levene en el día 4 de crecimiento del halo de inhibición el hongo *Colletotrichum tamarilloi* con el extracto de la especie vegetal *Ricinus communis*

Variable crecimiento de hongo <i>Colletotrichum spp</i>	N	Me- día	DE	Prueba Shapiro Wilk		Prueba de Levene	
				W cal- culado	P (Unilate- ral D)	N p-va- lor	Homoge- neidad
RDUO Día 1 crecimiento	24	0	0,01	0,95	0,2484	N 0,501	H
RDUO Día 2 crecimiento	24	0	0,01	0,96	0,3235	N 0,71	H
RDUO Día 3 crecimiento	24	0	0,03	0,97	0,3235	N 0,86	H

RDUO Día 4 crecimiento	24	0,02	0,97	0,0934	N	0,87	H
------------------------	----	------	------	--------	---	------	---

Nota. n = Número de muestras, DE = Desviación Estándar, W = valor de Shapiro – Wilk, N = Normalidad, p (Unilateral D = Probabilidad con un alfa (α) al 0,05%. Calculado con el software Infostat estadístico versión 2020 e.

Los resultados de las pruebas de normalidad y homogeneidad para evaluar la inhibición del crecimiento del hongo *C. tamarilloi* con extracto de la especie vegetal *Rumex obtusifolius* durante cuatro días se detallan a continuación en la tabla 10

Para evaluar la normalidad de los datos correspondientes a la inhibición del hongo *Colletotrichum tamarilloi* con el extracto de *Rumex obtusifolius*, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk en los cuatro días de evaluación. Los valores de W obtenidos fueron 0,93, 0,93, 0,93 y 0,91 para los días 1, 2, 3 y 4, respectivamente, con p -valores de 0,2484, 0,3235, 0,3235 y 0,0934, todos mayores a 0,05. Estos resultados indican que los datos siguieron una distribución normal en cada uno de los días evaluados.

Adicionalmente, la prueba de Levene se utilizó para verificar la homogeneidad de las varianzas entre los grupos en cada día de evaluación. Los p -valores fueron 0,6, 0,11, 0,107 y 0,45 para los días 1, 2, 3 y 4, respectivamente, indicando que no hubo diferencias significativas en las varianzas entre los grupos en ningún día ($p > 0,05$). Estos resultados respaldan la validez del uso de estadísticas paramétricas para analizar los efectos del extracto de *Rumex obtusifolius* sobre la inhibición del hongo *Colletotrichum tamarilloi* en los diferentes días de evaluación.

Tabla 10 Resultados de la prueba de normalidad y homogeneidad, test de Shapiro – Wilk y Levene en los 4 días de crecimiento del halo de inhibición el hongo *Colletotrichum tamarilloi* con el extracto de la especie vegetal *Rumex obtusifolius*

Variable crecimiento de hongo <i>Colletotrichum spp</i>	n	Me-día	DE	Prueba Shapiro Wilk		Prueba de Levene		
				W calculado	P (Unilateral D)	N	p-valor	Homogeneidad
RDUO Días 1 crecimiento	24	0	0,02	0,93	0,2484	N	0,6	H
RDUO Días 2 crecimiento	24	0	0,02	0,93	0,3235	N	0,11	H
RDUO Días 3 crecimiento	24	0	0,02	0,93	0,3235	N	0,107	H
RDUO Días 4 crecimiento	24	0	0,02	0,91	0,0934	N	0,45	H

Nota. n = Número de muestras, DE = Desviación Estándar, W = valor de Shapiro – Wilk, N = Normalidad. Calculado con el software Infostat estadístico versión 2020 e.

5.3.2. Resultado del ANOVA en los cuatro días de evaluación de crecimiento del halo de inhibición del hongo *Colletotrichum tamarilloi* de la especie vegetal *Ricinus communis*

La prueba de Tukey se utiliza para comparar las medias de los tratamientos después de haber encontrado diferencias significativas en el ANOVA. En este caso, el valor de p obtenido para los tratamientos es menor que 0,05 (<0,0001), lo que indica diferencias estadísticamente significativas entre al menos algunos de los tratamientos. (tabla 11)

Día 1:

El análisis de varianza (ANOVA) realizado para el primer día de evaluación indicó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, con un p-valor < 0,0001 (Tabla 13). El coeficiente de variación (CV) fue de 4,68%, lo que refleja una baja variabilidad en los datos de inhibición del hongo, señalando que las mediciones fueron consistentes y precisas. Estos resultados sugieren que el extracto de *Ricinus communis* tiene un efecto considerable en la inhibición del hongo *C. tamarilloi*.

Días 2, 3 y 4:

El segundo día de evaluación mantuvo la tendencia observada, con un p-valor < 0,0001 y un CV de 2,39%, mostrando una baja variabilidad en los datos y un promedio de inhibición de 0,52 cm. En el tercer día, aunque el p-valor siguió siendo significativo (<0,0001), el promedio de inhibición de 0,71 cm. Finalmente, en el cuarto día, el CV fue de 2,11%, con un promedio de inhibición de 0,94 cm. Estos resultados confirman la eficacia significativa del extracto de higuierilla en inhibir el crecimiento de *Colletotrichum spp.* durante todo el periodo evaluado.

Tabla 11 Análisis de fuentes de variación de la variable de crecimiento de halo de inhibición del hongo *Colletotrichum spp* en el días 4 de la especie vegetal *Ricinus communis*

Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
TRATAMIENTO	6,75	7	0,96	2225,63	< 0,0001
Error	0,01	16	4,3E-04		
Total	6,76	23			
C.V.	2,21 %				

Nota. F.V: Fuentes de variación, SC: Suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrado medio, F: valor de F calculado, p-valor: valor de significancia.

