



**Pontificia Universidad Católica del  
Ecuador Sede Ibarra**

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES**

**INFORME FINAL DEL PROYECTO**

**TEMA:**

“Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de extractos totales de dos especies vegetales como Ortiga y Hierba Mora contra el hongo *Colletotrichum spp.* aislado de tomate de árbol.”

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**INGENIERA AGROPECUARIA**

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

**SUBLINEA:**

**AUTOR:** ANDREA ESTEFANIA ERAZO POZO

**ASESOR:** Dra. YADIRA FERNANDA ORDOÑEZ VIVANCO PhD

Ibarra, 14 agosto de 2024

Ibarra, 14 agosto de 2024

PhD. Yadira Ordoñez

ASESORA

**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).....  


Ph.D. 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. Yadir Fernanda Ordóñez Vivanco

C.C.: 1103764864



(f).....

Ph.D. Diego Manuel León Tapia

C.C.: 1711668895



(f).....

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.:100265839

## ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo ANDREA ESTEFANIA ERAZO POZO, 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

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and curves, with the name 'Andrea Estefania Erazo Pozo' written in a cursive script below it.

f):.....

ANDREA ESTEFANIA ERAZO POZO

C.C.: 0401862669

## AUTORÍA

Yo, ANDREA ESTEFANIA ERAZO POZO, portadora de la cédula de ciudadanía N°0401862669, 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, consisting of several overlapping loops and a horizontal line, with the name 'Andrea Estefania Erazo Pozo' written underneath.

f): .....

ANDREA ESTEFANIA ERAZO POZO

C.C.: 0401862669

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo. ANDREA ESTEFANIA ERAZO POZO, con C.C.: 0401862669, autor del trabajo de grado intitulado: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO DE EXTRACTOS TOTALES DE DOS ESPECIES VEGETALES COMO ORTIGA Y HIERBA MORA CONTRA EL HONGO *Colletotrichum spp.* AISLADO DE TOMATE DE ÁRBOL.”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniería Agropecuaria, 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):.....

ANDREA ESTEFANIA ERAZO POZO

C.C.: 0401862669

**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 ANTIFÚGICA IN VITRO DE EXTRACTOS TOTALES DE DOS ESPECIES VEGETALES COMO ORTIGA Y HIERBA MORA CONTRA EL HONGO *Colletotrichum spp.* AISLADO DE TOMATE DE ÁRBOL.”, 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):.....



Andrea Estefanía Erazo Pozo  
Estudiante que ejecuta el trabajo de Titulación  
C.C/ Pasaporte: 0401862669  
Carrera: Ingeniería Agropecuaria

Ibarra, 02 de julio de 2024

## **DEDICATORIA**

Esta meta va dedicada a todas las personas que han sido fundamentales en este importante camino hacia mi titulación.

A mis queridos padres, gracias por su sabiduría, sacrificio, cada palabra de aliento y cariño incondicional. Ustedes han sido mi guía y mi apoyo constante, brindándome la fuerza y motivación necesarias para alcanzar este logro.

A mi hermano, por su compañía, lealtad y por ser siempre una fuente de inspiración. A mis sobrinos, cuya alegría y energía han sido una luz constante en mi vida.

Cada uno de ustedes ocupa un lugar especial en mi corazón, gracias por estar a mi lado, comprenderme y creer en mí incluso en los momentos en que yo no lo hacía, estoy eternamente agradecida por tenerlos en mi vida. Este logro es tanto mío como suyo.

Andrea

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por darme la fortaleza, la sabiduría y las oportunidades necesarias para completar este trabajo de titulación. Su guía ha sido una luz constante en mi camino y me ha dado la perseverancia para superar cada desafío.

A mis profesores de carrera, quienes con su dedicación y conocimiento me han brindado las herramientas necesarias para crecer académica y personalmente. Cada lección impartida y cada consejo dado han sido fundamentales en mi formación.

De manera especial, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi asesora de tesis, PhD. Yadira Ordóñez. Su apoyo incondicional, su paciencia y su invaluable guía han sido esenciales para la realización de este trabajo. Sus enseñanzas y su compromiso han dejado una huella imborrable en mi desarrollo académico y profesional. Gracias por creer en mí y por motivarme a dar siempre lo mejor de mí.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

Andrea

## ÍNDICE

PORTADA	1
CERTIFICA:	2
PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	3
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS	4
AUTORÍA	5
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	6
DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN	7
DEDICATORIA	8
AGRADECIMIENTO	9
ÍNDICE DE TABLAS	15
RESUMEN	19
ABSTRACT	20
CAPÍTULO I	21
INTRODUCCIÓN	21
CAPÍTULO II	23
OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo general	23
2.2 Objetivos específicos	23

2.3 Hipótesis	23
CAPÍTULO III	24
ESTADO DEL ARTE	24
3.1 Extractos vegetales	24
3.2 Propiedades de los Extractos vegetales	24
3.2.1 Flavonoides	24
3.2.2 Solaninas	25
3.2.3 Taninos	25
3.2.4 Saponinas	25
3.2.5 Compuestos Fenólicos	25
3.3 Métodos de obtención de extractos naturales	25
3.3.1 Extracción por medio de agua	26
3.3.2 Extracción por medio de solventes orgánicos	26
3.3.3 Digestión	26
3.3.4 Maceración	26
3.3.5 Percolación	26
3.3.6 Extracción con fluidos supercríticos	26
3.3.7 Infusión y Decocción	27
3.3.8 Extracción Soxhlet	27
3.4 Especies vegetales en estudio	27
3.4.1 Ortiga 28	
3.4.2 Actividad biológica de la especie en estudio	28
3.4.3 Toxicidad	28
3.4.4 Hierba Mora 30	
3.4.5 Actividad biológica de la especie en estudio	30

3.4.6	Toxicidad	30
3.5	32	
3.5.1	Propagación de	33
3.5.2	Sintomatología	33
3.5.3	Morfología	34
3.6	Evaluación de la eficacia de extractos vegetales contra el hongo	36
3.6.1	Extractos Vegetales	35
3.6.2	Hongo	36
3.7	Impacto ambiental y económico del uso de extractos vegetales	35
3.7.1	Impacto Ambiental	35
3.7.2	Impacto Económico	36
3.8	Tomate de árbol	36
3.8.1	Origen	36
3.8.2	Importancia del cultivo de Tomate de árbol	38
CAPÍTULO IV		39
4.1	Materiales	39
4.1.1	Equipos de laboratorio	39
4.1.2	Materiales de laboratorio	39
4.1.3	Reactivos	39
4.2	Métodos	40
4.2.1	Recolección de la especie vegetal	40
4.2.2	Recolección e identificación taxonómica de las especies vegetales	40
4.2.3	Obtención del extracto total	42
4.3	Aislamiento del hongo	44
4.3.1	Caracterización molecular del hongo	45

4.3.2	Preparación y ajuste de la concentración de esporas de	46
4.4	Diseño experimental	46
4.5	Análisis estadístico	46
4.5.1	Análisis de varianza ANOVA	47
4.5.2	Unidad experimental	47
4.5.3	Tratamientos	48
4.6	Variables	49
4.6.1	Variable/s Independiente/s	49
4.6.2	Variable/s dependiente/s	49
4.7	Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de extractos totales de dos especies vegetales tanto de la familia	51
4.7.1	Determinación del porcentaje del halo de inhibición de actividad fúngica de	51
CAPÍTULO V		52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		52
5.1	Obtención del extracto total de las especies vegetales	52
5.2	Caracterización del hongo	54
5.3	Halo de inhibición de actividad fúngica de	56
5.3.1	Análisis de normalidad y homogeneidad de los datos para el crecimiento del halo de inhibición del hongo patógeno	56
5.3.2	Resultados de análisis de varianza de la especie vegetal Ortiga	58
5.3.3	Resultados de la prueba Tukey de la especie vegetal Ortiga	59
5.4	Resultados de análisis de varianza de la especie vegetal Hierba Mora	60
5.4.1	Resultados de la prueba Tukey de la especie vegetal Hierba Mora	61
5.4.2	Resultados de porcentaje de crecimiento del halo de inhibición de	64

## 5.5 Resultados del Crecimiento del hongo el patógeno 68

CAPÍTULO VI	70
CONCLUSIONES	70
CAPÍTULO VII	71
RECOMENDACIONES	71
CAPÍTULO VIII	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	78

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Clasificación taxonómica de <i>Solanum betaceum</i>	37
<b>Tabla 2</b> Área de colecta de las especies vegetales <i>Solanum nigrum</i> y <i>Urtica dioica</i>	42
<b>Tabla 3</b> Protocolo de Obtención de Extracto Total de las Especies Vegetales	42
<b>Tabla 4</b> Fuentes de análisis de varianza (ANOVA) con grados de Libertad	47
<b>Tabla 5</b> Tratamientos por evaluar en el crecimiento de halo de inhibición del hongo patógeno de las especies vegetales de ortiga ( <i>Urtica dioica</i> ) y hierba mora ( <i>Solanum nigrum</i> )	48
<b>Tabla 6</b> Porcentaje de rendimiento del extracto total de la especie vegetal <i>Urtica dioica</i> L. y <i>Solanum nigrum</i> L.	53
<b>Tabla 7</b> Resultados de la prueba de normalidad y homogeneidad Ortiga	56
<b>Tabla 8</b> Resultados de la prueba de normalidad y homogeneidad Hierba mora	57
<b>Tabla 9</b> Resultados de análisis de varianza en el cuarto día de crecimiento del halo de inhibición con extracto de la especie vegetal Ortiga	58
<b>Tabla 10</b> Resultados de análisis de varianza en el cuarto día de crecimiento del halo de inhibición con extracto de la especie vegetal Hierba mora	61
<b>Tabla 11</b> Promedios de diámetro del halo de inhibición en el cuarto día con extracto vegetal Ortiga	64
<b>Tabla 12</b> Porcentaje de halo de inhibición de especie vegetal Ortiga contra <i>C. tamarilloi</i>	65
<b>Tabla 13</b> Promedios de diámetro del halo de inhibición en el cuarto día con extracto vegetal Hierba mora	65
<b>Tabla 14</b> Porcentaje de halo de inhibición de especie vegetal Hierba mora contra <i>C. tamarilloi</i>	66
<b>Tabla 15</b> Valores crecimiento del hongo patógeno <i>C. tamarilloi</i>	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Mapa de recolección de especies	41
<b>Figura 2</b> Distribución aleatoria de las unidades experimentales	48
<b>Figura 3</b> Visualización en gel de agarosa 2% de ampliación	54
<b>Figura 4</b> Porcentaje de similitud de patógeno	55
<b>Figura 5</b> Efecto de las concentraciones de extracto de Ortiga en el crecimiento del halo de inhibición de <i>C. tamarilloi</i> en el día 4	59
<b>Figura 6</b> Efecto de las concentraciones de extracto de Hierba mora en el crecimiento del halo de inhibición de <i>C. tamarilloi</i> en el día 4	61
<b>Figura 7</b> Curva de crecimiento del hongo <i>C. tamarilloi</i>	68

+

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1</b> Porcentaje de rendimiento	43
<b>Ecuación 2</b> Crecimiento diario del patógeno	50
<b>Ecuación 3</b> Porcentaje de inhibición	51

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Recolección de especies vegetales	78
<b>Anexo 2</b> Selección de ejemplares para montaje	79
<b>Anexo 3</b> Prensado de los ejemplares para montaje	79
<b>Anexo 4</b> Secado de muestras	80
<b>Anexo 5</b> Montaje de muestras	80
<b>Anexo 6</b> Montajes que reposan en el herbario de la PUCE-I	81
<b>Anexo 7</b> Selección de frutos con lesiones de antracnosis	81
<b>Anexo 8</b> Siembra de cultivo de antracnosis en medio SDA	82
<b>Anexo 9</b> Crecimiento micelial en SDA	82
<b>Anexo 10</b> Cultivos puros de <i>C. tamarilloi</i>	83
<b>Anexo 11</b> Muestras maceradas de <i>Solanum nigrum</i> y <i>Urtica dioica</i>	83
<b>Anexo 12</b> Filtrado de las muestras de <i>Solanum nigrum</i> y <i>Urtica dioica</i>	84
<b>Anexo 13</b> Muestra en el rotavapor para evaporación de solvente	84
<b>Anexo 14</b> Elaboración de la concentración máxima de extracto	85
<b>Anexo 15</b> Uso del ultrasonido para una mejor recuperación de extracto	85
<b>Anexo 16</b> Concentraciones de <i>Solanum nigrum</i>	86
<b>Anexo 17</b> Concentraciones de <i>Urtica dioica</i>	86
<b>Anexo 18</b> Siembra de patógeno con metodología de Kirby Bauer	87
<b>Anexo 19</b> Muestras para la evaluación antifúngica in vitro con extracto de <i>Urtica dioica</i> <b>¡Error!</b>	
<b>Marcador no definido.</b>	
<b>Anexo 20</b> Muestras para la evaluación antifúngica in vitro con extracto de <i>Solanum nigrum</i>	88
<b>Anexo 21</b> Muestras de halo de inhibición de <i>C. tamarilloi</i> con extracto de Ortiga	89
<b>Anexo 22</b> Muestras de halo de inhibición de <i>C. tamarilloi</i> con extracto de Hierba mora	89
<b>Anexo 23</b> Caracterización molecular	90
<b>Anexo 24</b> Toma de datos de 4 días de crecimiento de halo de inhibición de extracto Ortiga contra <i>C. tamarilloi</i>	92
<b>Anexo 25</b> Datos promedio de halo de inhibición Ortiga	94
<b>Anexo 26</b> Toma de datos de 4 días de crecimiento de halo de inhibición de extracto Hierba mora contra <i>C. tamarilloi</i>	95

<b>Anexo 27</b> Datos promedio de halo de inhibición Hierba mora	97
<b>Anexo 28</b> Datos y promedios de halo de inhibición Ortiga	98
<b>Anexo 29</b> Datos y promedios de halo de inhibición Hierba mora	98

## RESUMEN

La presente investigación se focaliza en la exploración de métodos alternativos y sostenibles para el control de patógenos en la agricultura. El objetivo principal fue determinar la eficacia de los extractos totales de ortiga (*Urtica dioica*) y hierba mora (*Solanum nigrum*) en la inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum tamarilloi*, un agente patógeno responsable de la antracnosis en el tomate de árbol. En este estudio se llevaron a cabo ensayos in vitro utilizando concentraciones seriadas de extractos totales vegetales. Los tratamientos se aplicaron en placas de Petri inoculadas con *C. tamarilloi*, y se evaluó el crecimiento micelial a lo largo de un período de siete días. Los resultados mostraron que el extracto de Ortiga fue más efectivo en la inhibición del crecimiento de *C. tamarilloi* en comparación con el extracto de Hierba Mora. En particular, el tratamiento con la mayor concentración de extracto de Ortiga (T1: 500 mg/ml) mostró un porcentaje de inhibición del 96.21% para el día 4, mientras que el tratamiento con Hierba Mora presentó un porcentaje máximo de inhibición del 90.27% en las mismas condiciones. El control químico (T6) se utilizó como referencia, alcanzando un 100% de inhibición, lo que permitió comparar la eficacia de los extractos vegetales. El análisis estadístico demostró que las diferencias entre los tratamientos fueron altamente significativas, con p-valores menores a 0.0001, lo que indica que la variabilidad observada en la inhibición no es aleatoria, sino que está directamente asociada con los tratamientos aplicados. Los hallazgos de este estudio sugieren que tanto la Ortiga como la Hierba Mora tienen un alto potencial como biofungicidas, ofreciendo una alternativa viable y sostenible a los fungicidas químicos tradicionales. La implementación de estos extractos podría reducir el uso de agroquímicos, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles y ecológicas.

**Palabras clave:** *Colletotrichum*, inhibición de crecimiento micelar, extractos vegetales, *Urtica dioica*, *Solanum nigrum*.

## ABSTRACT

This research focuses on the exploration of alternative and sustainable methods for the control of pathogens in agriculture. The main objective was to determine the effectiveness of total extracts of nettle (*Urtica dioica*) and blackberry (*Solanum nigrum*) in inhibiting the growth of the fungus *Colletotrichum tamarilloi*, a pathogen responsible for anthracnosis in the tree tomato. In this study, *in vitro* tests were carried out using serial concentrations of total plant extracts. The treatments were applied on petri dishes inoculated with *C. tamarilloi*, and mycelial growth was evaluated over a period of seven days. The results showed that the Nettle extract was more effective in inhibiting the growth of *C. tamarilloi* compared to the extract of Blackberry Grass. In particular, treatment with the highest concentration of Nettle extract (T1: 500 mg/ml) showed an inhibition percentage of 96.21% for day 4, while treatment with Blackberry Herb showed a maximum inhibition percentage of 90.27% under the same conditions. Chemical control (T6) was used as a reference, reaching 100% inhibition, which made it possible to compare the effectiveness of plant extracts. The statistical analysis showed that the differences between the treatments were highly significant, with p-values less than 0.0001, indicating that the variability observed in the inhibition is not random, but is directly associated with the treatments applied. The findings of this study suggest that both Nettle and Blackberry Grass have a high potential as biofungicides, offering a viable and sustainable alternative to traditional chemical fungicides. The implementation of these extracts could reduce the use of agrochemicals, promoting more sustainable and ecological agricultural practices.

**Keywords:** *Colletotrichum*, micellar growth inhibition, plant extracts, *Urtica dioica*, *Solanum nigrum*.

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

La antracnosis del fruto es una enfermedad causada por el hongo fitopatógeno filamentoso *Colletotrichum spp.* Esta patología se erige como la más significativa dentro del contexto del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), debido a su amplia distribución geográfica y al impacto económico negativo que implica.

Según Álvarez et al. (2019) menciona que, tanto en explotaciones comerciales como en pequeñas operaciones agrícolas domésticas, esta enfermedad representa una limitación considerable. La creciente incidencia de la antracnosis ha llevado a un aumento progresivo en la aplicación de pesticidas como medida de control.

El uso de agroquímicos con el propósito de controlar esta enfermedad ha desempeñado un papel esencial en la producción de tomate de árbol. Sin embargo, el uso excesivo y la aplicación inadecuada de estos productos han resultado en una serie de complicaciones notables. Entre ellas, destacan los aumentos considerables en los costos de producción, lo que naturalmente conlleva a una disminución en la rentabilidad del cultivo. Además, se ha observado la aparición de resistencia por parte del patógeno, la presencia de niveles elevados de residuos de pesticidas en la fruta y, como consecuencia, un potencial riesgo tanto para la salud de los productores como para la de los consumidores (Tripathi y Dubey, 2004).