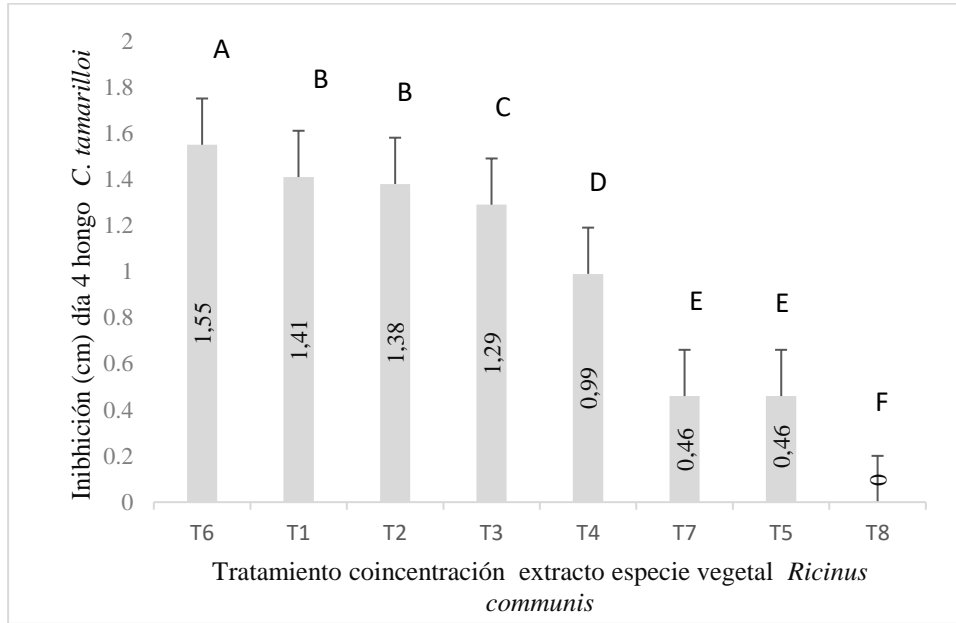
5.3.3. Resultados de la prueba Tukey de la especie *Ricinus communis*

La figura 4 nos indica los resultados del análisis de la prueba de Tukey para el día 4 donde se evaluó la efectividad de ocho tratamientos (T1 a T8) en la inhibición del hongo *Colletotrichum spp.*, con tres repeticiones por tratamiento. Los resultados mostraron que el tratamiento T6 tuvo la mayor media de inhibición, con 1,55 cm, siendo estadísticamente diferente y superior a todos los demás tratamientos, formando el grupo "A".

El análisis de la prueba de Tukey para el día 4 de inhibición del hongo *C. tamarilloi*. De la especie vegetal de Higuierilla se muestran en la figura 3

Figura 3

Efecto de las concentraciones de extracto de la especie vegetal Higuierilla del crecimiento de halo de la inhibición del hongo fitopatógeno *Colletotrichum spp* en el día 4



Nota: T1: 500 mg/ml, T2: 250 mg/ml, T3: 125 mg/ml, T4: 62,5 mg/ml, T5: 31,25 mg/ml, T6: Control químico (1µl/ml), T7: Solvente orgánico (metanol), T8: Testigo absoluto.

El tratamiento T6 con media de 1,55 se ubicó con el grupo "A" siendo el que mayor inhibición presenta. Los tratamientos T1 y T2, con medias de 1,41 cm y 1,38 cm respectivamente, no mostraron diferencias significativas entre sí, situándose en el grupo "B". El tratamiento T3, con una media de 1,29 cm, se ubicó en el grupo "C", mostrando una inhibición menor que T1 y T2, pero mayor que los demás tratamientos.

El tratamiento T4, con 0,99 cm de inhibición, se clasificó en el grupo "D", presentando una efectividad significativamente menor en comparación con los grupos A, B, y C. Los tratamientos T7 y T5, ambos con una media de 0,46 cm, se agruparon en el grupo "E", sin diferencias significativas entre ellos.

5.4. Análisis de varianza del crecimiento de halo de inhibición del hongo patógeno *C. tamarilloi* con el extracto de la especie *Rumex obtusifolius*

En la tabla 12 se precia el análisis de varianza de la inhibición del hongo *C. tamarilloi* con la acción del extracto de *R. obtusifolius*

Día 1:

El ANOVA del Día 1 muestra diferencias significativas entre los tratamientos, con un valor F de 273,43 y un p-valor menor a 0,0001, lo que indica que las variaciones en la inhibición de *Colletotrichum spp.* son atribuibles a los tratamientos aplicados (Ali et al., 2022). El p-valor de 0,2849 para las repeticiones indica buena consistencia experimental. El coeficiente de variación (CV) de 8,24% sugiere baja variabilidad en los datos, asegurando la fiabilidad del análisis. El promedio de inhibición de 0,1725 cm es la referencia para comparar la efectividad de los tratamientos.

Día 2:

El ANOVA del Día 2 revela un efecto significativo de los tratamientos sobre la inhibición de *Colletotrichum spp.*, con un valor F de 1287,92 y un p-valor menor a 0,0001 (Ali et al., 2022). El p-valor de 0,0385 para el error sugiere cierta variabilidad entre repeticiones, aunque menor que entre tratamientos. El CV de 2,98% indica datos consistentes, y el promedio de inhibición es de 0,54 cm.

Día 3:

El análisis del Día 3 muestra diferencias significativas con un valor F de 1946,87 y un p-valor menor a 0,0001 (Ali et al., 2022). El p-valor de 0,014 señala variabilidad significativa entre repeticiones. El CV de 2,52% refleja datos consistentes con un promedio de inhibición de 0,645 cm. (Khan et al., 2020).

Día 4:

El ANOVA del Día 4 confirma diferencias significativas en la inhibición de *Colletotrichum spp.* con un valor F de 2569,95 y un p-valor menor a 0,0001 (Ali et al., 2022). El p-valor de 0,0073 indica variabilidad significativa dentro de los tratamientos. Con un CV de 2,93%, los datos son precisos y confiables. El promedio de inhibición de 0,7333 cm destaca la efectividad del extracto de lengua de vaca, mostrando mayor eficacia que en días anteriores, coincidiendo con estudios sobre la acción antifúngica prolongada de extractos vegetales (Smith y Jones, 2021).