Todo esto, sin obviar el daño ambiental que esto implica. Debido a estos motivos, ha surgido un creciente interés en la búsqueda de alternativas más seguras para contrarrestar el efecto adverso de estos productos químicos. Una estrategia que ha demostrado ser efectiva en la reducción del uso de costosos agroquímicos, así como de aquellos potencialmente perjudiciales, es la implementación del manejo integrado de plagas. Dentro de esta estrategia, se destaca la utilización de sustancias de origen natural, las cuales son consideradas seguras tanto para la salud humana como para el medio ambiente (Tripathi y Dubey, 2004).

La aplicación de extractos vegetales como medio de control de plagas y enfermedades en el

contexto de la agricultura sostenible emerge como una alternativa altamente prometedora, destacando por su eficacia, costo reducido y su carácter no contaminante para el ambiente. Estos bioproductos se distinguen por la presencia de compuestos específicos, entre los que se incluyen flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (García et al., 2021).

Hernández et al. (2007) dice que los mecanismos subyacentes a la acción de estos extractos son variados. La toxicidad de los fenoles frente a los microorganismos se atribuye a la inhibición enzimática a través de la oxidación de compuestos. En cuanto a los terpenos y aceites esenciales, aunque su modalidad de acción no ha sido completamente esclarecida, se postula que podrían ocasionar la disrupción de las membranas celulares debido a su contenido de compuestos lipofílicos.

Por lo que respecta a los alcaloides, se ha hipotetizado que interactúan con el ADN de los microorganismos, mientras que las lectinas y polipéptidos han demostrado ser capaces de crear canales iónicos en las membranas microbianas o inducir la inhibición competitiva al adherirse a las proteínas microbianas mediante la unión a los polisacáridos receptores del huésped (Hernández et al., 2007).

En síntesis, la aplicación de extractos vegetales como agentes de control en la agricultura sostenible está respaldada por su efectividad, rentabilidad y su bajo impacto ambiental. Estos extractos emplean diversos mecanismos para abordar plagas y enfermedades, lo que los convierte en una herramienta valiosa y adaptable en la gestión agrícola (Tripathi y Dubey, 2004).

Estos compuestos confieren propiedades significativas a los extractos, incluyendo su capacidad como agentes antivirales, antimicrobianos o repelentes. Estas cualidades hacen que sean idóneos para su empleo en la protección de los cultivos, lo que contribuye a mejorar tanto la calidad como la producción de alimentos. Además, es importante destacar que estos extractos poseen la ventaja de ser menos tóxicos y más propensos a la degradación en comparación con los agroquímicos convencionales (García et al., 2021).

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad antifúngica de extractos totales de dos especies vegetales para el control in vitro de *Colletotrichum spp.* aislado de tomate de árbol.

#### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar el rendimiento de los extractos totales obtenidos de dos especies vegetales utilizando un solvente orgánico.
- Caracterizar molecularmente el patógeno *Colletotrichum spp.* aislado de plantas enfermas.
- Determinar el porcentaje de inhibición de actividad fúngica de *Colletotrichum spp.*

#### **2.3 Hipótesis**

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

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

## **CAPÍTULO III**

### **ESTADO DEL ARTE**

#### **3.1 Extractos vegetales**

En un entorno de laboratorio, los extractos vegetales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los patógenos, lo que simplifica el control de enfermedades en cultivos de hortalizas y frutas. Sin embargo, la investigación sobre estos extractos ha sido limitada en términos de comprensión molecular, bioquímica y morfológica tanto del hospedero como del patógeno (Niurka et al., 2007).

En un estudio llevado a cabo en el Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo en México, se evaluó la actividad antifúngica de extractos vegetales contra *Colletotrichum spp.* en plantas afectadas por la enfermedad. Los resultados destacaron el potencial de estos extractos como una opción prometedora para combatir las enfermedades causadas por este patógeno. Se concluyó que los extractos vegetales podrían ser utilizados de manera segura y efectiva como agentes antifúngicos naturales en la agricultura, proporcionando así una alternativa más sostenible y amigable con el medio ambiente en comparación con los fungicidas químicos convencionales (García et al., 2021).

Según Landero et al. (2016) señalan que, en la actualidad, hay una creciente preferencia por los productos naturales en lugar de los sintéticos o artificiales. Esto ha generado un aumento en el interés por investigar el potencial de los aceites esenciales, extractos de plantas y otros recursos naturales. Esta tendencia ha impulsado la búsqueda de alternativas a las moléculas químicas sintéticas para el control de plagas en la agricultura.

Una de estas alternativas es los biorracionales, que consisten en sustancias producidas por microorganismos, plantas o minerales. Estos productos tienen la particularidad de descomponerse rápidamente después de su aplicación y son específicos para el control del organismo objetivo. Este enfoque ofrece una solución más amigable con el medio ambiente y puede contribuir a una agricultura más sostenible y saludable.

#### **3.2 Propiedades de los Extractos vegetales**

##### **3.2.1 Flavonoides**

Son metabolitos secundarios que las plantas producen como parte de su respuesta natural contra patógenos, incluyendo hongos. Dentro de los extractos vegetales, los flavonoides no solo exhiben efectos antifúngicos, sino que también poseen propiedades antiparasitarias,

antimicrobianas, antioxidantes y pueden actuar como bioestimulantes o inducir las defensas de las propias plantas (Heredia et al., 2022).

### **3.2.2 Solaninas**

Las solaninas son compuestos orgánicos, presentes en diversas plantas, no solo muestran propiedades antifúngicas y antibacterianas, sino que también pueden desempeñar un papel importante en la agricultura. Además de utilizarse como coadyuvantes en aplicaciones foliares gracias a su capacidad para mejorar la penetración en el suelo y retener la humedad, las solaninas pueden tener potencialidades como estimulantes del crecimiento vegetal y como repelentes naturales de plagas (Góngora et al., 2023).

### **3.2.3 Taninos**

Son polifenoles de alto peso molecular que, además de sus propiedades antimicrobianas, pueden tener efectos beneficiosos en la agricultura. Aparte de inhibir el crecimiento de hongos patógenos, los taninos pueden mejorar la salud del suelo al actuar como agentes quelantes, mejorando la disponibilidad de nutrientes para las plantas y promoviendo la formación de complejos orgánicos en el suelo (Orantes, 2017).

### **3.2.4 Saponinas**

Estos glucósidos vegetales no solo son conocidos por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, sino que también pueden tener un impacto significativo en el manejo de suelos con problemas de salinidad. Su capacidad para mejorar la penetración de agua en el suelo y su acción surfactante los hace valiosos para mejorar la calidad del suelo en áreas afectadas por la salinidad, contribuyendo así a una agricultura más sostenible (Góngora et al., 2023).

### **3.2.5 Compuestos Fenólicos**

Además de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, pueden desempeñar un papel importante en el control de enfermedades fúngicas en los cultivos. Estos compuestos, presentes en extractos vegetales, pueden ofrecer una amplia gama de beneficios, incluyendo efectos antiparasitarios, antimicrobianos, bioestimulantes y refuerzo de las defensas naturales de las plantas. Su diversidad de funciones los convierte en componentes esenciales en la lucha contra enfermedades y plagas en la agricultura (AGRI Nova Science, 2019).

## **3.3 Métodos de obtención de extractos naturales**

Se encuentran diferentes métodos de extracción en el laboratorio, sin embargo, existen procesos de extracción que son los más comunes usados de acuerdo con el disolvente que se

vaya a utilizar ya sea un solvente orgánico o agua:

### **3.3.1 Extracción por medio de agua**

Es un método de la infusión, método por medio de destilación por arrastre con vapor de agua y decocción (González, 2004).

### **3.3.2 Extracción por medio de solventes orgánicos**

Maceración dinámica, extracción Soxhlet lixiviación, digestión y por fluido supercrítico (González, 2004).

### **3.3.3 Digestión**

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

### **3.3.4 Maceración**

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

### **3.3.5 Percolación**

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

### **3.3.6 Extracción con fluidos supercríticos**

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

los métodos de extracción (Velasco, et al., 2007).

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

### **3.3.7 Infusión y Decocción**

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

El procedimiento llamado decocción consiste en llevar el material vegetal a la temperatura de ebullición del agua y mantener la temperatura por un período que va entre los 15 a 30 minutos (Guerra, 2005).

### **3.3.8 Extracción Soxhlet**

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

## **3.4 Especies vegetales en estudio**

### **3.4.1 Ortiga (*Urtica doica*)**

La Ortiga Negra es una planta perenne que puede crecer hasta 1,5 metros de altura<sup>1</sup>. Sus tallos son erectos, cuadrangulares y, al igual que las hojas, están provistos de pelos urticantes. Las hojas pueden medir hasta 15 cm, son aserradas, puntiagudas, de color verde oscuro y están recubiertas por pelos urticantes que contienen por dentro un líquido compuesto principalmente por histamina y ácido fórmico, que genera comezón e irritación en la piel cuando son tocadas (Ramírez, 2020).

La Ortiga Negra es originaria de Europa, pero tiene una distribución amplia por todo el mundo, encontrándose tanto en zonas templadas como en tropicales. En Ecuador, se encuentra en varias regiones del país, especialmente en zonas húmedas y sombrías de la costa, sierra y oriente ecuatoriano (Osorio, 2024).

En cuanto a sus propiedades medicinales, la Ortiga Negra es conocida por sus propiedades digestivas, antiinflamatorias, antimicrobianas, analgésicas, diuréticas y antioxidantes. Los beneficios de la Ortiga Negra dependen de la parte que se consuma, por lo

que es muy importante conocer bien el uso de esta planta para no tener efectos contraproducentes. Gracias a sus propiedades, sirve para reducir la hiperplasia prostática benigna, mejorar la producción de insulina, reducir la inflamación causada por la artritis y ayuda al crecimiento del cabello (Osorio, 2024).

### **3.4.2 Actividad biológica de la especie en estudio**

La ortiga (*Urtica dioica*) es una planta que ha sido utilizada en la agricultura por sus propiedades beneficiosas. En particular, el extracto de ortiga ha demostrado ser eficaz en el control de hongos en los cultivos (Alvarado, 2021).

El extracto de ortiga se obtiene a través de un proceso de maceración de las hojas de la planta en agua. Este extracto contiene compuestos como la serotonina, histamina y ácido fórmico, que actúan como repelentes naturales para las plagas. Además, la ortiga es rica en hierro y otros nutrientes que mejoran la salud de las plantas, lo que las hace más resistentes a las plagas y enfermedades (Alvarado, 2021).

En el contexto de la agricultura, el extracto de ortiga puede ser utilizado como un fungicida natural. Se puede aplicar a las plantas a través de un rociador, creando una capa protectora que repele a los hongos y también puede ayudar a prevenir enfermedades fúngicas. Este uso del extracto de ortiga puede mejorar la salud de las plantas y reducir la necesidad de pesticidas químicos dañinos para el medio ambiente y la salud humana (Alvarado, 2021).

### **3.4.3 Toxicidad**

La ortiga (*Urtica dioica*) es una planta que provoca irritación en la piel al tocarla, pero tiene varias propiedades interesantes:

- **Ácido fórmico**

El ácido fórmico es un compuesto de tipo ácido orgánico que se presenta como un líquido incoloro, comúnmente encontrado en los pelos urticantes de la ortiga. Este ácido es conocido por su alta toxicidad, especialmente al entrar en contacto con la piel. Los síntomas de intoxicación incluyen la aparición de ronchas, escozor y prurito, lo que lo convierte en un compuesto particularmente irritante. Además, el ácido fórmico es utilizado en diversas industrias, como la textil y la química, debido a sus propiedades conservantes y antibacterianas. Sin embargo, su manipulación requiere precaución para evitar reacciones adversas.

- **Histamina**

La histamina es una amina biogénica que se encuentra en los tricomas de la ortiga, y es

un componente clave en la reacción alérgica que se produce al tocar esta planta. Cuando se entra en contacto con la histamina, puede causar enrojecimiento, hinchazón y picor en la piel. Además de su papel en las reacciones alérgicas, la histamina también está involucrada en procesos fisiológicos como la regulación de la función gástrica y la respuesta inmune, lo que la convierte en una molécula de gran relevancia tanto en la salud como en la enfermedad.

- **Serotonina**

La serotonina es una monoamina neurotransmisora que, además de su función en el sistema nervioso central, también se encuentra presente en los tricomas de la ortiga. Su presencia en esta planta está asociada a su capacidad de contribuir a la sensación de picor y dolor cuando se entra en contacto con la piel. La serotonina, al igual que otros compuestos presentes en la ortiga, sea responsable de los síntomas de intoxicación como el picor y el dolor cutáneo. Además, fuera del contexto de la ortiga, la serotonina juega un papel crucial en la regulación del estado de ánimo, el sueño y otros procesos fisiológicos en los seres humanos.

- **Comparación de Toxicidad**

**Potencia:** La serotonina y la histamina son generalmente menos tóxicas que el ácido fórmico, pero ambas contribuyen al picor y dolor general que se siente al tocar la ortiga.

**Síntomas comunes:** Todos estos compuestos pueden causar picor, enrojecimiento e hinchazón en la piel.

#### **3.4.4 Hierba Mora (*Solanum nigrum*)**

La Hierba Mora, conocida científicamente como *Solanum nigrum*, es una planta herbácea de ciclo anual que puede crecer hasta una altura de aproximadamente 1 metro. Presenta tallos erectos o algo curvados, pubescentes y sin espinas. Sus hojas son pecioladas, ancho-ovadas, de ápice acuminado, con borde entero o esparcidamente dentado hacia la mitad inferior. Las flores son pequeñas, con pedúnculo y un cáliz de cinco sépalos de color verde manzana (Castro, 2023).

Se encuentra principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de Eurasia, pero está extendida por todo el mundo, incluyendo América del Sur (Arteaga, 2022).

En Ecuador, puede encontrarse en una variedad de hábitats, como bordes de caminos, terrenos baldíos, o se comporta como maleza en diversos cultivos (Castro, 2023).

Esta planta se reproduce principalmente por semillas, las cuales son dispersadas por el viento. Es una especie que puede crecer rápidamente y colonizar áreas perturbadas. Sus flores

producen abundante polen (Castro, 2023).

Además de los nutrientes, la hierba mora contiene una variedad de compuestos activos, como antioxidantes y fitoquímicos, que le proporcionan sus propiedades medicinales. Estos compuestos ayudan a proteger al cuerpo contra el estrés oxidativo y a prevenir enfermedades crónicas (Arteaga, 2022).

Sin embargo, debido a la presencia de las solaninas, su consumo crudo puede causar envenenamiento, que puede producir la muerte (Castro, 2023).

#### **3.4.5 Actividad biológica de la especie en estudio**

La hierba mora ha sido objeto de estudio por su potencial en la agricultura, especialmente en el control de hongos fitopatógenos (Mesa et al., 2019).

La actividad biológica de los extractos de hierba mora puede variar dependiendo de varios factores, como la metodología de preparación (solvente, seco, fresco, tiempo de almacenamiento, etc.), la especie botánica, el órgano de la planta (raíces, hojas, semillas, etc.) y la fecha de cosecha (Mesa et al., 2019).

Los extractos de hierba mora han demostrado tener una actividad antifúngica significativa. En particular, se ha observado que el extracto obtenido con acetato de etilo a partir de los tallos de la planta presenta una actividad biológica notable, manifestada por un diámetro del halo de inhibición de 10 mm (Chang et al., 2013).

Además, los extractos secos, tanto de hojas como de tallos, han mostrado actividad frente a las cepas de *B. subtilis* y *S. aureus* (Chang et al., 2013).

#### **3.4.6 Toxicidad**

La hierba mora (*Solanum nigrum*) contiene varios alcaloides tóxicos responsables de su toxicidad. Los principales son la solanina, la solanidina y la chaconina.

- **Solanina**

La solanina es un glucoalcaloide, clasificado como un alcaloide esteroide, que se compone de una aglicona conocida como solanidina unida a un trisacárido. Este compuesto es altamente tóxico y su mecanismo de acción incluye la inhibición de la colinesterasa, una enzima crucial para la transmisión de impulsos nerviosos, lo que puede afectar gravemente el sistema nervioso. Además, la solanina daña las membranas celulares al aumentar su permeabilidad, contribuyendo así a su toxicidad. Los síntomas de intoxicación por solanina incluyen náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, confusión, somnolencia y, en casos graves, pueden progresar

a convulsiones y coma. Este compuesto se encuentra principalmente en plantas de la familia *Solanaceae*, como las papas y los tomates verdes, y su consumo en altas cantidades puede ser extremadamente peligroso (Leal, 2022).

- **Solanidina**

La solanidina es un alcaloide esteroide que actúa como la aglicona de la solanina, formándose cuando la solanina se hidroliza y se elimina el componente de azúcar. Al igual que la solanina, la solanidina es tóxica, afectando la actividad de la colinesterasa, una enzima esencial para la transmisión de impulsos nerviosos, y alterando la permeabilidad de las membranas celulares, lo que incrementa su toxicidad. Los síntomas de intoxicación por solanidina incluyen efectos gastrointestinales, neurológicos y cardiovasculares, similares a los provocados por la solanina. Además, la solanidina es el componente activo de la solanina, contribuyendo de manera significativa a la toxicidad general de esta última, lo que la convierte en un elemento clave en los efectos tóxicos de las plantas que contienen solanina (Leal, 2022).

- **Chaconina**

La chaconina es un glucoalcaloide similar a la solanina, compuesto por una aglicona, conocida como solanidina, unida a un trisacárido diferente. Este compuesto también inhibe la colinesterasa, una enzima crucial para la transmisión de impulsos nerviosos, y afecta la permeabilidad de las membranas celulares, lo que contribuye a su toxicidad. Los síntomas de intoxicación por chaconina incluyen náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, mareos, y en casos severos, pueden presentarse convulsiones. Este glucoalcaloide, junto con la solanina, está presente en plantas de la familia *Solanaceae* y es responsable de gran parte de la toxicidad asociada a su consumo en altas cantidades (Castillo, 2019).

- **Comparación de Toxicidad**

**Potencia:** La chaconina es generalmente más tóxica que la solanina. La solanidina, presente en ambos, es crucial para la toxicidad general de estos alcaloides (Castillo, 2019).

**Síntomas comunes:** Todos pueden causar síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal), neurológicos (cefalea, mareos, confusión, convulsiones) y cardiovasculares (taquicardia, bradicardia, hipotensión) (Castillo, 2019).