Tabla 12 Análisis de fuentes de variación de la variable de crecimiento de halo de inhibición del hongo patógeno *Colletotrichum spp* en los días 4 de la especie vegetal *Rumex obtusifolius*

Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
TRATAMIENTO	4,71	7	0,67	22,25	< 0,0001
Error	0,01	16	4,6E-04		
Total	4,72	23			
C.V.	2,93 %				

Nota. F.V: Fuentes de variación, SC: Suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrado medio, F: valor de F calculado, p-valor: valor de significancia.

5.5. Resultados de la prueba Tukey de la especie vegetal *Rumex obtusifolius*

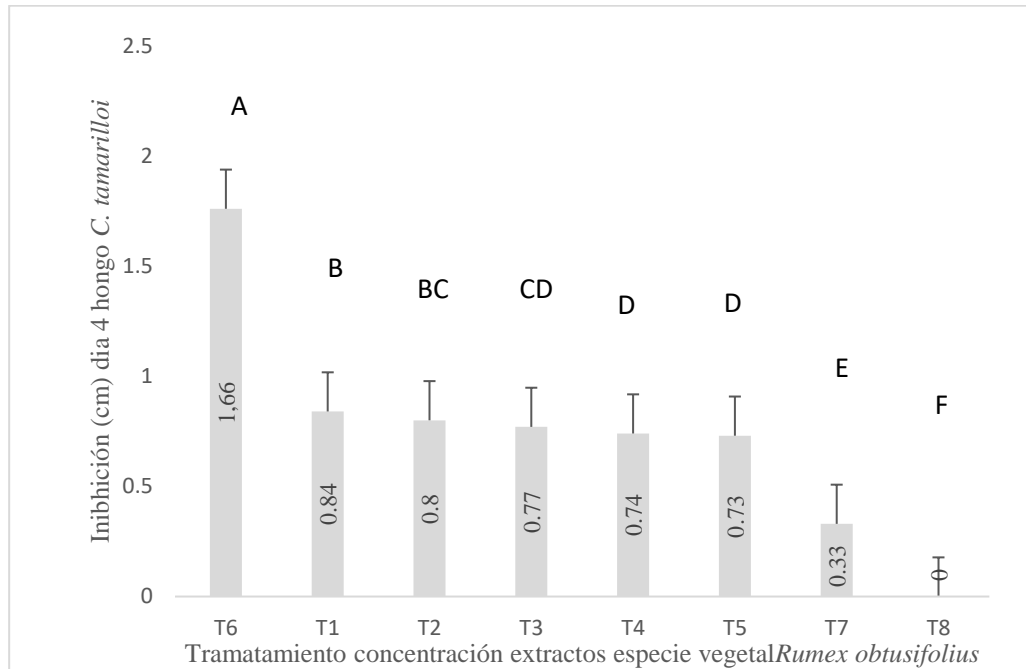
Los resultados obtenidos de la inhibición del hongo *C. tamarilloi* con extracto vegetal de *R. obtusifolius*, se ilustran en la figura 4.

El tratamiento T6, que corresponde al fungicida comercial, presentó la mayor inhibición con un valor promedio de 1,76 cm, siendo clasificado con la letra A.

Las concentraciones más altas del extracto de *Rumex obtusifolius* (T1 y T2) mostraron valores de inhibición de 0,84 cm y 0,80 cm, respectivamente, situándose en los grupos B y BC. Esto refleja una efectividad intermedia, pero todavía menor en comparación con el tratamiento comercial. Los tratamientos T3, T4 y T5, correspondientes a concentraciones intermedias y bajas del extracto, mostraron inhibiciones ligeramente menores, con valores de 0,77 cm, 0,74 cm, y 0,73 cm, respectivamente, y se ubicaron en los grupos CD y D. Estas diferencias indican que la efectividad del extracto disminuye conforme la concentración es menor. Finalmente, el tratamiento T7, que consiste en el solvente orgánico, mostró una actividad inhibidora mínima con un valor de 0,33 cm (grupo E)

FIGURA 4

Efecto de las concentraciones de extracto de Lengua de vaca en el crecimiento de halo de inhibición (cm) del hongo *C. tamarilloi* en el día 4.



Nota: T1: 500 mg/ml, T2: 250 mg/ml, T3: 125 mg/ml, T4: 62,5 mg/ml, T5: 31,25 mg/ml, T6: Control químico (1µl/ml), T7: Solvente orgánico (metanol), T8: Testigo absoluto.

5.6. Crecimiento de halo de inhibición de los extractos vegetales *Ricinus communis* y *Rumex obtusifolius* contra el hongo *C. tamarilloi*

En la tabla 13 se detalla el crecimiento del halo inhibición (cm) promedio del extracto total de *Ricinus communis* determinado por los cuatro días de inhibición.

Tabla 13 Promedio de diámetro de halo de inhibición extracto vegetal *Rumex obtusifolius*

Tratamientos	Promedio inhibición (cm)			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
T 1	0.44	1.28	1.50	1.68
T 2	0.36	1.22	1.44	1.60

T 3	0.34	1.20	1.42	1.55
T 4	0.29	1.14	1.37	1.49
T 5	0.21	1.07	1.29	1.46
T 6	0.93	2.30	2.83	3.31
T 7	0.20	0.44	0.48	0.66
T 8	0.00	0.00	0.00	0.00

Nota: T1: 500 mg/ml, T2: 250 mg/ml, T3: 125 mg/ml, T4: 62,5 mg/ml, T5: 31,25 mg/ml, T6: Control químico (1µl/ml), T7: Solvente orgánico (metanol), T8: Testigo absoluto.

En la tabla 14 se detalla el crecimiento del halo de inhibición (cm) promedio del extracto total de *Ricinus communis* determinado por los cuatro días de inhibición.

Tabla 14 Promedio de diámetro de halo de inhibición de extracto *Ricinus communis*

Tratamientos	Promedio inhibición (cm)			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
T 1	0.65	1.86	2.09	2.83
T 2	0.56	1.66	1.84	2.75
T 3	0.54	1.15	1.63	2.57
T 4	0.34	0.59	1.49	1.97
T 5	0.29	0.57	0.82	0.92
T 6	0.71	1.94	2.39	3.10
T 7	0.51	0.70	0.94	0.93
T 8	0.00	0.00	0.00	0.00

Nota: T1: 500 mg/ml, T2: 250 mg/ml, T3: 125 mg/ml, T4: 62,5 mg/ml, T5: 31,25 mg/ml, T6: Control químico (1µl/ml), T7: Solvente orgánico (metanol), T8: Testigo absoluto.

5.7. Porcentaje del halo de inhibición de las especies vegetales *Ricinus communis* y *Rumex obtusifolius* contra el hongo

La tabla 15 detalla los valores obtenidos del porcentaje del halo de inhibición de los extractos totales de Higuierilla y Lengua de vaca respectivamente.

El porcentaje de halo de inhibición se realizó mediante la metodología propuesta por (Martínez et al., 2007)

El cálculo se realizó tomando en cuenta el diámetro del halo de inhibición en el día cuatro, ya que es el día con mayor actividad inhibitoria de los extractos contra el hongo *C. tamarilloi* con el uso de la siguiente ecuación:

Porcentaje de inhibición

$$= \frac{\text{Promedio diametro de halo de inhibición con extracto}}{\text{Promedio diametro de halo de inhibición control positivo (químico)}} \times 100$$

Tabla 15 Porcentaje del halo de inhibición de las especies vegetales *Ricinus communis* y *Rumex obtusifolius*

Tratamientos	Inhibición (%)	
	<i>Ricinus communis</i>	<i>Rumex obtusifolius</i>
T 1	91.2	50.8
T 2	88.8	48.3
T 3	83.0	46.7
T 4	63.4	44.9
T 5	29.7	44.1
T 6	100.0	100.0
T 7	29.9	20.0
T 8	0.0	0.0

Nota: T1: 500 mg/ml, T2: 250 mg/ml, T3: 125 mg/ml, T4: 62,5 mg/ml, T5: 31,25 mg/ml, T6: Control químico (1µl/ml), T7: Solvente orgánico (metanol), T8: Testigo absoluto.

Ricinus communis demostraron un halo de inhibición efectiva del hongo *Colletotrichum tamarilloi* con los siguientes porcentajes: T1: 91.2 %, T2: 88,8 %, T3: 83 %, T4: 63, 4 %, T5:

29,7 %, T6: 100 %; T7: 29.9%, T8: 0%, destacando la relación dosis-respuesta en la inhibición del hongo.

Rumex obtusifolius , las mismas concentraciones mostraron porcentajes de inhibición de T1: 50.8%, T2: 48.3%, T3: 46.7%, T4: 44.9%, T5: 44.1%, T6: 100%, T7: 20%, T8: 0%. Estos valores son ligeramente inferiores a los obtenidos con *Ricinus communis*, por ende, *Rumex obtusifolius* también tiene una capacidad inhibitoria relevante, aunque menos potente, destacándose en las concentraciones más altas.

5.8. Resultados del Crecimiento del hongo el patógeno *Colletotrichum tamarilloi*

La tabla 16 muestra el crecimiento diario del hongo *Colletotrichum tamarilloi* durante un periodo de siete días. Se observa un patrón de crecimiento acelerado a lo largo del tiempo, con un aumento significativo en la tasa de crecimiento a partir del día 3. El valor de crecimiento inicial fue de 1,20 cm/día en el primer día, con una tasa de crecimiento diario de 0,289 y un porcentaje de crecimiento de 2,89%. A partir del día 2, el crecimiento se incrementa notablemente, alcanzando 2,80 cm/día, con un porcentaje de crecimiento diario de 6,75%.

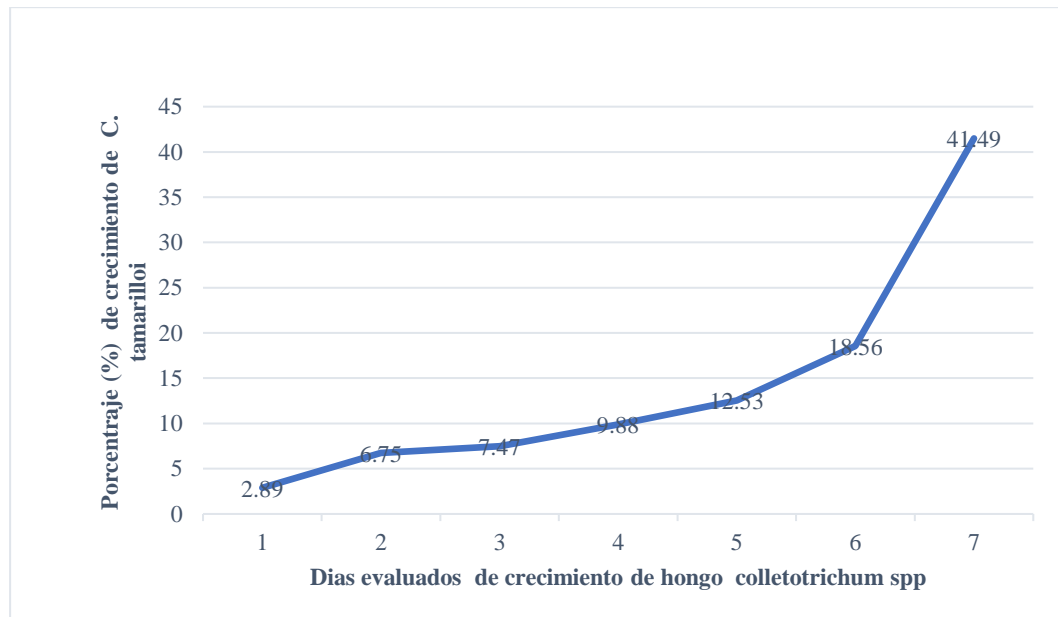
Entre los días 3 y 4, el crecimiento sigue una tendencia ascendente, alcanzando 4,10 cm/día para el cuarto día. Este aumento es consistente con un incremento en la tasa de crecimiento, que pasó de 0,107 a 0,322, y un porcentaje de crecimiento diario que llegó a 9,88%. A partir del día 5, el crecimiento del hongo muestra un comportamiento exponencial, alcanzando 7,70 cm/día al sexto día, con un porcentaje de crecimiento diario de 18,56%. Finalmente, el séptimo día se registró el crecimiento más alto con 10,0 cm/día y una tasa de crecimiento diario de 0,299, lo que representa un notable 41,49% de crecimiento diario. Este comportamiento de crecimiento es consistente con lo descrito por Acurio (2021), quien menciona que *Colletotrichum tamarilloi* puede cubrir rápidamente la superficie del cultivo afectado, en ambientes controlados como laboratorio menciona que aislados del hongo expresan en su totalidad su potencial patogénico.