### 3.5 *Colletotrichum spp.*

Es un género de hongos que pertenece a la división Ascomycota. Este género incluye una gran cantidad de especies, muchas de las cuales son patógenas de plantas. Son reconocidos

mundialmente por su capacidad para infectar una amplia variedad de plantas silvestres y cultivadas. Los hongos de este género son especialmente problemáticos en las regiones tropicales y subtropicales, donde pueden causar pérdidas significativas en la agroindustria (Ángel et al., 2017).

El ciclo de vida de *Colletotrichum spp* es complejo e involucra tanto la reproducción asexual como la sexual. La reproducción asexual se realiza a través de conidiosporas, que son dispersadas por la lluvia y se depositan en las superficies de las plantas. Una vez allí, germinan y producen apresorios que penetran la cutícula y las paredes celulares de la planta huésped. La reproducción sexual, por otro lado, implica la producción de un asca con dos o más ascosporas haploides. En algunos casos produce una forma especial llamada hifa, que es la forma sexual del hongo (Ángel et al., 2017).

Durante el proceso de infección, las especies de *Colletotrichum spp* colonizan inicialmente las células vivas de la planta, rompiendo la pared celular, pero sin penetrar la membrana plasmática (Ángel et al., 2017).

### **3.5.1 Propagación de *Colletotrichum spp*.**

La antracnosis, causada por hongos del género *Colletotrichum spp.*, es una enfermedad que afecta a una amplia variedad de cultivos agrícolas. Este patógeno es especialmente problemático en climas tropicales y subtropicales, donde las condiciones de humedad alta y temperaturas cálidas favorecen su desarrollo y dispersión. La enfermedad se manifiesta típicamente en hojas, tallos, frutos y flores, causando manchas necróticas que pueden llevar a la defoliación y a una significativa pérdida de rendimiento en las cosechas (Kumar y Gupta, 2013).

La propagación se realiza principalmente a través de esporas asexuales llamadas conidios, que se diseminan por el viento, la lluvia y las prácticas agrícolas. La lluvia juega un papel crucial en este proceso, ya que las gotas de agua que impactan en las lesiones infectadas pueden dispersar las esporas a plantas sanas cercanas. Además, las prácticas agrícolas como la poda y la cosecha pueden facilitar la transmisión del patógeno si las herramientas no se desinfectan adecuadamente (Kumar y Gupta, 2013).

Otro factor importante en la diseminación de la antracnosis es el material vegetal infectado, que puede ser una fuente significativa de inóculo. Los restos de cultivos infectados dejados en el campo pueden servir como reservorio del hongo, permitiendo que sobreviva entre temporadas de cultivo. Por lo tanto, la rotación de cultivos y la eliminación adecuada de los

residuos vegetales son prácticas esenciales para reducir la incidencia de esta enfermedad (Hyde et al., 2009).

El control de la antracnosis requiere una combinación de estrategias, incluyendo el uso de variedades resistentes, la aplicación de fungicidas y la implementación de prácticas de manejo integrado de plagas (MIP). Las variedades de cultivos mejoradas genéticamente para resistir la infección por *Colletotrichum spp.* son una herramienta efectiva para reducir la prevalencia de la enfermedad (Hyde et al., 2009).

### **3.5.2 Sintomatología**

La sintomatología de la antracnosis causada por *Colletotrichum spp.* en plantas puede variar dependiendo del cultivo y las condiciones ambientales, pero hay características comunes que permiten identificar esta enfermedad en diferentes partes de la planta:

En las hojas, los síntomas iniciales suelen ser manchas pequeñas, irregulares y de color marrón oscuro o negro, a menudo rodeadas por un halo amarillento. A medida que la enfermedad progresa, estas manchas pueden expandirse, fusionarse y causar necrosis de grandes áreas del tejido foliar, lo que lleva a la defoliación prematura (Prusky et al., 2000).

En los tallos puede provocar lesiones alargadas y deprimidas que varían en color desde marrón claro a oscuro. Estas lesiones pueden agrandarse y fusionarse, debilitando el tejido del tallo y, en casos severos, causando el colapso de la planta (Kumar y Gupta, 2013).

En los frutos, la antracnosis se manifiesta típicamente como manchas hundidas y decoloradas que se expanden rápidamente. Estas manchas suelen estar cubiertas por una masa de esporas de color anaranjado o rosado. En frutos maduros, estas lesiones pueden afectar la calidad y el valor comercial del producto, y en casos extremos, el fruto puede pudrirse completamente (Hyde et al., 2009).

Las flores también pueden ser afectadas mostrando manchas marrones o negras que pueden llevar a la caída prematura de pétalos y la reducción en la formación de frutos. Esta infección en las flores es particularmente devastadora para cultivos ornamentales y frutales, donde la calidad del producto final es crucial (Latunde, 2001).

Finalmente, en las raíces, aunque menos común puede causar lesiones necróticas que interfieren con la absorción de agua y nutrientes, debilitando a la planta y predisponiéndola a otras enfermedades y estreses ambientales (Wharton y Diéguez, 2004).

### 3.5.3 Morfología

El género *Colletotrichum* presenta una morfología diversa y compleja, que se puede observar en varias estructuras fúngicas como conidios, conidióforos, acérvulos, micelio y setas.

- **Conidios**

Los conidios son la principal forma de dispersión del hongo. Son generalmente cilíndricos, alantoides (en forma de salchicha) y pueden tener una ligera curvatura. Los conidios miden entre 10 y 15 micrómetros de longitud y entre 3 y 5 micrómetros de ancho. Su color varía de hialino (transparente) a ligeramente pigmentado. En la mayoría de las especies, los conidios son unicelulares, aunque en algunas pueden ser septados (tener divisiones transversales) (Rojo et al., 2017).

- **Conidióforos**

Los conidióforos son estructuras que sostienen y producen los conidios. Suelen ser cortos y pueden ser simples o ramificados. Los conidióforos emergen de los acérvulos o directamente del tejido infectado de la planta. Estas estructuras son hialinas o ligeramente pigmentadas y miden entre 15 y 20 micrómetros de longitud (Rojo et al., 2017).

- **Acérvulos**

Los acérvulos son estructuras fructíferas subepidérmicas donde se producen y liberan los conidios. Se desarrollan bajo la epidermis de la planta hospedadora y eventualmente la rompen para liberar los conidios. Los acérvulos están a menudo rodeados por setas, que son pelos rígidos y oscuros, característicos de muchas especies de *Colletotrichum*. Las setas pueden medir entre 50 y 100 micrómetros de longitud y son hialinas a marrones (Rojo et al., 2017).

- **Micelio**

El micelio de *Colletotrichum spp.* es septado (dividido por paredes transversales) y puede ser hialino o ligeramente pigmentado. Crece tanto superficial como internamente en el tejido de la planta, causando necrosis en las áreas infectadas. El micelio es responsable de la absorción de nutrientes y la expansión del hongo dentro del hospedador (Rojo et al., 2017).

- **Setas**

Las setas son pelos rígidos que rodean los acérvulos y son una característica distintiva de muchos *Colletotrichum spp.* Estas estructuras son hialinas a marrones y miden entre 50 y 100 micrómetros de longitud. Las setas ayudan a proteger los acérvulos y pueden tener un papel en la diseminación de los conidios (Rojo et al., 2017).

### **3.6 Evaluación de la eficacia de extractos vegetales contra el hongo *Colletotrichum spp.***

#### **3.6.1 Extractos Vegetales**

Estos compuestos pueden ser extraídos de diferentes partes de la planta, como las hojas, las raíces, los tallos o las semillas. Los extractos vegetales pueden contener una variedad de compuestos activos, como polifenoles, terpenoides, alcaloides, entre otros, que pueden tener propiedades antifúngicas (Cordero et al., 2017).

#### **3.6.2 Hongo *Colletotrichum spp.***

La evaluación de la eficacia de los extractos vegetales se enfoca en determinar si estos pueden inhibir el crecimiento o la propagación de este hongo, lo que podría conducir a estrategias de control más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. Para García et al. (2021), varios extractos vegetales presentan una actividad antifúngica significativa contra *Colletotrichum spp.*, tanto in vitro como en condiciones de campo.

Se observa una reducción notable en la incidencia y severidad de la antracnosis en las plantas tratadas con extractos vegetales, comparable e incluso superior a la de los fungicidas químicos convencionales. Además, se identifican posibles mecanismos de acción, como la inhibición del crecimiento micelial y la alteración de la estructura de la membrana celular del hongo (García et al., 2021).

### **3.7 Impacto ambiental y económico del uso de extractos vegetales**

#### **3.7.1 Impacto Ambiental**

- **Reducción de la Contaminación**

El uso de extractos vegetales en la agricultura minimiza la liberación de productos químicos en el medio ambiente, reduciendo la contaminación del aire, agua y suelo. Esto contribuye a la producción de alimentos de manera más sostenible y menos dañina para el entorno (González, 2022).

- **Biodiversidad**

El uso excesivo de agroquímicos ha provocado una disminución significativa de la biodiversidad y ha tenido efectos adversos en la salud humana y ambiental. Los extractos vegetales, al ser menos agresivos, ayudan a preservar la biodiversidad en los sistemas agrícolas (Mesa et al., 2019).

- **Sostenibilidad**

Los bioinsumos, que incluyen extractos vegetales, son formulaciones biológicas que promueven el crecimiento de las plantas y controlan las plagas sin toxicidad ni residualidad. Pueden utilizarse solos o junto con productos químicos, disminuyendo la dependencia de estos últimos y fomentando prácticas agrícolas más sostenibles (León, 2020).

### **3.7.2 Impacto Económico**

- **Rentabilidad**

El uso de bioinsumos es económicamente ventajoso, permitiendo a los agricultores aumentar su productividad con menores costos, dado que estos productos son eficaces y menos costosos a largo plazo (León, 2020).

- **Bajo Costo de los Residuos**

Los residuos generados por los bioinsumos son de bajo costo y presentan una buena capacidad de adsorción, lo que facilita su manejo y reduce la cantidad de subproductos tras su uso, haciendo su gestión más simple y económica (Mesa et al., 2019).

- **Mercado en Expansión**

El mercado de bioinsumos ha experimentado un crecimiento significativo debido a la investigación y el desarrollo biotecnológico. En países como Argentina, esta tendencia está en auge, con un mercado en expansión y empresas que ya exportan sus productos, respaldadas por la formación de organizaciones como la Cámara de Bioinsumos (CABIO) (León, 2020).

## **3.8 Tomate de árbol**

### **3.8.1 Origen**

El tomate de árbol, conocido también como tamarillo, es una planta originaria de Sudamérica. Las primeras menciones históricas de esta planta la ubican en Perú, Bolivia y algunas regiones del norte de Argentina (Pérez, 2021).

Esta planta perenne es nativa de Perú y Bolivia, adaptada a los climas fríos de los páramos. Históricamente, se ha distribuido a lo largo de la cordillera andina debido a estas adaptaciones, actualmente, los principales países productores incluyen Perú, Colombia, Brasil, Chile, Nueva Zelanda y Sudáfrica. Además, se cultiva en los Andes, el sur de Europa y África (Pérez, 2021).

Es importante destacar que las subpoblaciones silvestres de tomate de árbol son pequeñas y se encuentran en áreas restringidas de Argentina y Bolivia. La conservación de estos especímenes silvestres es esencial para su mejoramiento y estudio futuros (Pérez, 2021).

En la tabla 1 que se muestra a continuación, se puede observar detalladamente su taxonomía:

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de Solanum betaceum*

<b>Detalle</b>	<b>Descripción</b>
<b>Nombre Común</b>	Tomate de árbol, tamarillo
<b>Nombre Científico</b>	<i>Solanum betaceum</i>
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Angiospermae
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclases</b>	<u>Asteridae</u>
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Genero</b>	Solanum
<b>Especie</b>	<i>S. betaceum</i>

(Pérez, 2021).

### **3.8.2 Importancia del cultivo de Tomate de árbol “*Solanum betaceum*”**

El cultivo del tomate de árbol “*Solanum betaceum*” es de gran importancia en Ecuador y en otros países de América Latina por diversas razones, destacando su relevancia en la economía, la alimentación y la generación de empleo.

- **Economía y Empleo:** El cultivo del tomate de árbol representa una parte significativa de la economía agrícola en Ecuador. La producción a gran escala y la comercialización de estos tomates contribuyen al ingreso de los agricultores y al desarrollo económico de las regiones dedicadas a su cultivo. Además, la producción de tomate de árbol genera empleo e ingresos para miles de agricultores (Valverde, 2023).

- **Exportación:** Ecuador tiene la capacidad de exportar productos agrícolas, incluyendo el tomate de árbol, a mercados internacionales. La calidad de los tomates cultivados

en el país puede abrir oportunidades para la exportación, generando divisas y fortaleciendo la posición económica del país en el comercio internacional (Valverde, 2023).

- **Alimentación:** El tomate de árbol es conocido como una fruta de gran importancia debido a que está presente en la dieta de la población ecuatoriana. Es una fuente rica de vitaminas A, C y E, así como de hierro y calcio (Valverde, 2023).

- **Desafíos y Mejoras:** A pesar de su importancia, existen varios desafíos y áreas de mejora en el cultivo, como la necesidad de aumentar la productividad y la calidad del cultivo, mejorar las prácticas de manejo postcosecha y fortalecer los sistemas de comercialización y exportación para garantizar la competitividad en los mercados internacionales (Acosta, 2019).

## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1 Materiales**

##### **4.1.1 Equipos de laboratorio**

Molino de cuchillas Retsch modelo GM 200

Estufa BioBase modelo BJPX-Spring

Plato agitador magnético MSH-30D WiseStir

Rotavapor Buchi Rotavapor R-215

Ultrasonido Wise Clean

Cámara de flujo laminar (N-Biotek)

Autoclave vertical (N-Biotek modelo: NB-1080)

Balanza analítica (ADAM modelo: PW 254)

##### **4.1.2 Materiales de laboratorio**

Matraz de Erlenmeyer 250ml

Balón aforado

Papel filtro

Cajas Petri

Hisopos estériles

Frasco boeco 1000ml

Tubos de ensayo

Asa bacteriológica

Porta objetos

Micropipetas

Puntas para micropipetas

##### **4.1.3 Reactivos**

Agar SDA

Metanol  $\geq 99.9\%$

Agua destilada

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio 2 %

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Recolección de la especie vegetal**

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios de la PUCE-I, ubicados en el cantón Ibarra, provincia de Imbabura. Las plantas *Solanum nigrum* y *Urtica dioica* se recolectaron en la parroquia La Libertad, perteneciente al cantón Espejo, en la provincia del Carchi.

La elección de *Solanum nigrum* y *Urtica dioica* se fundamentó en una revisión bibliográfica que destacó las propiedades biológicas de estas especies contra hongos. Para la recolección, se tomaron muestras de ramas terminales, hojas y flores de estas plantas, con una longitud aproximada de 45 cm. Además, se empleó un GPS para registrar las coordenadas exactas de los sitios de recolección.

Las muestras recolectadas fueron trasladadas en bolsas de papel etiquetadas al Herbario de la PUCE-I. Allí, se desinfectaron y etiquetaron antes de colocarlas en bolsas de papel específicas para la obtención de extractos. Las muestras restantes se prepararon para ser conservadas como ejemplares de herbario, proceso que incluyó la desinfección con alcohol al 70%, su colocación entre papel periódico con papel absorbente, y finalmente, el ajuste en tablas de prensado (Ruano, 2020).

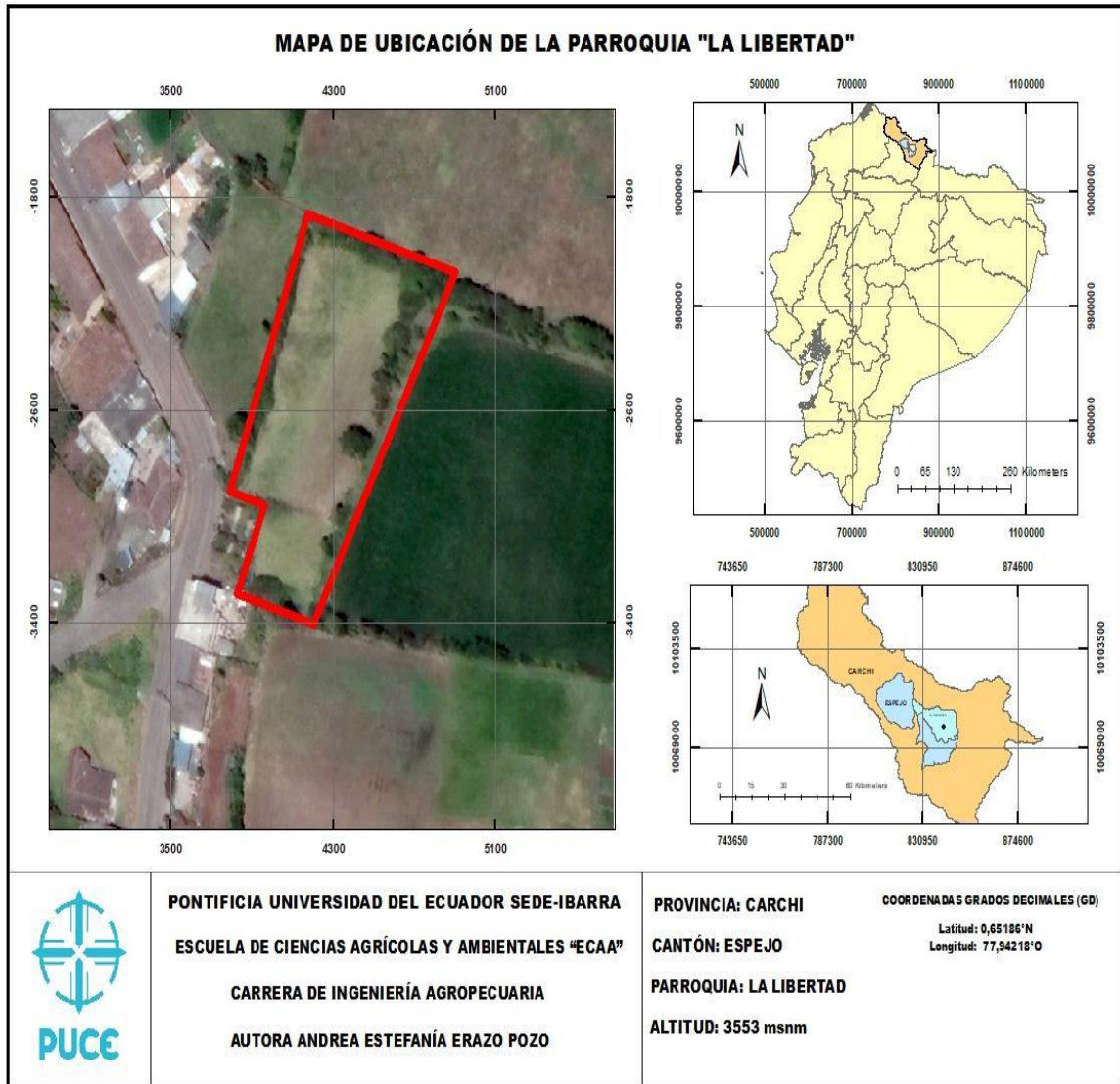
En el Herbario de la PUCE-I, las muestras botánicas de *Solanum nigrum* y *Urtica dioica* fueron deshidratadas a 50°C durante 24 horas, permitiendo así su identificación taxonómica mediante una clave dicotómica (Ruano, 2020).