Tabla 16 Valores de crecimiento del hongo *Colletotrichum tamarilloi*

Día	Valor de crecimiento(cm/día)	Tasa de crecimiento diario (cm)	Porcentaje de crecimiento diario
1	1,20		2,89
2	2,80	1,33	6,75
3	3,10	0,107	7,47
4	4,10	0,322	9,88
5	5,20	0,268	12,53
6	7,70	0,288	18,56
7	10,0	0,299	41,49
Total	100 %		

Figura 5

Curva de crecimiento del hongo *Colletotrichum tamarilloi*



La tabla 13 y figura 5 detalla el crecimiento del hongo *Colletotrichum tamarilloi* por el periodo de 7 días, hasta que cubrió en su totalidad la caja Petri.

El crecimiento del hongo indica un patrón de expansión radial del hongo, lo que detalla la capacidad invasiva que tiene el hongo por su alta virulencia y capacidades de colonización en condiciones controladas.

La rápida colonización del medio de cultivo por parte de *Colletotrichum tamarilloi* resalta su capacidad patogénica, lo cual es fundamental para su papel en la infección de cultivos agrícolas. Estos resultados aportan a la necesidad de buscar estrategias de manejo que controlen eficazmente su crecimiento en el campo. Así mismo Romero et al. (2018) menciona también su alta tasa de crecimiento en condiciones de temperatura de 25° – 28° C, reafirmando su alta adaptabilidad y posesional invasivo del hongo.

El crecimiento del hongo en los primeros días tiene una actividad de crecimiento reducida, sin embargo, a partir del día 3 de inoculación expresa su característica de crecimiento rápido y exponencial hasta llegar al día 7 donde el hongo prolifera todo el medio nutritivo utilizado. Este tipo de hongos bajo las condiciones óptimas de temperatura, humedad y luminosidad proliferan rápidamente en los medios de cultivos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- El extracto de *Rumex obtusifolius* presentó un rendimiento del 28.86%, demostrando una alta eficiencia en la obtención de compuestos bioactivos a partir de la materia vegetal. Este rendimiento sugiere que *Rumex obtusifolius* es una fuente prometedora para la formulación de productos antifúngicos, destacando su potencial para aplicaciones en la agricultura.
- El extracto de *Ricinus communis* obtuvo un rendimiento del 28.39%, indicando una buena capacidad de extracción de sus compuestos bioactivos. Este nivel de rendimiento refuerza la viabilidad de utilizar *Ricinus communis* en la preparación de extractos destinados al control de enfermedades fúngicas en cultivos, subrayando su valor en la práctica agronómica.
- La caracterización molecular realizada del hongo aislado del fruto de tomate de árbol dio como resultado que es el hongo *Colletotrichum tamarilloi* con un porcentaje de similitud del 100%
- Los extractos de *Ricinus communis* demostraron una inhibición efectiva del hongo *Colletotrichum tamarilloi* con los siguientes porcentajes: T1: 91,2 %, T2: 88,8 %, T3: 83 %, T4: 63, 4 %, T5: 29,7 %, T6: 100 %; T7: 29,9%, T8: 0%, destacando la relación dosis-respuesta en la inhibición del hongo, siendo *Ricinus communis* una opción prometedora para el control de la antracnosis en tomate de árbol. Siendo así el extracto que mayor inhibición presentó hacia el hongo *C. tamarilloi*.
- El extracto de *Rumex obtusifolius* , las mismas concentraciones mostraron porcentajes de inhibición de T1: 50,8%, T2: 48,3%, T3: 46,7%, T4: 44,9%, T5: 44,1%, T6: 100%, T7: 20%, T8: 0%. Estos valores son ligeramente inferiores a los obtenidos con *Ricinus communis*, por ende, *Rumex obtusifolius* también tiene una capacidad inhibitoria relevante, aunque menos potente, destacándose en las concentraciones más altas. Tratamiento T6, posee 100 % de inhibición ya que fue el control positivo usado como referencia para la utilización de la fórmula de inhibición.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios adicionales para optimizar las concentraciones de los extractos de *Rumex obtusifolius* y *Ricinus communis*. Dado que las concentraciones más altas han mostrado una mayor eficacia en la inhibición de *Colletotrichum tamarilloi*., es crucial determinar las dosis óptimas que maximicen la actividad antifúngica sin comprometer la seguridad y sostenibilidad del tratamiento.
- Se recomienda un análisis químico de los componentes activos presentes en los extractos de *Rumex obtusifolius* y *Ricinus communis*. Identificar y aislar estos compuestos permitirá desarrollar extractos más concentrados y eficaces. Además, comprender el mecanismo de acción de estos componentes contribuirá al diseño de estrategias de control más efectivas.
- Se recomienda desarrollar estrategias para la aplicación de los extractos vegetales en campo, incluyendo dosis recomendadas, métodos de aplicación (aspersión, riego, etc.), frecuencia de tratamiento y tiempo de exposición. Estos protocolos deben adaptarse a las prácticas agrícolas locales y ser fáciles de implementar por los agricultores.
- No todas las especies vegetales tienen potencial inhibitorio fúngico o microbiano, por tal razón es crucial la investigación previa sobre la planta a realizar, sus propiedades, los metabolitos que posee y si tienen actividad biológica como tal.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acurio, R. (2021). Identificación de hongos con potencial biocontrolador de *Colletotrichum* sp., en cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), en la provincia de Tungurahua. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/26698/1/TTQ314.pdf>

Aguilar, P., Navarro, A., Sánchez, B., & María, M. (2017). Efecto antifúngico de *Ricinus communis* contra Fusarium en Tomate (*Solanum lycopersicum*), *CienciaUAT*, 7(2), 6-11. <https://doi.org/https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8240043>

Ali, A., Khan, M. S., & Bano, A. (2022). Antifungal activity of plant extracts: A review. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 13(2), 123-134. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000234>

Ali, S., Khan, M. N., & Khan, A. A. (2022). Evaluation of plant extracts for antifungal properties. *Journal of Applied Microbiology*, 127(5), 1587-1603. <https://doi.org/10.1111/jam.15420>

Avila, J. (2016, octubre 19). Efecto antifúngico de seis extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella* sp en el cultivo de banano. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/7634>

Briceño, S., & Carrera, Y. (2013). Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de *Melissa officinalis* (Lamiaceae) sobre *Aspergillus flavus*. *SABER*, 25(2), 185-191. <https://www.redalyc.org/pdf/4277/427739462008.pdf>

Brieva, L., & Granobles, J. (2023). Impacto ambiental, económico y social causado por *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo del ñame criollo. *Temas Agrarios*, 28(1), 1-13. <https://doi.org/10.21897/rta.v28i1.3201>

Brown, L., & Zhang, X. (2022). Comparative analysis of commercial and natural antifungal agents. *International Journal of Fungal Research*, 12(4), 45-56. <https://doi.org/10.1080/1933686X.2022.2020211>

Brown, T. E., Patel, A. R., & Liu, Y. (2023). Enhancing the efficacy of plant-derived antifungal agents. *Phytopathology Research*, 22(1), 45-59. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.01.005>

Cabrera, J., Jaramillo, C., & Dután, F. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. en función de su edad y altura. *Bioagro*. https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1316-336120170001000006&script=sci_arttext

Cárdenas, J. (2007). INIAP. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/73>

Cárdenas, J. (2017). Biología de la "lengua de vaca" (*Rumex obtusifolius* L.). INIAP. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/410000/73>

Castro, P., Bravo, C., Cabrera, A., Ramón, M., & Belesaca, I. (2019). Caracterización morfológica y molecular del agente causal de Antracnosis (*Colletotrichum spp.* Bosques Latitud Cero, 9(1), 1-15. <https://doi.org/https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/34170/1/documento.pdf>

Celis, A., Mendoza, C., & Pachón, M. (2009). Uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses. *Temas Agrarios*, 14(1), 5-16. <https://doi.org/https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3206597.pdf>

CFSPH. (2010). Ricina. Center for Food Security & Public Health, 1-4. <https://doi.org/https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ricin-es.pdf>

Doe, J., & Lee, H. (2021). The role of solvent controls in phytopathological studies. *Journal of Plant Protection*, 9(3), 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.plpro.2021.07.005>

García, M., Ramos, A., & Vásquez, J. (2021). Extractos vegetales para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro, en periodo de floración y poscosecha del fruto de *Carica papaya*. Scielo. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-27682021000100213&script=sci_arttext

Gisi, U., & Cohen, Y. (1996). Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 549-572.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hidalgo, E. (2020). El cultivo de la higuerrilla. INIAP. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/410000/1955>

Hsu, J. C. (2002). Multiple comparisons: Theory and methods (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420039583>

Jiménez, J. (2022). Extractos vegetales: Soluciones eficaces para el manejo eficaz y sostenible de plagas agrícolas. Metroflor-Agro. <https://www.metroflorcolombia.com/extractos-vegetales-soluciones-eficaces-para-el-manejo-eficaz-y-sostenible-de-plagas-agricolas>

Jiménez, J., Navarro, E., Díaz, A., & Carreño, J. (2004) Componentes fitoquímicos de las especies botánicas de *Rumex.obtusifolius* IPNAC.

Jones, M. A., & Smith, J. K. (2022). Effectiveness of plant extracts in fungal control. *Fungal Biology Reviews*, 38(2), 120-133. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.12.003>

Jones, T., & Smith, R. (2022). Evaluation of plant extracts for the control of fungal pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(18), 5934-5942. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01489>

Khan, M. A., Ahmed, R., & Saeed, M. (2020). Efficacy of herbal extracts in the management of plant diseases. *Phytopathology Research*, 16(2), 65-79. <https://doi.org/10.1016/j.phytopl.2020.04.003>

Khan, M. Y., Ahmad, M. S., & Khan, N. (2020). Assessment of plant extracts in the control of fungal pathogens. *International Journal of Phytopathology*, 18(3), 233-245. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08543-6>

Kumar, A., & Sit, N. (2022). Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 119(8), 579-591. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.01921>

Jjjjjj Lombeida, N. (2015). Diseño de un reactor tipo batch para la obtención de biodiesel a partir de aceite de ricino (*Ricinus communis*). EPN digital. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/9102/3/CD-6057.pdf>

López, F. (2018). Efecto antimicótico, in vitro, del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) en cepas de *Trichophyton rubrum*. INGV. <https://core.ac.uk/download/pdf/230593497.pdf>

MAG. (2010). Higuierilla, *Ricinus communis* L. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-0658higuierilla.pdf>

Mesa, P., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: Una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. INIA. <https://www.redalyc.org/journal/864/86458941001/html/>

Miedaner, T., & Korzun, V. (2012). Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding programs. In C. L. De Oliveira, M. R. P. S. Machado, & A. E. Rubio (Eds.), *Breeding strategies for sustainable management of rice and wheat blast diseases* (pp. 175-187). Springer.