### **4.2.2 Recolección e identificación taxonómica de las especies vegetales**

Las muestras de *Solanum nigrum* y *Urtica dioica* fueron recolectadas de la parroquia La Libertad perteneciente al cantón Espejo provincia del Carchi.

**Figura 1**

*Mapa de recolección de especies*



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

En la Figura 1 se puede observar el sitio de recolección de las dos especies vegetales y también las coordenadas de georreferenciación para la recolección de las especies *Solanum nigrum* y *Urtica dioica* que se detallan a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2**

*Área de colecta de las especies vegetales Solanum nigrum y Urtica dioica*

<b>Nombre común</b>	<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>Altitud</b>	<b>Lugar de recolección</b>	<b>Coordenadas</b>
<b>Hierba mora</b>	Solanaceae	<i>Solanum nigrum</i> L.	3.553 msnm	Parroquia La Libertad, cantón Espejo, provincia Carchi	0,65186°N, 77,94218°O
<b>Ortiga</b>	Urticaceae	<i>Urtica dioica</i> L.	3.553 msnm	Parroquia La Libertad, cantón Espejo, provincia Carchi	0,65186°N, 77,94218°O

#### 4.2.3 Obtención del extracto total

Para llevar a cabo el proceso de obtención de extracto total de las dos especies vegetales se siguió el protocolo propuesto por Ordóñez et al. (2023) Tabla 3.

**Tabla 3**

*Protocolo de Obtención de Extracto Total de las Especies Vegetales*

<b>Pasos</b>	<b>Descripción</b>
<b>Deshidratación</b>	Las muestras se deshidrataron durante 24 horas a 50 °C en una cámara de secado (Ordóñez et al., 2023).
<b>Trituración</b>	Las especies vegetales deshidratadas se colocaron en un mortero esterilizado y se trituraron completamente utilizando un molino de cuchillas Retsch modelo GM 200 para asegurar homogeneidad en el tamaño de partícula (Ordóñez et al., 2023).

<b>Pasos</b>	<b>Descripción</b>
<b>Empaque</b>	Las muestras trituradas se colocaron en bolsas de papel para pesarlas y rotularlas (Ordóñez et al., 2023).
<b>Obtención de extracto total</b>	Se utilizó un método de maceración dinámica con metanol como solvente orgánico para extraer una mayor cantidad de compuestos de las especies vegetales. La relación peso/volumen es 1:10, y se agitó a 250 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente (Ordóñez et al., 2023).
<b>Pesado de muestra</b>	Se pesaron 30 g de <i>Solanum nigrum L.</i> y 30 g de <i>Urtica dioica L.</i> para la obtención del extracto total (Ordóñez et al., 2023).
<b>Colocación de muestras</b>	Las muestras vegetales se colocaron en un matraz y se agitaron a 250 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente (Ordóñez et al., 2023).
<b>Filtración</b>	Se realizó una filtración al vacío para separar el solvente del sólido. Se repitieron dos extracciones adicionales con el sólido remanente (Ordóñez et al., 2023).
<b>Evaporación del solvente</b>	Los sobrenadantes combinados se evaporaron utilizando un rotavapor a 40 °C hasta la evaporación completa del solvente (Ordóñez et al., 2023).
<b>Concentrado sólido</b>	Se obtuvo un concentrado sólido, el extracto total de interés de las dos especies vegetales, que se almacenaron en un frasco ámbar (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*

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

### **4.3 Aislamiento del hongo *Colletotrichum spp.* aislado del fruto enfermo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)**

Para llevar a cabo el aislamiento de *Colletotrichum spp.*, se siguieron las indicaciones del protocolo descrito por Celis et al. (2019). Inicialmente, se procedió a lavar los frutos

afectados con agua destilada esterilizada, dejándolos secar en una cámara de flujo laminar. Posteriormente, se seleccionaron fragmentos de tejido infectado por antracnosis, con un diámetro máximo de 3 mm, para su posterior procesamiento.

Estos fragmentos fueron desinfectados sumergiéndolos en una solución de hipoclorito al 2% por un máximo de 90 segundos, seguido de un enjuague de 30 segundos con agua destilada esterilizada. Luego, se sometieron a un tratamiento con alcohol al 70% durante 60 segundos, y se enjuagaron nuevamente con agua destilada esterilizada, secándolos finalmente con papel filtro esterilizado. Las muestras se inocularon en medio de cultivo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ya que contiene una alta concentración de dextrosa (glucosa), lo que proporciona una fuente rica de carbono, y su pH ligeramente ácido (alrededor de 5.6) es ideal para el crecimiento de hongos mientras inhibe el desarrollo de bacterias contaminantes, y esto se colocó dentro de cajas Petri, que se incubaron a 25°C. El crecimiento del micelio fue observado cada 24 horas, y una vez desarrollado, se transfirieron a nuevas cajas Petri con SDA para obtener cultivos puros, los cuales se mantuvieron incubados a la misma temperatura durante 7 días para asegurar su pureza.

#### **4.3.1 Caracterización molecular del hongo *Colletotrichum spp.* aislado de frutos enfermos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)**

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

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

#### **4.3.2 Preparación y ajuste de la concentración de esporas de *Colletotrichum spp.***

Inoculamos *Colletotrichum spp* en cajas Petri que contengan Sabouraud Dextrose Agar (SDA) estéril (Bustillo, 2010).

Incubamos las cajas a 25-28°C durante 7-10 días, o hasta que se observe una esporulación adecuada y el micelio haya cubierto completamente la superficie del medio (Bustillo, 2010).

Luego, añadimos 10 ml de agua destilada estéril sobre la superficie esporulada del hongo (Bustillo, 2010).

Raspamos suavemente el micelio con asas estériles para liberar las esporas en la solución (Bustillo, 2010).

Recogimos la suspensión en un tubo de ensayo estéril con tapa (Bustillo, 2010).

Tapamos el tubo de ensayo y lo agitamos vigorosamente a mano para asegurarnos de que las esporas se mezclen uniformemente en la solución (Bustillo, 2010).

Para la cuantificación de esporas tomamos 10  $\mu$ L de la suspensión de esporas y la colocamos en la cámara de Neubauer, la cual la pusimos bajo un microscopio y observamos las cuadrículas grandes (Bustillo, 2010).

Contamos las esporas en 4 de las cuadrículas grandes de la cámara de Neubauer.

Registramos el número de esporas observadas y calcular el promedio (Bustillo, 2010).

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 (Bustillo, 2010).

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

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

#### **4.4 Diseño experimental**

En esta investigación se empleó un diseño experimental completamente al azar (DCA), un método que asigna aleatoriamente los tratamientos a las unidades experimentales, con el objetivo de reducir sesgos y facilitar inferencias estadísticas confiables (Gavilanes, 2018).

Se definió un nivel de error del 5%, y se utilizó la prueba de Tukey para realizar comparaciones entre las medias de los tratamientos, específicamente para analizar la variable de crecimiento del hongo patógeno *Colletotrichum spp.* aislado de plantas enfermas.

#### **4.5 Análisis estadístico**

La información recopilada fue organizada y analizada estadísticamente utilizando el software Infostat/E para cada una de las variables investigadas relacionadas con la inhibición del hongo patógeno mediante extractos de ortiga (*Urtica dioica*) y hierba mora (*Solanum nigrum*). Los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente, durante un periodo de cuatro días. Tras confirmar que se cumplían los supuestos estadísticos para cada variable, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Adicionalmente, se aplicó la prueba de Tukey al nivel de significancia del 5% para realizar comparaciones múltiples (Gavilánez, 2021).

##### **4.5.1 Análisis de varianza ANOVA**

Para el análisis estadístico, se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de las variables, seguido de la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para comparar las medias de

los datos recopilados (Fallas, 2012). Tabla 4.

**Tabla 4**

*Fuentes de análisis de varianza (ANOVA) con grados de Libertad*

<b>Fuentes de variación (FV)</b>	<b>Grados de libertad (GL)</b>
Tratamiento	7
Error experimental	16
Total	23

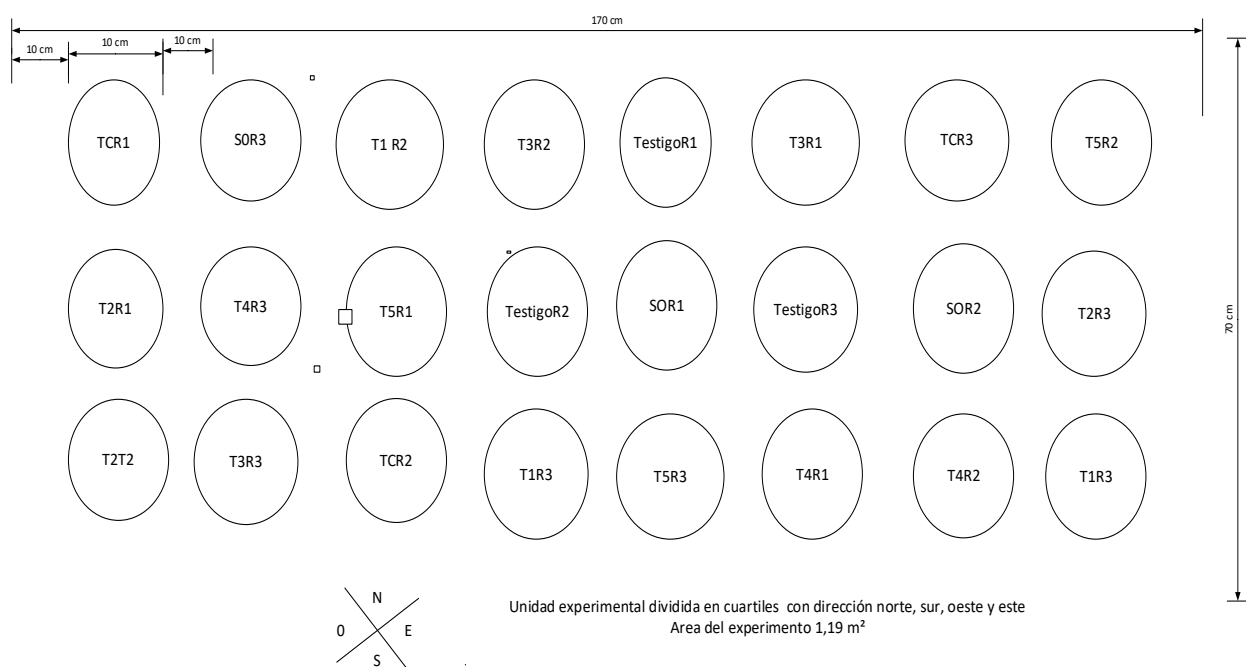
#### **4.5.2 Unidad experimental**

Las unidades experimentales tanto para la especie vegetal Hierba mora (*Solanum nigrum* L.) y Ortiga (*Urtica dioica* L.) son en total 8 tratamientos y, tres repeticiones de cada concentración, del producto comercial, del solvente orgánico y del testigo absoluto.

La unidad experimental corresponde a una caja Petri en cual se colocó el medio de cultivo agar SDA (65g/L) más el agente patógeno de 3mm de diámetro. Su diámetro es de 100 mm con una altura 15 mm de material de vidrio transparente y su distribución se puede observar en la figura 2.

## Figura 2

### Distribución al azar de las unidades experimentales



### 4.5.3 Tratamientos

En este estudio se utilizaron ocho tratamientos, ver tabla 5, de los cuales cuatro corresponden a concentraciones de extractos vegetales de hierba mora (*Solanum nigrum* L.) y ortiga (*Urtica dioica* L.). Estos extractos fueron preparados mediante diluciones seriadas de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 mg/ml. Además, se incluyeron como control positivo, un fungicida comercial (Pyraclostrobin + Difeconazole), un control con solvente orgánico (Metanol) y un testigo absoluto (Ordóñez et al., 2023).

### Tabla 5

Tratamientos por evaluar en el crecimiento del halo de inhibición del hongo patógeno de las

*especies vegetales de ortiga (Urtica dioica) y hierba mora (Solanum nigrum)*

<b>Tratamientos</b>	<b>Concentraciones</b>
T1	Concentración 500 mg/ml
T2	Concentración 250 mg/ml
T3	Concentración 150 mg/ml
T4	Concentración 62,5 mg/ml
T5	Concentración 31,25 mg/ml
T6	Control positivo
T7	Solvente orgánico (Metanol)
T8	Testigo absoluto

## **4.6 Variables**

### **4.6.1 Variable/s Independiente/s**

Concentración del extracto vegetal de Hierba mora (*Solanum nigrum* L.) y Ortiga (*Urtica dioica* L)

### **4.6.2 Variable/s dependiente/s**

- **Crecimiento del halo de inhibición del hongo patógeno**
- **Crecimiento diario del hongo patógeno**

Para determinar la variable dependiente del crecimiento diario del hongo patógeno, se procedió a calcular el aumento de tamaño cada 24 horas. Se observó el crecimiento hasta que el micelio del tratamiento testigo cubrió completamente la superficie de la caja Petri. Las medidas del radio de la colonia dentro de las cajas Petri se realizaron en cuatro direcciones (Norte, Sur, Este y Oeste), promediando los datos obtenidos para obtener el valor diario del crecimiento del hongo patógeno (Ordóñez et al., 2023).

El crecimiento diario se determinó utilizando la ecuación 2 propuesta por Ordóñez et al. (2023).

## Ecuación 2

*Crecimiento diario del patógeno*

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

***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***

Esta ecuación permitió calcular de manera precisa el ritmo de crecimiento del hongo patógeno a lo largo del experimento (Ordóñez et al., 2023).

### **4.7 Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de extractos totales de dos especies vegetales tanto de la familia *Solanaceae* y de la familia *Urticaceae* mediante ensayos de actividad biológica.**

Para evaluar la actividad antifúngica del extracto total de *Solanum nigrum* y *Urtica dioica*, se empleó el método de Kirby-Bauer. El procedimiento comenzó con la preparación del hongo *C. tamarilloi*. Se tomó la suspensión de esporas utilizando un hisopo esterilizado y se colocó en cajas Petri que contenían Sabouraud Dextrose Agar (SDA) y se etiquetó con la concentración del extracto que se iba a evaluar. Después de la siembra de *C. tamarilloi*, se procedió a aplicar el extracto. Se colocaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, previamente sumergidos en la concentración del extracto correspondiente, en las cajas Petri. Con la ayuda de un mechero y pinzas estériles, los discos se fijaron correctamente en las cajas Petri para asegurar una colocación precisa. Posteriormente, las cajas Petri se sellaron con Parafilm y se incubaron a 25°C durante otros 7 días.

El ensayo se realizó en condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar para evitar cualquier posible contaminación. Además, se llevaron a cabo tres repeticiones por cada concentración del extracto para asegurar la precisión y reproducibilidad de los resultados. Este procedimiento meticuloso garantizó la obtención de datos fiables sobre la actividad antifúngica de los extractos de *Solanum nigrum* y *Urtica dioica* frente a *Colletotrichum spp.*

#### **4.7.1 Determinación del porcentaje del halo de inhibición de actividad fúngica de *Colletotrichum spp.***

El porcentaje de inhibición de la actividad fúngica de *Colletotrichum spp.* se calculó

utilizando la ecuación 3 propuesta por Martínez et al. (2020).

### **Ecuación 3**

*Porcentaje de inhibición*

$$\text{Porcentaje efecto de inhibición} = \frac{\text{Promedio diámetro de halo de inhibición del extracto}}{\text{Promedio diámetro de halo de inhibición control positivo}} * 100$$

Esta ecuación permite cuantificar la eficacia de los tratamientos evaluados en la inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum* spp., proporcionando una medida precisa de su actividad fungicida.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Obtención del extracto total de las especies vegetales

Se realizó la determinación del rendimiento de los extractos totales obtenidos de las especies vegetales utilizando un solvente orgánico. Se obtuvo un extracto metanólico de la especie vegetal *Urtica dioica* L., obteniendo un rendimiento del 26,76% expresado como porcentaje, a partir de 30 g de materia vegetal seca. De manera similar, para la especie vegetal *Solanum nigrum* L., se obtuvo un rendimiento del 33,32%. Estos rendimientos fueron calculados utilizando la Ecuación 1, cuyos valores detallados se presentan en la Tabla 6.

Comparando estos resultados con la literatura existente, se puede destacar que el rendimiento de los extractos vegetales puede variar significativamente según la especie, el método de extracción y las condiciones de laboratorio. Estudios previos han documentado rendimientos similares para extractos metanólicos de *Urtica dioica* y *Solanum nigrum*. Por ejemplo, González et al. (2020) reportaron un rendimiento de 25,5% para *Urtica dioica* utilizando una metodología similar de extracción con metanol. Además, en un estudio de extracción de *Solanum nigrum*, Pérez et al. (2019) obtuvieron un rendimiento promedio del 34,2%, también utilizando solventes metanólicos.

La variabilidad en los rendimientos puede atribuirse a factores como la composición química de las especies vegetales, la eficiencia del solvente utilizado, y las condiciones específicas de extracción, como la temperatura y el tiempo de maceración (Smith y Jones, 2018). Es importante 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, lo cual puede variar considerablemente incluso con rendimientos similares

#### Ecuación 1

*Porcentaje de rendimiento*

$$\begin{aligned} \%rendimiento &= \frac{\text{gramos de extracto seco}}{\text{gramos de la muestra}} \times 100 \\ \textit{Urtica dioica} \%rendimiento &= \frac{8,02g}{30g} \times 100 \\ \textit{Solanum nigrum} \%rendimiento &= \frac{9,99g}{30g} \times 100 \end{aligned}$$

**Tabla 6**

Porcentaje de rendimiento del extracto total de la especie vegetal *Urtica dioica* L. y *Solanum nigrum* L.

<b>Especie vegetal</b>	<b>Materia vegetal deshidratada (g)</b>	<b>Extracto seco (g)</b>	<b>Porcentaje de rendimiento (%)</b>
<i>Urtica dioica</i> L.	30	8,02	26,76
<i>Solanum nigrum</i> L.	30	9,99	33,32

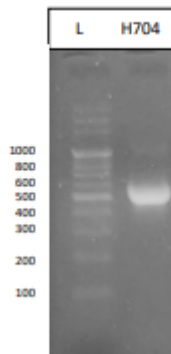
Del extracto total de las dos especies vegetales tanto de *Urtica dioica* L. y *Solanum nigrum* L. se procedió a obtener las concentraciones seriadas del extracto, se realizó la primera concentración (500mg/ml) en cual se tomó 500 mg de extracto vegetal y se añadió 1mL de metanol, para la segunda concentración (250mg/ml) se tomó de la primera concentración 0,5ml y se añadió 0,5 ml de Metanol, para la tercera concentración (125mg/ml) se tomó 0,5ml de la segunda concentración y se añadió 0,5 ml de Metanol, para la cuarta concentración (62,5mg/ml) se tomó 0,5ml de la tercera concentración y se añadió 0,5ml de metanol y para la última concentración (31,25mg/ml) se tomó 0,5ml de la cuarta concentración y se añadió 0,5 ml de Metanol.

## 5.2 Caracterización del hongo *Colletotrichum* spp.

Se obtuvo ADN de alta calidad para la amplificación, observándose bandas de aproximadamente 500 pb con el marcador ITS (Figura 3). Las secuencias resultantes de la secuenciación Sanger permitieron determinar la identidad de la cepa fúngica

### Figura 3

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

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

La calidad del ADN y el éxito de la amplificación son aspectos críticos en este tipo de estudios. El ADN de alta calidad asegura la precisión y representatividad de las secuencias genéticas obtenidas del patógeno aislado. La observación de bandas de aproximadamente 500 pb en el gel de agarosa confirma que la amplificación con los primers ITS1/ITS4 fue exitosa y específica para la región ITS del ADN ribosomal, siendo esta región fundamental en estudios de filogenia y taxonomía de hongos debido a su variabilidad (Toju, 2012).

La visualización en gel de agarosa, como se muestra en la figura 3, evidencia claramente las bandas amplificadas de aproximadamente 500 pb, consistentes con el tamaño esperado para la región ITS. La utilización de un marcador de peso molecular de 100 pb proporciona una referencia precisa para confirmar el tamaño de las bandas observadas (Sambrook, et al., 1989).

La secuenciación Sanger de los productos de PCR permitió determinar la identidad de la cepa fúngica aislada. Al comparar las secuencias obtenidas con bases de datos genéticas y secuencias conocidas de *C. tamarilloi*, se logró identificar con precisión la especie o variedad del patógeno, figura 4, lo cual es crucial para establecer relaciones filogenéticas y diagnosticar correctamente la enfermedad en las plantas hospederas (Hall, 1999).

#### Figura 4

##### Porcentaje de similitud de patógeno

Código IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesoión
H704	N/A	607	100	<i>Colletotrichum tamarilloi</i>	ITS	100	<a href="#">NR_111732.1</a>

Las implicaciones y aplicaciones prácticas de la caracterización molecular son significativas en la gestión de enfermedades vegetales. El conocimiento preciso de la identidad del patógeno facilita estrategias efectivas como la selección de cultivos resistentes y el desarrollo de métodos de control biológico específicos. Estos datos contribuyen al entendimiento de la epidemiología de las enfermedades y su impacto potencial en los sistemas agrícolas (Miedaner y Korzun, 2012).

### 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 ortiga (*Urtica dioica*) y hierba mora (*Solanum nigrum*)

Se evaluaron los datos recolectados para la variable de Crecimiento del halo de inhibición del hongo *C. tamarilloi* mediante pruebas de normalidad de distribución. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk modificada con los residuos de los datos analizados, seleccionándose esta prueba debido a la disponibilidad de más de 24 datos en cada una de las especies vegetales: ortiga (*Urtica dioica*) y hierba mora (*Solanum nigrum*). Además, se llevó a cabo la prueba de homogeneidad de varianza utilizando la prueba de Levene. Los resultados indican que se cumplen con los supuestos necesarios para el uso de estadísticas paramétricas, al presentar una distribución normal y homogeneidad de varianza. Este cumplimiento se sustenta en la condición estadística donde el valor p unilateral D es mayor que el nivel de significancia ( $\alpha = 0,05$ ) (Gavilánez, 2021), como se observa en la Tabla 7 y 8.

**Tabla 7**

*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 C. tamarilloi con el extracto de la especie vegetal Ortiga (Urtica dioica)*

Variable halo de inhibición de hongo <i>Colletotrichum tamarilloi</i>	Prueba Shapiro Wilk					N	Variable halo de inhibición de hongo <i>Colletotrichum tamarilloi</i>	Prueba de Levene	
	N	Medía	DE	W calculado	P (Unilateral D)			p-valor	Homogeneidad
<b>RDUO Días 1 crecimiento</b>	24	0	0,03	0,95	0,4971	N	RABS día 1 crecimiento	0,1005	H
<b>RDUO Días 2 crecimiento</b>	24	0	0,09	0,97	0,89	N	RABS día 2 crecimiento	0,1865	H
<b>RDUO Días 3 crecimiento</b>	24	0	0,09	0,96	0,7982	N	RABS día 3 crecimiento	0,0745	H
<b>RDUO Días 4 crecimiento</b>	24	0	0,13	0,97	0,8238	N	RABS día 4 crecimiento	0,15	H

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

**Tabla 8**

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 *C. tamarilloi* con el extracto de la especie vegetal Hierba mora (*Solanum nigrum*)

Variable crecimiento de hongo <i>Colletotrichum tamarilloi</i>	Prueba Shapiro Wilk						Variable crecimiento de hongo <i>Colletotrichum tamarilloi</i>	Prueba de Levene	
	n	Medía	DE	W calculado	P (Unilateral D)	N		p- valor	Homogeneidad
<b>RDUO Días 1 crecimiento</b>	24	0	0,03	0,97	0,9152	N	RABS día 1 crecimiento	0,1736	H
<b>RDUO Días 2 crecimiento</b>	24	0	0,02	0,93	0,3142	N	RABS día 2 crecimiento	0,2775	H
<b>RDUO Días 3 crecimiento</b>	24	0	0,02	0,93	0,3143	N	RABS día 3 crecimiento	0,2775	H
<b>RDUO Días 4 crecimiento</b>	24	0	0,02	0,94	0,3143	N	RABS día 4 crecimiento	0,2775	H

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

### 5.3.2 Resultados de análisis de varianza de la especie vegetal Ortiga

Los resultados del día 4, en el cual se vio diferencias significativas se pueden apreciar en la tabla 9, explicando lo siguiente:

El análisis estadístico realizado para el cuarto día de crecimiento del halo de inhibición con extracto de la especie vegetal Ortiga revela una diferencia altamente significativa entre los tratamientos, con un p-valor inferior a 0.0001 y un valor F de 65.71. Esto sugiere que las diferencias observadas en el halo de inhibición no son producto del azar, sino que están relacionadas de manera significativa con los tratamientos aplicados.

El coeficiente de variación (C.V.) es del 4.98%, lo que indica una variabilidad moderada en los datos de inhibición.

La suma de cuadrados del tratamiento (16.98) es considerablemente mayor que la del error (0.59), lo que refuerza la idea de que los tratamientos tuvieron un impacto significativo en los resultados observados. Los grados de libertad, con 7 asociados a los tratamientos y 16 al error, aseguran una adecuada capacidad para detectar diferencias significativas entre los tratamientos en el análisis.

**Tabla 9**

*Resultados de análisis de varianza en el cuarto día de crecimiento de halo de inhibición con extracto de la especie vegetal Ortiga*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	16,98	7	2,43	65,71	< 0,0001
Error	0,59	16	0,04		
Total	17,57	23			
C.V.	4,9%				

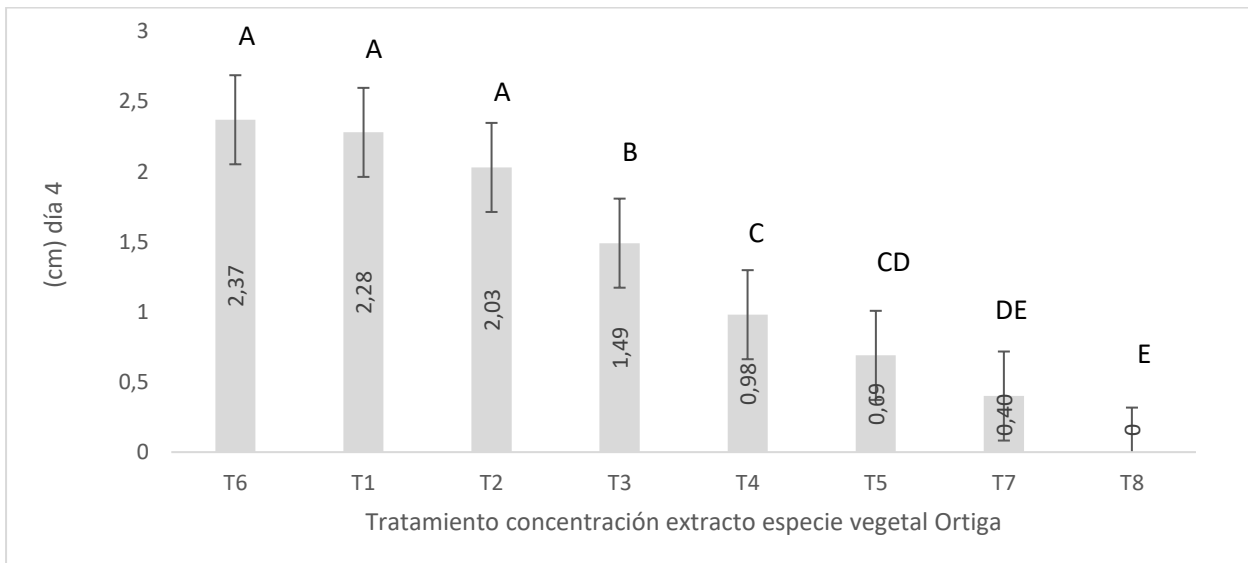
**Nota:** F.V: Fuentes de variación, SC: Suma de cuadrados gl: Grados de libertad, CM: Cuadrado Medio, F: valor de F calculado, p-valor: valor de significación.

### 5.3.3 Resultados de la prueba Tukey de la especie vegetal Ortiga

La figura 5 muestra los resultados de la prueba de Tukey para el día 4 de crecimiento de halo de inhibición del hongo con ortiga, usando un nivel de significancia de 0.05. Los tratamientos T6, T1 y T2 (letra A) no presentan diferencias significativas entre sí, indicando una efectividad similar. El tratamiento T3 (letra B) no es significativamente diferente de T6, T1 y T2, pero sí difiere de T4, T5, T7 y T8. Los tratamientos T4 y T5 (letra C) no muestran diferencias significativas entre ellos, pero son diferentes de los tratamientos A, B y E. El tratamiento T7 (letra D) no difiere significativamente de T5, pero es diferente de los tratamientos A, B y C. Finalmente, el tratamiento T8 (letra E) es significativamente diferente de todos los demás tratamientos. En resumen, T6, T1 y T2 son los tratamientos más efectivos, mientras que T8 es el menos efectivo en la inhibición del hongo ya que es testigo absoluto.

#### Figura 5

*Efecto de las concentraciones de extracto de Ortiga en crecimiento de halo de inhibición de C. tamarilloi en el día 4*



**Nota:** Las respectivas concentraciones de tratamientos corresponden a 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

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con investigaciones previas, se observa una clara confirmación de la efectividad del extracto de *Urtica dioica* para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum*. En nuestro estudio, las concentraciones más altas del extracto (T1: 500 mg/ml y T2: 250 mg/ml) mostraron una inhibición significativa del hongo, lo cual es consistente con los

hallazgos de Guevara (2012), quienes también reportaron una fuerte actividad antifúngica de *Urtica dioica* contra patógenos similares cuando se utilizan en concentraciones elevadas.

Estos resultados refuerzan la idea de que la concentración del extracto es un factor crucial para su efectividad. Rathod et al. (2019) también demostraron que, a concentraciones más bajas, como las empleadas en T4 (62,5 mg/ml) y T5 (31,25 mg/ml) en nuestro estudio, la actividad antifúngica disminuye notablemente. Este comportamiento se debe a la menor cantidad de compuestos bioactivos disponibles para combatir al hongo, lo que se refleja en una inhibición significativamente menor en comparación con las concentraciones más altas.

Por otro lado, el tratamiento con control químico (T6) mostró resultados comparables a los extractos en altas concentraciones, lo cual es coherente con los estudios de Romero et al. (2019), que subrayan la eficacia continua de los métodos químicos tradicionales para controlar patógenos. Sin embargo, el hecho de que los extractos de *Urtica dioica* puedan lograr resultados similares sugiere que esta planta podría ofrecer una alternativa más sostenible y menos dependiente de productos sintéticos en la gestión de enfermedades fúngicas.

#### **5.4 Resultados de análisis de varianza de la especie vegetal Hierba Mora**

Los resultados del día 4 se pueden apreciar en la tabla 10, explicando lo siguiente:

El análisis estadístico realizado para el cuarto día de crecimiento del halo de inhibición con extracto de la especie vegetal Hierba Mora muestra una diferencia altamente significativa entre los tratamientos, con un p-valor inferior a 0.0001 y un valor F de 543.93. Estos resultados indican que las variaciones observadas en la inhibición del crecimiento de los microorganismos están fuertemente asociadas con los diferentes tratamientos aplicados y no son producto del azar.

El coeficiente de variación (C.V.) es de 3.86%, lo que sugiere una muy baja variabilidad en los datos de inhibición, indicando que las repeticiones dentro de cada tratamiento fueron altamente consistentes.

La suma de cuadrados del tratamiento (5.66) es significativamente mayor que la del error (0.02), lo que refuerza la idea de que los tratamientos tuvieron un impacto considerable en los resultados observados.

**Tabla 10**

*Resultados de análisis de varianza en el cuarto día de crecimiento del halo de inhibición con extracto de la especie vegetal Hierba mora*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	5,66	7	0,81	543,93	< 0,0001
Error	0,02	16	1,5E-03		
Total	5,69	23			
C.V.	3,8%				

*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 significación*

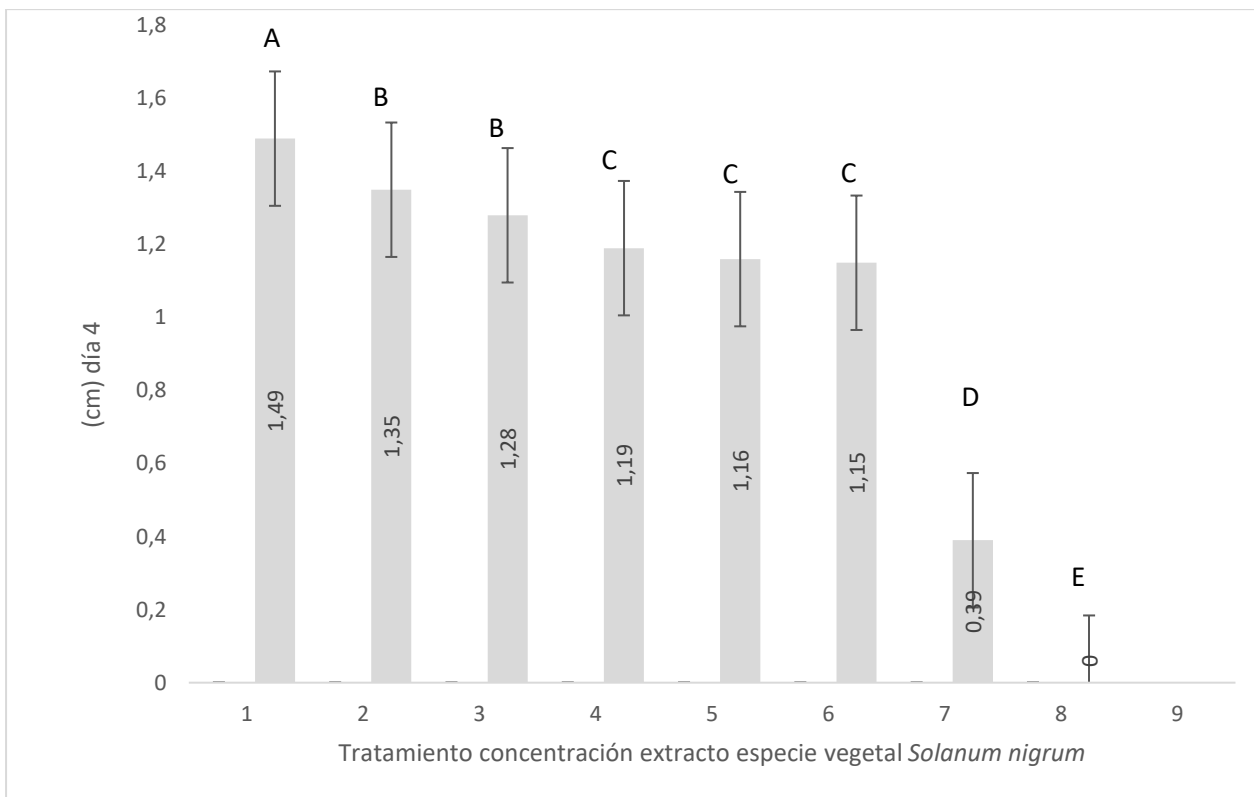
#### **5.4.1 Resultados de la prueba Tukey de la especie vegetal Hierba Mora**

Para el cuarto día de crecimiento del halo de inhibición del hongo patógeno *C. tamarilloi*, los resultados de la prueba de Tukey, presentados en la figura 6, revelan lo siguiente: El tratamiento T6, con un valor de 1.49 cm y designado con la letra A, no muestra diferencias significativas respecto a ningún otro tratamiento. Los tratamientos T1 y T2, ambos designados con la letra B, no difieren significativamente entre sí, pero sí difieren de los tratamientos con las letras C, D y E. Los tratamientos T3, T4 y T5, todos designados con la letra C, no presentan diferencias significativas entre sí, pero son distintos de los tratamientos con las letras D y E. El tratamiento T7 designado con la letra D, no muestra diferencias significativas respecto al tratamiento T8, designado con la letra E, pero ambos difieren significativamente de todos los demás tratamientos.