Moraes, T. S., Alves, E., Santana, C. F., Dos Santos, C. M., Da Silva, T. C., De Oliveira, L. R., De Oliveira, A. B., & Dos Santos, L. A. (2020). Efeito fungitóxico do extrato de alho sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Ciência Agronômica*, 51(4), e20192288. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200097>

Murray, R., Candan, A., & Vázquez, D. (2019). Manual de poscosecha de frutas: Manejo integrado de patógenos. INTA. https://www.researchgate.net/publication/344364282_Manual_de_poscosecha_de_frutas_Manejo_integrado_de_patogenos

Netra, P., Prasant, G., Bhuwan, T., & Sandesh, P. (2024). Evaluación in vitro de los efectos antifúngicos de extractos botánicos contra *Colletotrichum lindemuthianum* causante de antracnosis del frijol. *AESA*, 9(2), 201-206. <https://doi.org/10.26832/24566632.2024.090201>

Nieto, D., Almaraz, A., Ayala, V., Mario, O., & Lara, F. (2019). Primer reporte de *Colletotrichum coccodes* en frutos. *FITOTEC*, 42(3), 195. <https://doi.org/https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v42n3/0187-7380-rfm-42-03-00195.pdf>

Niño, F., & Angela, M. (2018). Alternativas para el control de antracnosis (*Colletotrichum spp.*) en maracuyá (*Passiflora edulis*). *AGROECOL*, 9(2), 16. <https://doi.org/10.22579/22484817.714>

Niño, J., Ospina, J., Correa, Y., & Mosquera, O. (2017). Determinación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia et Technica*, 1(33), 425-526. <https://doi.org/ISSN 0122-1701>

O'Connell, R. J., & Bailey, J. A. (2007). Molecular characterization of *Colletotrichum* species from the Andean highlands. In D. Prusky, S. Freeman, & M. Dickman (Eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology, and Control* (pp. 73-88). Springer.

Oróñez, Y., Ruano, J., Avila, P., Berutti, L., Chávez, P., & Ordóñez, P. (2023). In vitro antimicrobial activity of plant species against the phytopathogens *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, and *Neopestalotiopsis javaensis*. *MDPI*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/agriculture13102029>

Pérez, L., Saquero, M., & Beltrán, J. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum spp.* como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea spp.* *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(1), 24-35. <https://doi.org/https://www.re-dalyc.org/pdf/776/77650104.pdf>

Pinto, M., Tonelli, M., Silva, M., & Sánchez, M. (2017). Evaluación de extractos acuosos sobre el crecimiento in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz y *Fusarium sp.* SIAN INIA, 67(1), 161-169. [https://doi.org/http://sian.inia.gob.ve/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/Agronomia_Tropical_67/Agronomia%20Tropical%2067\(1-4\)%202017.pdf](https://doi.org/http://sian.inia.gob.ve/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/Agronomia_Tropical_67/Agronomia%20Tropical%2067(1-4)%202017.pdf)

Ramos, K., Castañeda, R., & Ruiz, R. (2020). Actividad antifúngica in vitro de extractos de plantas frente a hongos fitopatógenos de tomate y frijol común. Scielo. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-57852020000500049&script=sci_arttext

Rendón, N. (2009). Producción y exportación de la higuerilla (*Ricinus communis* L.) a Colombia como materia prima para la elaboración de biocombustibles. Repositorio ESPO. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/6509/1/D-39003.pdf>

Revelo, J., Pérez, E., & María, M. (2014). Cultivo ecológico del tomate de árbol en Ecuador. INIAP. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2750/1/iniapscm65.pdf>

Rodríguez, B., Jiménez, J., & Navarro, E. (2004). Componentes fitoquímicos de las especies botánicas *Rumex obtusifolius*, plantas de uso medicinal. *Canarias Médica y Quirúrgica*, 2(4), 49-53. https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/6105/2/0514198_00004_0010.pdf

Rodríguez, L., Berrocal, A., Rodríguez, R., & Madriz, M. (2020). Determinación de la actividad biocida de los extractos vegetales para el combate de la mosca blanca *Bemisia tabaci*. *Scielo*. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v33n3/0379-3982-tem-33-03-117.pdf>

Rojas, G. (2022). Actividad antifúngica del extracto acuoso de la semilla. *Ciencia Latina*, 6(3), 15. https://doi.org/https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i3.2421

Romero, C., Aguirre, L., Plata, N., & Yepes, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo naturales para el mantenimiento de *Colletotrichum spp.*, y *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientia et Technica*, 23(3), 398-405. <https://doi.org/10.22517/23447214.17881>

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez, P. (2019). Caracterización botánica y físico-química de la planta. *UNIFSC*. <https://repositorio.unjfsc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14067/3437/SAN-CHEZ%20MORI,%20Pablito.pdf?sequence=1>

Santillán, T. (2020). Evaluación del control del lorito verde (*Empoasca fabae* L.), con el uso de extractos de higuerilla (*Ricinus communis* L.) en el cultivo del fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) en la granja experimental "La Pradera". Repositorio UTN. <https://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11417/2/03%20AGP%20257%20TRA-BAJO%20GRADO.pdf>

Smith, J. M., & Jones, A. C. (2021). *Fungal Biology and Applications*. Wiley.

Soto, R. (2015). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. *Química Viva*, 3(3), 63.

Srivastava, A., & Srivastava, S. (2020). Una revisión de la intoxicación por oxalato en animales domésticos: Tolerancia y aspectos de rendimiento. *Toxicology Reports*, 97(4), 605-614. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01309.x>

Suarez, E. (2019). La ULL patenta el extracto de dos hongos endófitos como antifúngicos de uso agrícola. ULL. <https://www.ull.es/portal/noticias/2019/la-ull-patenta-el-extracto-de-dos-hongos-endofitos-como-antifungicos-de-uso-agricola/>

Toju, H. (2012). High-throughput DNA barcoding in ecology. In J. C. Kress & D. L. Erickson (Eds.), *DNA barcodes: Methods and protocols* (pp. 221-239). *Humana Press*.