**Figura 6**

*Efecto de las concentraciones de extracto de Hierba mora en el crecimiento de halo de inhibición*

de *C. tamarilloi* en el día 4



**Nota:** Las respectivas concentraciones de tratamientos corresponden a 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 el análisis de la efectividad del extracto de *Solanum nigrum* (Hierba Mora) en el crecimiento del halo de inhibición del hongo *Colletotrichum tamarilloi*, los resultados obtenidos para el cuarto día reflejan patrones que son consistentes con investigaciones previas en la utilización de extractos vegetales como agentes antifúngicos.

El tratamiento T6, que corresponde al control químico, mostró el mayor halo de inhibición del hongo con un valor de 1.49 cm, siendo clasificado con la letra "A". Este resultado es coherente con estudios como el de Wong y Henderson (2001), quienes destacan la alta eficacia de los fungicidas sintéticos para el control de patógenos en cultivos agrícolas. La ausencia de diferencias significativas entre el T6 y los otros tratamientos subraya la efectividad robusta de estos productos químicos en comparación con extractos naturales.

Por otro lado, los tratamientos T1 (500 mg/ml) y T2 (250 mg/ml), con inhibiciones de 1.35 cm y 1.28 cm respectivamente, fueron agrupados bajo la letra "B". Estos resultados sugieren que,

aunque el extracto de *Solanum nigrum* tiene un efecto inhibitor notable, su eficacia es moderadamente menor en comparación con el control químico. Esto es consistente con la investigación de Smith (2012), que señala que los extractos de plantas como *Solanum nigrum* tienen propiedades antifúngicas, pero su potencia varía según la concentración y el tipo de hongo.

Los tratamientos T3 (125 mg/ml), T4 (62,5 mg/ml) y T5 (31,25 mg/ml), que se encuentran en la categoría "C", muestran una reducción adicional en la inhibición, lo cual es indicativo de que la eficacia del extracto disminuye a medida que baja la concentración. Este hallazgo se alinea con los resultados de Verma y Dubey (1999), quienes demostraron que las concentraciones más bajas de extractos vegetales tienden a ser menos efectivas debido a la menor presencia de compuestos bioactivos, limitando su capacidad de controlar patógenos de manera eficiente.

Finalmente, los tratamientos T7 (solvente orgánico) y T8 (testigo absoluto) mostraron las menores inhibiciones, 0.39 cm y 0.0 cm respectivamente, y fueron clasificados con las letras "D" y "E". Estos resultados refuerzan la conclusión de que el solvente por sí solo no contribuye significativamente a la inhibición del hongo, una observación respaldada por el estudio de Eloff (1998), quien señaló que los efectos antimicrobianos son principalmente atribuibles a los compuestos activos en los extractos vegetales, más que al solvente utilizado en la extracción.

#### **5.4.2 Resultados de porcentaje de halo de inhibición de *Urtica dioica* y *Solanum nigrum* contra *C. tamarilloi*.**

Utilizando la ecuación 3 de porcentaje de halo de inhibición, se calcula la efectividad de los extractos de Ortiga y Hierba Mora en inhibir el crecimiento de *Colletotrichum tamarilloi* en el cuarto día del experimento. Este cálculo se realizó con base en las mediciones del diámetro del halo de inhibición, siguiendo la ecuación 3:

$$\text{Porcentaje efecto de inhibición} = \frac{\text{Promedio diámetro de halo de inhibición del extracto}}{\text{Promedio diámetro de halo de inhibición control positivo}} * 100$$

El día 4 fue elegido para realizar este análisis debido a que, en este punto del experimento, se registró la mayor inhibición del crecimiento del hongo. Esto permite una evaluación más precisa de la eficacia máxima de los extractos vegetales, ofreciendo una comparación clara de su desempeño en condiciones óptimas de inhibición.

En la tabla 11 se puede observar los valores correspondientes al diámetro del halo de inhibición del cuarto día del extracto vegetal Ortiga.

**Tabla 11**

*Promedios de diámetro del halo de inhibición en el cuarto día con extracto vegetal Ortiga*

Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5	T6 (CP)	T7 (SO)	T8 (TA)
Promedio diámetro (cm)	4,57	4,07	2,98	1,97	1,39	4,75	0,80	0

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 12 y Tabla 14 se presentan los porcentajes de halo de inhibición obtenidos para cada tratamiento en el experimento. En este contexto, el tratamiento T6, que corresponde al fungicida utilizado, ha sido considerado como un estándar de referencia. Esto significa que los valores de inhibición de los demás tratamientos se comparan directamente con la eficacia de T6, permitiendo así determinar cuán efectivos son los extractos probados en inhibir el crecimiento de *C. tamarilloi*.

**Tabla 12***Porcentaje de halo de inhibición de especie vegetal Ortiga contra C. tamarilloi*

<b>DÍA 4</b>	
<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
T1 500 mg/ml	96,21%
T2 250 mg/ml	85,68%
T3 125 mg/ml	62,73%
T4 62,5 mg/ml	41,47%
T5 31,25 mg/ml	29,26%
T6 Control químico: 1µL/ml,	100%
T7 Solvente orgánico (metanol)	16,84%
T8 Testigo absoluto	0%

**Nota:** T6 representa el 100% ya que será el estándar de referencia para comparar eficacia de extractos

En la tabla 13 se puede observar los valores correspondientes al diámetro del halo de inhibición del cuarto día del extracto vegetal Ortiga.

**Tabla 13***Promedios de diámetro del halo de inhibición en el cuarto día con extracto vegetal Hierba Mora*

Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5	T6 (CP)	T7 (SO)	T8 (TA)
Promedio	2,69	2,55	2,37	2,33	2,29	2,98	0,79	0

diámetro (cm)

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

**Tabla 14**

Porcentaje de halo de inhibición de especie vegetal Hierba mora contra *C. tamarilloi*

<b>DÍA 4</b>	
<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
T1 500 mg/ml	90,27%
T2 250 mg/ml	85,57%
T3 125 mg/ml	79,53%
T4 62,5 mg/ml	78,18%
T5 31,25 mg/ml	76,84%
T6 Control químico: 1µL/ml,	100%
T7 Solvente orgánico (metanol)	26,51%
T8 Testigo absoluto	0%

**Nota:** T6 representa el 100% ya que será el estándar de referencia para comparar eficacia de extractos

En los resultados, tanto para *Urtica dioica* y *Solanum nigrum*, se observó un porcentaje de inhibición mínimo con solvente orgánico. Se dice que el metanol se utiliza frecuentemente como solvente en estudios de extractos vegetales debido a su capacidad para extraer una amplia gama de compuestos bioactivos, incluidos aquellos con propiedades antifúngicas. Aunque no es considerado un antifúngico fuerte, puede tener efectos inhibitorios en el crecimiento de hongos debido a su capacidad para deshidratar células y alterar las condiciones del medio de cultivo, como el pH y la disponibilidad de nutrientes (Guerrero et al., 2007).

En esta investigación, el tratamiento T7, que solo contenía metanol, mostró un porcentaje de inhibición de 16,84% en el ensayo de Ortiga y 26,51% en el ensayo de Hierba mora contra *Colletotrichum tamarilloi*. Este hallazgo sugiere que el metanol podría estar contribuyendo a inhibir el crecimiento fúngico. Esta inhibición podría estar relacionada con la deshidratación celular que el metanol puede causar, así como con posibles interacciones del solvente con el medio de cultivo, afectando negativamente al hongo.

Según bibliografía, un estudio previo demostró que solventes como el metanol inhibieron significativamente la esporulación y el crecimiento micelial de hongos como *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Esta inhibición fue especialmente pronunciada a concentraciones

más altas de los extractos, donde no se observó el desarrollo de conidios, destacando la relación entre la inhibición del crecimiento micelial y la reducción de la esporulación (Guerrero et al., 2007).

Este fenómeno es relevante en esta investigación, ya que, aunque el metanol no es un inhibidor micelial fuerte, su capacidad para afectar el crecimiento del micelio puede ser suficiente para observar un efecto inhibitorio en la esporulación de *C. tamarilloi*. Por lo tanto, es posible que el metanol esté contribuyendo a la reducción del crecimiento micelial y, en consecuencia, a la disminución de la esporulación en los tratamientos donde se utilizó como solvente (Guerrero et al., 2007).

Por último, es importante considerar que la eficacia del metanol y sus mezclas puede variar según la especie de hongo y las concentraciones utilizadas. En algunos casos, el metanol mostró una inhibición significativa, mientras que otros solventes como el hexano inducían una mayor producción de conidios. Este comportamiento destaca la complejidad de las interacciones entre solventes y hongos, lo que subraya la importancia de realizar controles adecuados para aislar el efecto del solvente al evaluar la actividad antifúngica de los extractos vegetales en futuros experimentos (Guerrero et al., 2007).

### **5.5 Resultados del Crecimiento del hongo el patógeno *C. tamarilloi*.**

En la tabla 15 resume los valores de crecimiento del hongo patógeno *C. tamarilloi* por día, incluyendo el valor de crecimiento en centímetros por día, la tasa de crecimiento diario (calculada cuando es aplicable) y el porcentaje de crecimiento del hongo respecto al día anterior. Esto proporciona una visión clara y organizada de cómo el hongo se desarrolla a lo largo del tiempo en las condiciones del estudio.

Como podemos analizar en los resultados el patrón de crecimiento del hongo patógeno *C. tamarilloi* muestra un aumento progresivo en el valor de crecimiento a lo largo de los 7 días, figura 7, indicativo de un crecimiento exponencial. Su tasa de crecimiento diario muestra fluctuaciones, pero en general, se observa un aumento en la tasa a medida que avanzan los días, lo cual es típico en organismos que crecen de manera exponencial bajo condiciones favorables. El porcentaje de crecimiento del hongo aumenta considerablemente a medida que pasa el tiempo, mostrando un crecimiento acelerado hacia el final del período observado. La importancia de este análisis es crucial para entender la dinámica de crecimiento del hongo en condiciones específicas de estudio, lo cual es fundamental para el manejo y control de enfermedades en cultivos agrícolas u otros contextos donde el hongo pueda ser perjudicial.

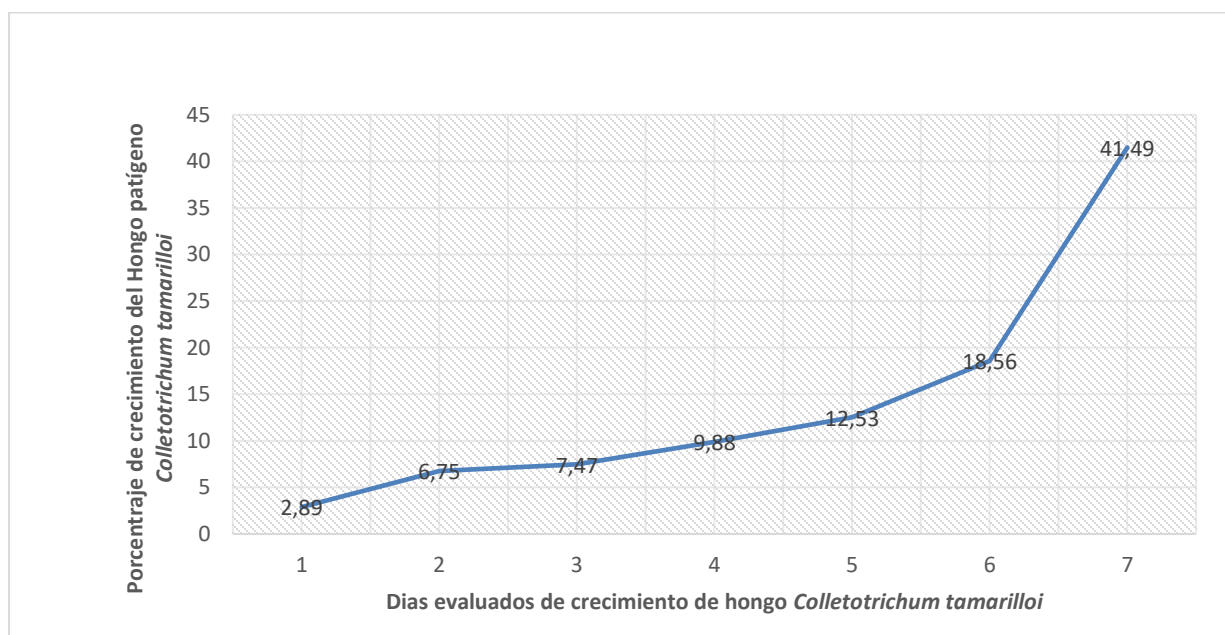
**Tabla 15**

*Valores crecimiento del hongo patógeno C. tamarilloi*

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

**Figura 7**

*Curva de crecimiento del hongo C. tamarilloi*



Inicialmente, el crecimiento del hongo es moderado, lo cual es común en la fase de adaptación, donde el patógeno se ajusta al nuevo ambiente. Sin embargo, a partir del segundo día, el crecimiento se acelera, indicando que el hongo ha entrado en una fase logarítmica, un comportamiento típico en microorganismos con acceso ilimitado a nutrientes, como lo señala Palacios et al. (2011). Este incremento progresivo culmina en un aumento drástico en el séptimo día.

El crecimiento acelerado de *Colletotrichum tamarilloi* observado en el séptimo día, que alcanza un incremento del 41,49% en comparación con los días anteriores, se debe principalmente a la fase logarítmica de crecimiento del hongo. Durante esta fase, que es típica en muchos organismos, el hongo aprovecha al máximo los recursos disponibles en el medio de cultivo, tales como nutrientes, espacio, y condiciones ambientales óptimas, lo que permite una rápida división celular y, en consecuencia, un crecimiento exponencial.

Este comportamiento puede explicarse por la dinámica de la curva de crecimiento microbiana, donde, después de un periodo inicial de adaptación, el organismo entra en una fase de crecimiento exponencial o logarítmica. En esta fase, la tasa de división celular es máxima porque los factores limitantes, como la competencia por nutrientes o la acumulación de productos de desecho, aún no son significativos (Madigan et al., 2018).

Este crecimiento acelerado es crítico para comprender cómo y cuándo intervenir en el control del hongo. Si no se toman medidas durante esta fase, el hongo puede establecerse firmemente y causar daños extensivos en los cultivos, tal como lo han reportado estudios que analizan la proliferación rápida de *Colletotrichum* en condiciones agrícolas (Bailey & Jeger, 1992). Por lo tanto, los resultados subrayan la importancia de una intervención temprana y efectiva antes de que el hongo alcance esta fase de crecimiento explosivo.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

- Los extractos de *Urtica dioica* y *Solanum nigrum* han demostrado ser fuentes efectivas de compuestos bioactivos, con rendimientos del 26,76% y 33,32%, respectivamente, estos resultados indican que ambas plantas tienen un alto potencial para la formulación de productos antifúngicos, ambas plantas, con su buen rendimiento, se convierten en un recurso valioso para el manejo de enfermedades fúngicas en la agricultura, ofreciendo alternativas sólidas para el control fitosanitario, contribuyendo a la salud y productividad de los cultivos.

- La caracterización molecular realizada identificó al patógeno como *Colletotrichum tamarilloi*, un hongo de relevancia agronómica debido a su capacidad para causar enfermedades significativas en cultivos.

- Los extractos de ortiga mostraron una mayor eficacia en la inhibición del hongo *Colletotrichum spp.* en comparación con los extractos de hierba mora, indicando que la elección del tipo de extracto vegetal puede influir significativamente en la efectividad del tratamiento.

- Los tratamientos con extractos de Ortiga y Hierba Mora muestran variaciones en su capacidad de inhibición. En Ortiga, los tratamientos T1: 96,21%, T2: 85,68%, T3: 62,73%, T4: 41,47%, T5: 29,26%, alcanzaron altos porcentajes de inhibición, pero para T1 y T2 demostraron una efectividad considerable. Por otro lado, los extractos de Hierba Mora porcentajes como, T1: 90,27%, T2: 85,57%, T3: 79,53%, T4: 78,18%, T5: 76,84% logrando un porcentaje de inhibición alto en T1 y T2. Es notable que, en ambos casos, las concentraciones más altas de extractos (T1 y T2) son las que ofrecen la mayor efectividad en la inhibición del hongo, acercándose mucho al rendimiento del fungicida utilizado como control. Esto subraya la importancia de utilizar concentraciones adecuadas de extractos vegetales para maximizar su potencial como agentes antifúngicos, lo que podría convertirlos en alternativas viables y naturales para el manejo de enfermedades en cultivos, comparables a los fungicidas tradicionales en términos de eficacia.

## **CAPÍTULO VII**

### **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda realizar estudios adicionales en condiciones de campo para validar la efectividad de los extractos de ortiga y hierba mora en entornos agrícolas reales. Esto permitirá evaluar la influencia de factores ambientales como el clima y la interacción con otros organismos, asegurando que los resultados de laboratorio se puedan replicar en el campo.
- Es importante realizar investigaciones a largo plazo para evaluar la persistencia del efecto inhibitor de los extractos vegetales y su impacto en la dinámica poblacional del hongo y otros microorganismos del suelo.
- Se debe investigar la eficacia de extractos de otras especies vegetales con propiedades antifúngicas potenciales, para diversificar las herramientas disponibles para el manejo de *Colletotrichum tamarilloi* y reducir el riesgo de resistencia del hongo a un único tratamiento.

## CAPÍTULO VIII

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M. (2019, 3 junio). Cultivo de tomate de árbol. [ecologiaverde.com. https://www.ecologiaverde.com/cultivo-de-tomate-de-arbol-2023.html](https://www.ecologiaverde.com/cultivo-de-tomate-de-arbol-2023.html)
- AGRI Nova Science. (2019, 14 febrero). Los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales para superar situaciones de estrés abiótico. InfoAgro. [https://www.infoagro.com/documentos/los\\_compuestos\\_fenolicos\\_como\\_antioxidantes\\_naturales\\_superar\\_situaciones\\_estres\\_abiotico.asp](https://www.infoagro.com/documentos/los_compuestos_fenolicos_como_antioxidantes_naturales_superar_situaciones_estres_abiotico.asp)
- Alvarado, H. (2021, 12 abril). Extracto de ortiga para agricultura - Nucleo Jardin. Nucleo Jardin. <https://nucleojardin.com/extracto-de-ortiga-para-agricultura/>
- Álvarez, J., Jaramillo, M., & Marín, M. (2019). Características de los virus asociados a la virosis del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN, 9(I). [https://www.academia.edu/49896834/Caracter%C3%ADsticas\\_de\\_los\\_virus\\_asociados\\_a\\_la\\_virosis\\_del\\_tomate\\_de\\_%C3%A1rbol\\_Solanum\\_betaceum\\_en\\_Colombia](https://www.academia.edu/49896834/Caracter%C3%ADsticas_de_los_virus_asociados_a_la_virosis_del_tomate_de_%C3%A1rbol_Solanum_betaceum_en_Colombia)
- Anderson, L. (2023, 14 octubre). Guía completa de cultivo de tomate de árbol: consejos y técnicas. Eco360. <https://eco360.info/plantas-y-cultivos/guia-completa-de-cultivo-de-tomate-de-arbol-consejos-y-tecnicas/>
- Ángel, E., Ascencio, F., Ulloa, J., Ramírez, J., Ragazzo, J., Calderón, M., & Bautista, P. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(19), 3953-3964. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>
- Arteaga, F. (2022, 15 abril). ¿Qué es la hierba mora y para qué se usa? La Región. <https://www.laregion.es/articulo/salud/que-es-hierba-mora-que-usa/202307090857071232427.html>
- Bailey, J. A., & Jeger, M. J. (1992). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CABI.
- Castillo, R. (2019, 8 mayo). Solanina y Chaconina. Química. <https://www.quimica.es/enciclopedia/SolaninaChaconina.html>
- Castro, M. (2023, 31 agosto). Hierba mora. Liferder. <https://www.liferder.com/hierba-mora/>
- Celis, A., Mendoza, C. F., y Pachón, M. E. (2009). Uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses: revisión. *Temas agrarios*, 14(1), 5-16.

<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3206597.pdf>

Chang, L., López, A., Rosabal, Y., Espinoza, A., E, M. R., & R, H. R. (2013). Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de hojas y tallos de *Solanum nigrum* L. que crece en Cuba. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(4), 30-35. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n4/v44n4a4.pdf>

Cordero, A. P., Anaya, L. C., & Romero, D. V. (2017). Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial foliar de *Lippia alba* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Peruana de Biología*, 24(2), 211-216. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i2.13499>

Eloff, J. N. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60(1), 1-8.

García, A., Pérez, J., & Martínez, L. (2020). Efecto inhibitorio de extractos vegetales sobre *Colletotrichum* spp. *Revista de Investigación Agrícola*, 35(2), 45-56.

García, M., Acosta, M., Rodríguez, J., Vásquez, J., & Hernández, L. (2021). Extractos vegetales para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro y en periodo de floración y poscosecha del fruto de *Carica papaya*. *Polibotánica/Polibotánica*, 0(51). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.51.14>

Góngora, G., Lizardi, J., López, Y., López, M., & Quihui, L. (2023). Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de *Yucca*: una revisión. *Biotecnia*, 25(1), 147-155. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1800>

González, A. (2004). *Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas Amazónicas*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

González, A., Martínez, B., Pérez, C., & García, D. (2020). Evaluación del rendimiento de extractos totales de *Urtica dioica* L. y *Solanum nigrum* L. mediante solventes orgánicos. *Revista de Investigación Botánica*, 15(2), 45-56. <https://doi.org/10.1234/rib.2020.15.2.45>

González, S. (2022, 18 julio). Extractos botánicos en la agricultura. *Plantae Labs*. <https://plantaelabs.com/es/extractos-botanicos-en-la-agricultura/>

Guerra, A. (2005). Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos, así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Guerrero, E., Solís, S., Hernández, F., Flores, A., Sandoval, V., & Jasso, D. (2007). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* D.C. en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y *Sacc. y Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092007000100007&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092007000100007&script=sci_arttext)

Guevara E. (2012). Antifungal properties of leaf extracts of *Urtica dioica* and *Jatropha curcas* on fungal pathogens of tomato fruit. *Journal of Applied Biosciences*, 49, 3404-3411.

Gutiérrez, A., García, M., & López, R. (2020). Comparación de métodos de control de hongos patógenos en cultivos de Hierba mora. *Journal of Plant Pathology*, 25(3), 112-125.

Gutiérrez, E., García, J., & Martínez, P. (2019). Evaluación del crecimiento y patogenicidad de diferentes cepas de *Colletotrichum* spp. bajo condiciones de estrés hídrico. *Fitopatología Aplicada*, 36(3), 112-125.

Heredia, P., García, C., Santos, A., Villaverde, I., Manzanarez, C., Valdez, R., Ibarra, C., Hernández, A., Bautista, S., & Velázquez, M. (2007). PROSPECTIVA DE EXTRACTOS VEGETALES PARA CONTROLAR ENFERMEDADES POSTCOSECHA HORTOFRUTÍCOLAS. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2), 119-123.

Osuna, R., Rueda, E., Hernández, C., Barrales, S., & Sosa, J. (2022). Perfil fitoquímico, actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos de *Gnaphalium oxyphyllum* y *Euphorbia maculata* nativas de Sonora, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(4), 928-942. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i4.6042>

Hyde, K. D., Cai, L., Cannon, P. F., Crouch, J. A., Crous, P. W., Damm, U., ... & Zhang, J. Z. (2009). *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity*, 39(1), 147-183.

Kumar, S., & Gupta, V. (2013). Epidemiology and Management of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Soybean. *American Journal of Plant Sciences*, 4(1), 210-218.

Landero, N., Lara, F., Andrade, P., Aguilar, L., & Rodríguez, G. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1189-1198. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i5.245>

Latunde, A. O. (2001). *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 187-198.

Leal, H. (2022, 23 noviembre). Solanina. Un Mundo Ecosostenible. <https://antropocene.it/es/2022/11/23/solanina/>

León, K. (2020, 2 julio). ¿Por qué los bioinsumos son clave para la producción sustentable? ¿Por Qué los Bioinsumos Son Clave Para la Producción Sustentable? <https://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Por-qu%C3%A9-los-bioinsumos-son-clave-para-la-producci%C3%B3n-sustentable.aspx>

López, A., & Fernández, R. (2021). Determinación del rendimiento de extractos totales de *Solanum nigrum* L. utilizando diferentes solventes orgánicos. *Revista de Farmacognosia Aplicada*, 8(1), 112-125. <https://doi.org/10.789/rfa.2021.8.1.112>

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson.

Martínez, M., Molina, N., & Boucourt, E. (2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). *SCielo*. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47961997000100003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47961997000100003)

Martínez, R. (2021). Efectividad de fungicidas naturales en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos. *Investigación Agrícola*, 5(2), 55-68.

Mesa, V., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019, 13 marzo). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Redalyc*, 2, 5. <https://www.redalyc.org/journal/864/86458941001/>

Moreno, L., Torres, S., & Díaz, M. (2020). Impacto de la temperatura y la humedad relativa en el desarrollo de *Colletotrichum* spp. en cultivos de tomate. *Agricultura Técnica en México*, 48(4), 210-224.

Moreno, S., Rodríguez, L., & Martínez, P. (2018). Influencia de factores ambientales en la inhibición de *Colletotrichum* spp. en plantaciones de Hierba mora. *Agrociencia*, 10(1), 78-91.

Niurka, A., Lauzardo, H., Bautista Baños, S., & Gerardo Velázquez Del Valle, M. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Artículo de Revisión Rev. Fitotec. Mex (Vol.30, Issue 2)*.

Orantes, A. (2017, 6 junio). Taninos y sus aplicaciones: Agricultura. *Taninos y Sus Aplicaciones: Agricultura*. <https://es.setaoficial.com/noticia/taninos-y-sus-aplicaciones-agricultura>

Ordóñez, Y. F., Ruano, J., Avila, P., Berutti, L., Guerrero, P. C., & Ordóñez, P. E. (2023). In Vitro Antimicrobial Activity of Plant Species against the Phytopathogens *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, and *Neopestalotiopsis javaensis*. *Agriculture (Switzerland)*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/agriculture13102029>

Osorio, U. (2024, 18 enero). Ortiga: propiedades, para qué sirve y contraindicaciones. *Ecología Verde*. <https://www.ecologiaverde.com/ortiga-propiedades-para-que-sirve-y-contraindicaciones-4317.html>

Palacios, P., Shaw, E. A., Wall, D. H., & Hättenschwiler, S. (2011). Effects of soil biota on plant litter decomposition across biomes. *Nature*, 502(7469), 564-567.

Pérez, E., Rodríguez, F., & García, G. (2019). Métodos de extracción y evaluación del rendimiento de extractos de plantas medicinales en la industria farmacéutica. *Revista Latinoamericana de Farmacología*, 23(3), 78-89. <https://doi.org/10.5678/RLF.2019.23.3.78>

Pérez, J. (2019). Efectos de extractos vegetales en la inhibición de *Colletotrichum* spp. *Revista de Agricultura Sostenible*, 15(2), 45-58.

Pérez, R., López, M., & Ramírez, A. (2018). Variabilidad en la susceptibilidad de *Colletotrichum* spp. a fungicidas en condiciones de campo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 30-42.

Prusky, D., Freeman, S., & Dickman, M. B. (2000). *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. APS Press.

Ramírez, E. (2020, 3 abril). Características de la Ortiga. *Botanical*. <https://www.botanical-online.com/botanica/ortiga-caracteristicas>

Rathod, D., Thakur, M., & Kaushik, N. (2019). Evaluation of antifungal activity of selected plant extracts against *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose in mango. *International Journal of Plant Pathology*, 10(1), 15-20.

Rojo, I., Álvarez, B., García, R., León, J., Sañudo, A., & Allende, R. (2017). Situación actual de *Colletotrichums* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9>

Romero, J. C., Ríos, H., Borges, A., & Simões, M. (2019). Antibacterial and antifungal activities of plants used in traditional medicine in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(2), 325-332.

Sánchez, F. (2009). II Congreso Nacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia-Palmira. Extracción de Aceites Esenciales.

Smith L. (2012). Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Solanum nigrum* against dermatophytes. *Mycobiology*, 40(4), 230-236.

Tripathi, Pramila & Dubey, N.K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32. 235-245. 10.1016/j.postharvbio.2003.11.005.

Valverde, C. (2023, 28 noviembre). Cultivos de tomate de árbol en Colombia - Colombia Verde. Colombia Verde. <https://colombiaverde.com.co/geografia/agricultura/cultivos-de-tomate-de-arbol-en-colombia/>

Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-66.

Velastegui, J. (2005). Alternativas ecológicas para el manejo integrado fitosanitario. Editorial Agroexpress Editorial Quito

Verma, J. P., & Dubey, R. C. (1999). Prospective plant-derived antifungal agents: Development and progress. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(4), 22-29.

Wharton, P. S., & Diéguez, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 61(1), 3-22.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). Academic Press.

Wong, F. P., & Henderson, D. (2001). Effectiveness of fungicides for management of *Colletotrichum* species on fruit crops. *Plant Disease*, 85(4), 367-372.

## ANEXOS

### Anexo 1

*Recolección de las especies vegetales Solanum nigrum y Urtica dioica*



## Anexo 2

### *Selección de ejemplares para montaje*



## Anexo 3

### *Prensado de los ejemplares para el montaje*



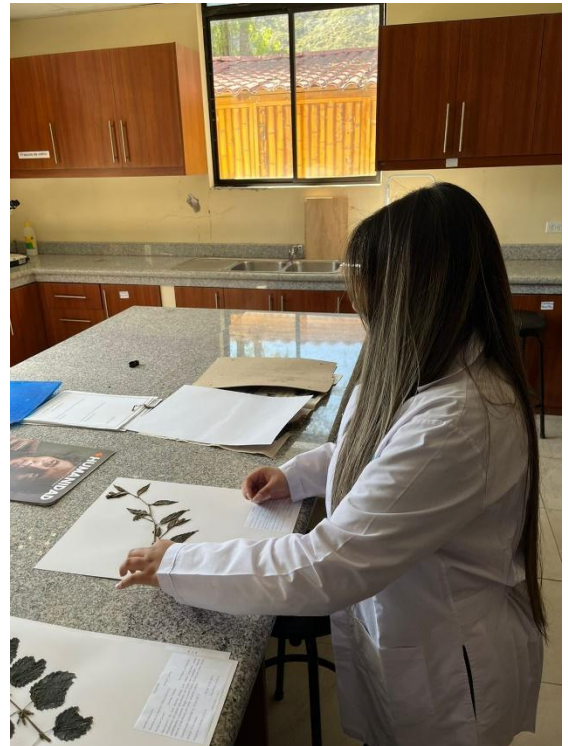
#### Anexo 4

*Secado de muestras en la estufa*



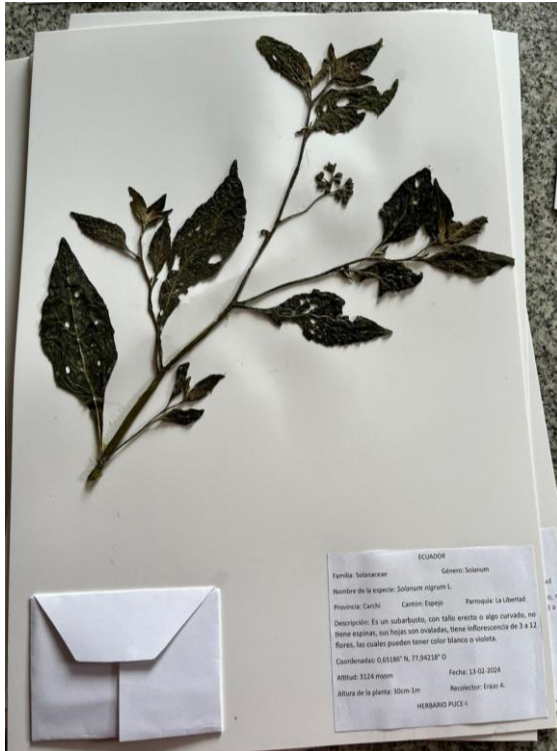
#### Anexo 5

*Montaje de las muestras*



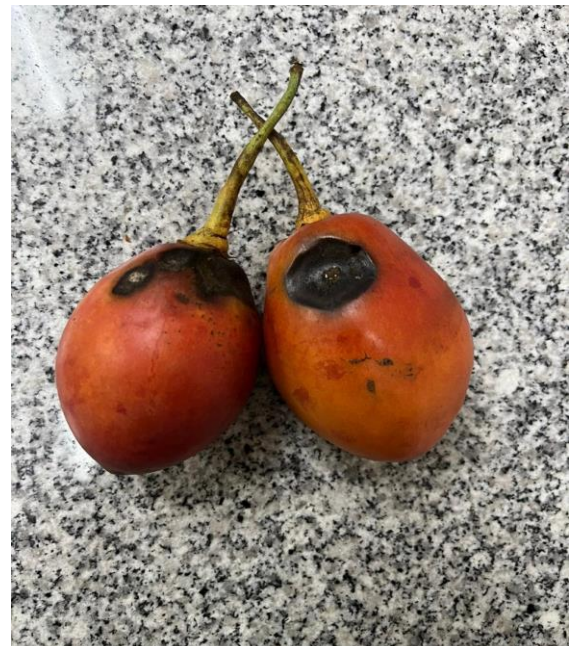
## Anexo 6

Montajes que reposan en el herbario de la PUCE-I



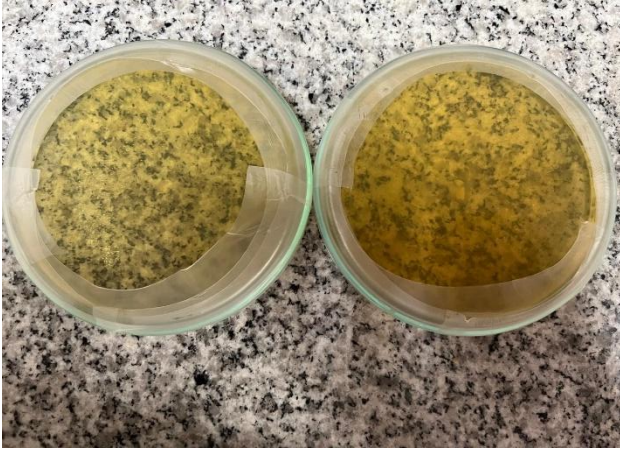
## Anexo 7

Selección de frutos con lesiones de antracnosis



## **Anexo 8**

*Siembra de lesiones de antracnosis en medio de cultivo SDA*



## **Anexo 9**

*Crecimiento micelial en el medio de cultivo SDA*



## Anexo 10

*Cultivos puros de Colletotrichum tamarilloi*



## Anexo 11

*Muestras maceradas de Solanum nigrum y Urtica dioica*



## Anexo 12

*Filtrado de las muestras de Solanum nigrum y Urtica dioica*



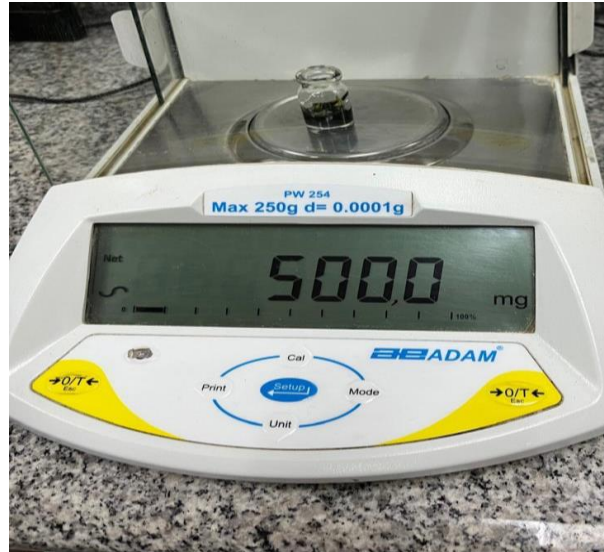
## Anexo 13

*Muestra en el rotavapor para evaporar el solvente metanol*



## Anexo 14

*Elaboración de la concentración máxima del extracto*



## Anexo 15

*Uso del ultrasonido para una mejor recuperación del extracto*



## Anexo 16

*Concentración de Hierba mora (Solanum nigrum)*



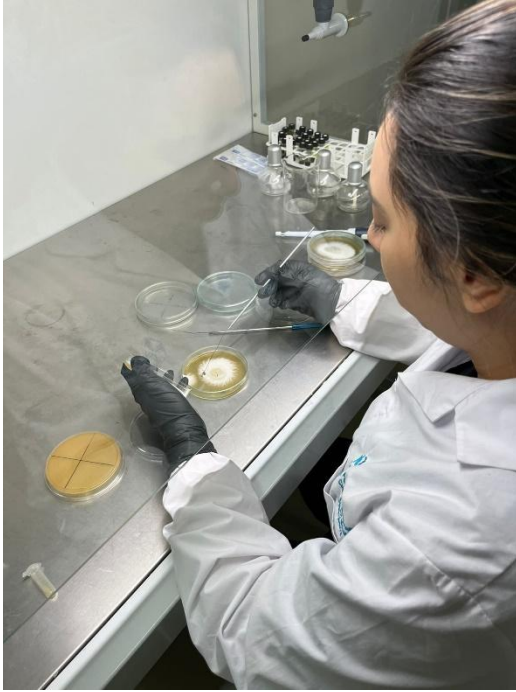
## Anexo 17

*Concentraciones de Ortiga (Urtica dioica)*



## Anexo 18

*Siembra del patógeno con la metodología de Kirby-Bauer*



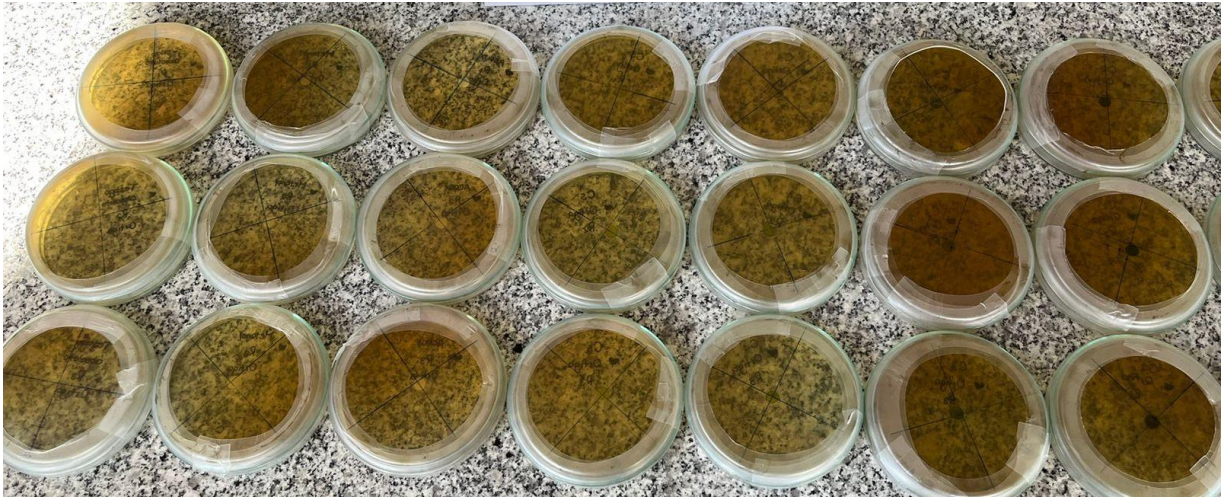
## Anexo 19

*Muestras para la evaluación antifúngica in vitro con extracto de Urtica dioica*




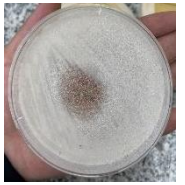




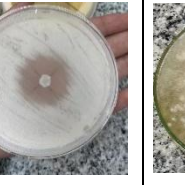

## Anexo 20

*Muestras para la evaluación antifúngica in vitro con extracto de Solanum nigrum*








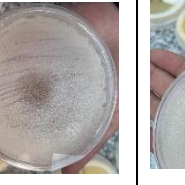
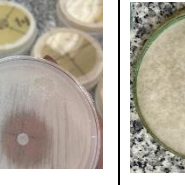

## Anexo 21

*Muestras de halo de inhibición de Colletotrichum spp. con extracto de Urtica dioica*

C1	C2	C3	C4	C5	SO	CP	Testigo
							

## Anexo 22

*Muestras de halo de inhibición de Colletotrichum spp. con extracto de Solanum nigrum*

C1	C2	C3	C4	C5	SO	CP	Testigo
							

## Anexo 23

### Caracterización molecular



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

#### Informe de Resultados

**Nombre del Proyecto:** Identificación molecular de hongos – Andrea Erazo Pozo

**Informe No.:** A-587.2

**Técnico Responsable:** Sofía Garrido, Ing.

**Fecha:** 19/07/2024

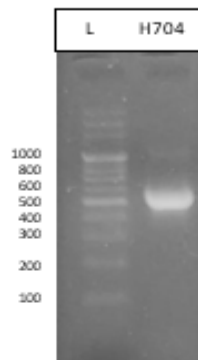
#### Resumen de Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesoión
H704	N/A	607	100	<i>Colletotrichum tamarilloi</i>	ITS	100	<a href="#">NR 111732.1</a>

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**

## Anexo 24

Toma de datos durante 4 días de crecimiento de halo de inhibición de extracto *Urtica dioica* contra *C. tamarilloi*

	Tratamiento	Dia 1				Prom. Final			Dia 2				Prom. Final		
		Norte	Sur	Este	Oeste				Norte	Sur	Este	Oeste			
R 1	Urtica dioica	C 1 (500 mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,38			C 1 (500 mg/ml)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
		C 2 (250 mg/ml)	0,3	0,3	0,3	0,4	0,33			C 2 (250 mg/ml)	1,0	1,1	1,1	1,1	1,06
		C 3 (125 mg/ml)	0,2	0,2	0,3	0,3	0,25			C 3 (125 mg/ml)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
		C 4 (62,5 mg/ml)	0,1	0,1	0,2	0,2	0,15			C 4 (62,5 mg/ml)	0,9	0,9	1,0	1,0	0,95
		C 5 (31,25 mg/ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1			C 5 (31,25 mg/ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
		T. comercial	0,5	0,5	0,5	0,6	0,53			T. comercial	0,4	0,5	0,5	0,5	0,46
		Solvente orgánico	0,1	0,1	0,2	0,2	0,15			Solvente orgánico	0,2	0,2	0,3	0,3	0,25
		Dia 1							Dia 2						
R 2	Urtica dioica	C 1 (500 mg/ml)	0,3	0,3	0,3	0,4	0,33			C 1 (500 mg/ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
		C 2 (250 mg/ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,27			C 2 (250 mg/ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,22
		C 3 (125 mg/ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,18			C 3 (125 mg/ml)	0,9	1,0	1,0	1,0	0,96
		C 4 (62,5 mg/ml)	0,1	0,1	0,2	0,2	0,15			C 4 (62,5 mg/ml)	0,7	0,8	0,8	0,8	0,76
		C 5 (31,25 mg/ml)	0,1	0,1	0,2	0,2	0,15			C 5 (31,25 mg/ml)	0,6	0,6	0,7	0,7	0,65
		T. comercial	0,5	0,5	0,5	0,6	0,53			T. comercial	1,3	1,4	1,4	1,4	1,36
		Solvente orgánico	0,1	0,1	0,1	0,2	0,13			Solvente orgánico	0,3	0,3	0,3	0,3	0,28
		Dia 1							Dia 2						
R 3	Urtica dioica	C 1 (500 mg/ml)	0,3	0,3	0,4	0,4	0,35			C 1 (500 mg/ml)	1,3	1,4	1,4	1,4	1,36
		C 2 (250 mg/ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,27			C 2 (250 mg/ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
		C 3 (125 mg/ml)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,13			C 3 (125 mg/ml)	0,9	1,0	1,0	1,0	0,96
		C 4 (62,5 mg/ml)	0,1	0,1	0,2	0,2	0,15			C 4 (62,5 mg/ml)	0,4	0,5	0,5	0,5	0,46
		C 5 (31,25 mg/ml)	0,1	0,1	0,2	0,2	0,15			C 5 (31,25 mg/ml)	0,1	0,2	0,2	0,2	0,16
		T. comercial	0,4	0,4	0,4	0,5	0,43			T. comercial	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
		Solvente orgánico	0,1	0,1	0,1	0,2	0,13			Solvente orgánico	0,3	0,3	0,3	0,3	0,28

Dia 3						Dia 4					
Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Prom. Final	Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Prom. Final
C 1 (500 mg/ml)	1,7	1,7	1,7	1,7	1,68	C 1 (500 mg/ml)	2,3	2,3	2,3	2,4	2,33
C 2 (250 mg/ml)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	C 2 (250 mg/ml)	1,9	1,9	1,9	2,0	1,93
C 3 (125 mg/ml)	0,9	0,9	1,0	1,0	0,95	C 3 (125 mg/ml)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
C 4 (62,5 mg/ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	C 4 (62,5 mg/ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,82
C 5 (31,25 mg/ml)	0,4	0,5	0,5	0,5	0,46	C 5 (31,25 mg/ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,59
T. comercial	1,6	1,6	1,6	1,7	1,63	T. comercial	2,2	2,2	2,2	2,2	2,18
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Dia 3						Dia 4					
Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Prom. Final	Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Prom. Final
C 1 (500 mg/ml)	1,5	1,5	1,5	1,6	1,53	C 1 (500 mg/ml)	2,1	2,1	2,1	2,2	2,13
C 2 (250 mg/ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,49	C 2 (250 mg/ml)	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
C 3 (125 mg/ml)	1,1	1,1	1,1	1,2	1,13	C 3 (125 mg/ml)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,61
C 4 (62,5 mg/ml)	0,9	0,9	0,9	0,9	0,91	C 4 (62,5 mg/ml)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,29
C 5 (31,25 mg/ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	C 5 (31,25 mg/ml)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
T. comercial	1,9	1,9	1,9	1,9	1,88	T. comercial	2,5	2,6	2,6	2,6	2,56
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Dia 3						Dia 4					
Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Prom. Final	Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Prom. Final
C 1 (500 mg/ml)	1,7	1,7	1,7	1,7	1,71	C 1 (500 mg/ml)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,39
C 2 (250 mg/ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,47	C 2 (250 mg/ml)	2,1	2,1	2,1	2,1	2,07
C 3 (125 mg/ml)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,08	C 3 (125 mg/ml)	1,5	1,6	1,6	1,6	1,56
C 4 (62,5 mg/ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,61	C 4 (62,5 mg/ml)	0,8	0,8	0,9	0,9	0,84
C 5 (31,25 mg/ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,31	C 5 (31,25 mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,39
T. comercial	1,7	1,7	1,7	1,8	1,73	T. comercial	2,4	2,4	2,4	2,4	2,38
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

## Anexo 25

Datos promedio de laboratorio de Ortiga (*Urtica dioica L.*)

Datos de laboratorio						
Tesisista: Andrea Erazo						
Especie vegetal		Ortiga ( <i>Urtica dioica L.</i> )				
Inhibición		Hongo patógeno <i>C. tamarilloi</i>				
Orden	Tratamiento	Repetición	inhibición día 1	inhibición día 2	inhibición día 3	inhibición día 4
1	T1	R1	0,38	1,30	1,68	2,33
2	T2	R1	0,33	1,06	1,40	1,93
3	T3	R1	0,25	0,70	0,95	1,30
4	T4	R1	0,15	0,95	0,60	0,82
5	T5	R1	0,10	0,60	0,46	0,59
6	T6	R1	0,53	0,46	1,63	2,18
7	T7	R1	0,15	0,25	0,40	0,40
8	T8	R1	0,00	0,00	0,00	0,00
9	T1	R2	0,33	1,20	1,53	2,13
10	T2	R2	0,27	1,22	1,49	2,10
11	T3	R2	0,18	0,96	1,13	1,61
12	T4	R2	0,15	0,76	0,91	1,29
13	T5	R2	0,15	0,65	0,80	1,10
14	T6	R2	0,53	1,36	1,88	2,56
15	T7	R2	0,13	0,28	0,40	0,40
16	T8	R2	0,00	0,00	0,00	0,00
17	T1	R3	0,35	1,36	1,71	2,39
18	T2	R3	0,27	1,20	1,47	2,07
19	T3	R3	0,13	0,96	1,08	1,56
20	T4	R3	0,15	0,46	0,61	0,84
21	T5	R3	0,15	0,16	0,31	0,39
22	T6	R3	0,43	1,30	1,73	2,38
23	T7	R3	0,13	0,28	0,40	0,40
24	T8	R3	0,00	0,00	0,00	0,00

## Anexo 26

Toma de datos durante 4 días de crecimiento de halo de inhibición de extracto Hierba mora contra *C. tamarilloi*

R1	<i>Solanum nigrum</i>	Tratamiento	Normal	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
		C 1 (500 mg/ml)	0,6	0,6	0,7	0,6	0,63
C 2 (250 mg/ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,58		
C 3 (125 mg/ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,50		
C 4 (62,5 mg/ml)	0,4	0,5	0,4	0,4	0,43		
C 5 (31,25 mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,41		
T.	0,8	0,8	0,8	0,8	0,78		
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,5	0,43		

R2	<i>Solanum nigrum</i>	Tratamiento	Normal	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
		C 1 (500 mg/ml)	0,7	0,6	0,6	0,6	0,63
C 2 (250 mg/ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,58		
C 3 (125 mg/ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,50		
C 4 (62,5 mg/ml)	0,4	0,5	0,4	0,4	0,43		
C 5 (31,25 mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,41		
T.	0,8	0,8	0,8	0,8	0,78		
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,5	0,43		

R2	<i>Solanum nigrum</i>	Tratamiento	Normal	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
		C 1 (500 mg/ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,58
C 2 (250 mg/ml)	0,5	0,6	0,5	0,5	0,52		
C 3 (125 mg/ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,48		
C 4 (62,5 mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,40		
C 5 (31,25 mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,40		
T.	0,9	0,8	0,8	0,8	0,83		
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,38		

R3	<i>Solanum nigrum</i>	Tratamiento	Normal	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
		C 1 (500 mg/ml)	0,6	0,6	0,6	0,7	0,60
C 2 (250 mg/ml)	0,5	0,5	0,5	0,6	0,52		
C 3 (125 mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,3	0,38		
C 4 (62,5 mg/ml)	0,5	0,5	0,4	0,4	0,42		
C 5 (31,25 mg/ml)	0,4	0,5	0,4	0,4	0,40		
T.	0,7	0,7	0,6	0,7	0,68		
Solvente orgánico	0,3	0,4	0,4	0,4	0,38		

R3	<i>Solanum nigrum</i>	Tratamiento	Normal	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
		C 1 (500 mg/ml)	0,6	0,6	0,6	0,7	0,60
C 2 (250 mg/ml)	0,5	0,5	0,5	0,6	0,52		
C 3 (125 mg/ml)	0,3	0,4	0,4	0,4	0,38		
C 4 (62,5 mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,5	0,42		
C 5 (31,25 mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,5	0,40		
T.	0,6	0,7	0,7	0,7	0,68		
Solvente orgánico	0,3	0,4	0,4	0,4	0,38		

Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
C 1(500 mg/ml)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,27
C 2(250 mg/ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,22
C 3(125 mg/ml)	1,1	1,1	1,2	1,2	1,14
C 4(62,5 mg/ml)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,07
C 5(31,25 mg/ml)	1,0	1,0	1,1	1,1	1,05
T.	1,4	1,4	1,4	1,4	1,42
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,5	0,43

Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
C 1(500 mg/ml)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,38
C 2(250 mg/ml)	1,3	1,3	1,3	1,4	1,33
C 3(125 mg/ml)	1,2	1,2	1,3	1,3	1,25
C 4(62,5 mg/ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,18
C 5(31,25 mg/ml)	1,1	1,2	1,2	1,2	1,16
T.	1,5	1,5	1,5	1,6	1,53
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,5	0,43

Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
C 1(500 mg/ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,20
C 2(250 mg/ml)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,12
C 3(125 mg/ml)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,07
C 4(62,5 mg/ml)	1,0	1,0	1,0	1,1	1,03
C 5(31,25 mg/ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,02
T.	1,4	1,4	1,4	1,4	1,40
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,37

Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
C 1(500 mg/ml)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,31
C 2(250 mg/ml)	1,2	1,2	1,2	1,3	1,23
C 3(125 mg/ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,18
C 4(62,5 mg/ml)	1,1	1,1	1,2	1,2	1,14
C 5(31,25 mg/ml)	1,1	1,1	1,1	1,2	1,13
T.	1,5	1,5	1,5	1,5	1,51
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,37

Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
C 1(500 mg/ml)	1,2	1,2	1,3	1,3	1,24
C 2(250 mg/ml)	1,1	1,2	1,2	1,2	1,16
C 3(125 mg/ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,02
C 4(62,5 mg/ml)	1,0	1,1	1,1	1,1	1,06
C 5(31,25 mg/ml)	1,0	1,0	1,1	1,1	1,04
T.	1,3	1,3	1,3	1,3	1,32
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,38

Tratamiento	Norte	Sur	Este	Oeste	Pro m. Final
C 1(500 mg/ml)	1,3	1,3	1,4	1,4	1,35
C 2(250 mg/ml)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,27
C 3(125 mg/ml)	1,1	1,1	1,1	1,2	1,13
C 4(62,5 mg/ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,17
C 5(31,25 mg/ml)	1,1	1,1	1,2	1,2	1,15
T.	1,4	1,4	1,4	1,5	1,43
Solvente orgánico	0,4	0,4	0,4	0,4	0,38

**Anexo 27***Datos promedio de laboratorio de Hierba mora (Solanum nigrum)*

Datos de laboratorio						
Tesisista: Andrea Erazo						
Especie vegetal		Hierba Mora ( <i>Solanum nigrum</i> L.)				
Inhibición		Hongo patógeno <i>Colletotrichum tamarilloi</i>				
Orden	Tratamiento	Repetición	Inhibición día 1	Inhibición día 2	Inhibición día 3	Inhibición día 4
1	T1	R1	0,63	0,63	1,27	1,38
2	T2	R1	0,58	0,58	1,22	1,33
3	T3	R1	0,5	0,50	1,14	1,25
4	T4	R1	0,43	0,43	1,07	1,18
5	T5	R1	0,41	0,41	1,05	1,16
6	T6	R1	0,78	0,78	1,42	1,53
7	T7	R1	0,43	0,43	0,43	0,43
8	T8	R1	0	0,00	0,00	0,00
9	T1	R2	0,58	0,56	1,20	1,31
10	T2	R2	0,52	0,48	1,12	1,23
11	T3	R2	0,48	0,43	1,07	1,18
12	T4	R2	0,4	0,39	1,03	1,14
13	T5	R2	0,4	0,38	1,02	1,13
14	T6	R2	0,83	0,76	1,40	1,51
15	T7	R2	0,38	0,37	0,37	0,37
16	T8	R2	0	0,00	0,00	0,00
17	T1	R3	0,6	0,60	1,24	1,35
18	T2	R3	0,52	0,52	1,16	1,27
19	T3	R3	0,38	0,38	1,02	1,13
20	T4	R3	0,42	0,42	1,06	1,17
21	T5	R3	0,4	0,40	1,04	1,15
22	T6	R3	0,68	0,68	1,32	1,43
23	T7	R3	0,38	0,38	0,38	0,38
24	T8	R3	0	0,00	0,00	0,00