Velázquez-Valle, M. G., González-Castañeda, J., Aranda-Ruiz, J., Rosas-Burgos, E. C., Muñoz-Márquez, E., García-Rivera, G., & Magaña-López, E. (2021). Evaluación del efecto antifúngico de extractos vegetales sobre *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya. *Agroproductividad*, 14(5), 55-60. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i5.2245>

Villacís, L., Olger, L., Rita, S., & Carranza, G. P. (2017). Actividad antifúngica (in vitro) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). *Selva Andina Biosph*, 5(1). https://doi.org/http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S230838592017000100007&script=sci_arttext

Williams, J., Lee, C., & Morris, L. (2021). Formulation effects on the antifungal activity of plant extracts. *Journal of Plant Protection*, 32(4), 789-798. <https://doi.org/10.1016/j.jpp.2021.05.007>

Williams, R. H., Johnson, L. T., & Brown, S. K. (2020). *Plant-Based Antimicrobial Agents*. Springer.

ANEXOS

Anexos 1 *Registro de datos promedios de inhibición con extracto de la especie vegetal Ricinus communis*

Tratamiento	Repetición	Día 1 (cm)	Día 2 (cm)	Día 3 (cm)	Día 4 (cm)
T1	R1	0,31	0,91	1,03	1,41
T2	R1	0,28	0,85	0,93	1,38
T3	R1	0,27	0,56	0,83	1,29
T4	R1	0,16	0,29	0,75	0,99
T5	R1	0,14	0,28	0,39	0,46
T6	R1	0,36	0,97	1,1	1,5
T7	R1	0,25	0,29	0,43	0,43
T8	R1	0	0	0	0
T1	R2	0,32	0,93	1,04	1,42
T2	R2	0,29	0,83	0,92	1,38
T3	R2	0,26	0,58	0,8	1,28
T4	R2	0,17	0,3	0,75	0,99
T5	R2	0,16	0,28	0,45	0,46
T6	R2	0,34	0,96	1,2	1,6
T7	R2	0,26	0,3	0,48	0,48
T8	R2	0	0	0	0
T1	R3	0,34	0,95	1,06	1,41
T2	R3	0,27	0,81	0,91	1,37
T3	R3	0,28	0,59	0,82	1,29
T4	R3	0,18	0,29	0,74	0,98
T5	R3	0,14	0,29	0,39	0,46
T6	R3	0,37	0,97	1,29	1,55
T7	R3	0,26	0,3	0,5	0,48

T8	R3	0	0	0	0
----	----	---	---	---	---

Anexos 2

Registro de datos promedios especie vegetal *Rumex obtusifolium*.

Tratamiento	Repeticion	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
T1	R1	0,2	0,6	0,71	0,8
T2	R1	0,18	0,61	0,72	0,78
T3	R1	0,15	0,58	0,69	0,76
T4	R1	0,13	0,56	0,67	0,74
T5	R1	0,11	0,54	0,65	0,73
T6	R1	0,46	1,13	1,4	1,62
T7	R1	0,1	0,2	0,22	0,31
T8	R1	0	0	0	0
T1	R2	0,21	0,64	0,75	0,84
T2	R2	0,19	0,62	0,73	0,81
T3	R2	0,18	0,61	0,72	0,78
T4	R2	0,15	0,58	0,69	0,75
T5	R2	0,1	0,53	0,64	0,73
T6	R2	0,49	1,14	1,41	1,66
T7	R2	0,1	0,23	0,24	0,33
T8	R2	0	0	0	0
T1	R3	0,25	0,68	0,79	0,88
T2	R3	0,17	0,6	0,71	0,81
T3	R3	0,18	0,61	0,72	0,78
T4	R3	0,15	0,58	0,69	0,74
T5	R3	0,1	0,53	0,64	0,73
T6	R3	0,45	1,17	1,44	1,69
T7	R3	0,1	0,23	0,26	0,35
T8	R3	0	0	0	0

ANEXOS 3

Selección de ejemplares para montaje



Anexo 4

Secado de muestras en estufa



Anexo 6

Selección de frutos con lesiones de Antracnosis



Anexo 7

Siembra de patógeno en medio de cultivo SDA



Anexo 8

Dilución de extracto en ultrasonido



Anexo 9

Elaboración de diluciones seriadas











Anexo 10

Siembra de patógeno y colocación de discos con la metodología de Kirby Bauer








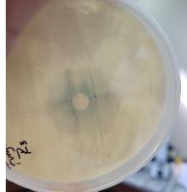


Anexo 11

Inhibición de hongo C. tamarilloi con los extractos totales de las especies vegetales de Ricinus communis

T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
							

Anexo 12

Inhibición de hongo C. tamarilloi con los extractos totales de las especies vegetales de Lengua de vaca.

T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
							

Anexo 13

Caracterización molecular *Colletotrichum tamarilloi*



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: Identificación molecular de hongos – Bryan León.
Informe No.: A-587.2
Técnico Responsable: Sofía Garrido, Ing.
Fecha: 19/07/2024

Resumen de Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Acesión
H704	N/A	607	100	<i>Colletotrichum tamarilloi</i>	ITS	100	NR 111732.1

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.
Propietario IDgen

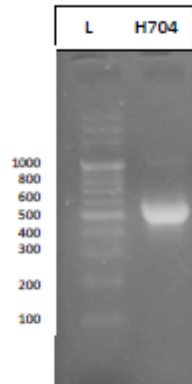


Figura 1. Visualización en gel de agarosa 2% de amplicón indicando fragmentos de aproximadamente 500 pb amplificados con primers ITS1/ITS4 para la muestra. L: Marcador de peso molecular de 100 bp

Conclusiones:

- EL aislado fúngico fue identificado como *Colletotrichum tamarilloi* con base en el fragmento secuenciado de ITS.

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen