



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Unidad de Integración Curricular
previo a la obtención del título de
Ingeniera Agropecuaria

Título de la Unidad de Integración Curricular:

“Efecto de seis extractos vegetales sobre el desarrollo del agente causal de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.)”

Autora:

Lili Gabriela Risco Soledispa

Tutora de la Unidad de Integración Curricular:

Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez, M. Sc.

Mocache – Los Ríos – Ecuador

2019



La presente investigación fue desarrollada como parte del proyecto de investigación: APROVECHAMIENTO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE PLANTAS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN CULTIVOS DE INTERÉS ECONÓMICO (Código PFOC 5-9-2017), dentro del marco de la Quinta Convocatoria Extraordinaria del Fondo Competitivo de Investigación Científica y Tecnológica (FOCICYT), de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Bajo la dirección de la Ing. Raquel Guerrero Chuez.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Lili Gabriela Risco Soledispa**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Atentamente;



Lili Gabriela Risco Soledispa
Autora

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

La suscrita **Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez, M. Sc.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **Lili Gabriela Risco Soledispa**, realizó el Proyecto de Investigación titulado “**Efecto de seis extractos vegetales sobre el desarrollo del agente causal de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.)**”, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Atentamente;



Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez, M. Sc.
Tutora de la Unidad de Integración Curricular

REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

La suscrita **Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez, M. Sc.** , Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Tutora de la Unidad de Integración Curricular titulado “**Efecto de seis extractos vegetales sobre el desarrollo del agente causal de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.)**”, perteneciente a la estudiante de la carrera de Ingeniería Agropecuaria **Lili Gabriela Risco Soledispa**, CERTIFICA: el cumplimiento de los parámetros establecidos por el SENESCYT, y se evidencia el reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico (URKUND) con un porcentaje de coincidencia del 9 %.



Urkund Analysis Result

Analysed Document:	Risco - Proyecto de Investigacion urkund.docx (D59595347)
Submitted:	25/11/2019 16:11:00
Submitted By:	lili.risco2013@uteq.edu.ec
Significance:	9 %

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Raquel Verónica Guerrero Chuez", written over a dashed horizontal line.

Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez, M. Sc.
Tutora de la Unidad de Integración Curricular



UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Título:

“Efecto de seis extractos vegetales sobre el desarrollo del agente causal de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.)”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título
de:

Ingeniera Agropecuaria

Aprobado por:

Ing. Gregorio Vásconez Montúfar, PhD.
Presidente del Tribunal

Ing. Erick Egúez Enríquez, M. Sc.
Miembro del Tribunal

Ing. Marlon Monge Freile, M. Sc.
Miembro del Tribunal

Mocache – Los Ríos – Ecuador

2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar a mi lado dándome sus bendiciones y no permitir que me rinda.

A mis padres que siempre han estado a mi lado durante toda mi etapa de estudios y darme su amor y consejos para no decaer y continuar hasta cumplir mis metas.

A mi tutora de tesis Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez y al Ing Erick Eguez por sus consejos y colaboración a lo largo del desarrollo de la presente investigación.

A mis compañeros de clase con quienes hemos compartido muchos momentos y experiencias.

A mi compañero de vida Ing. Adib Chagerben por cada palabra de motivación en mis momentos difíciles.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la UTEQ, que con sus enseñanzas he logrado obtener conocimientos que serán de gran ayuda en mi vida profesional.

Lili Gabriela Risco Soledispa

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de investigación a Dios por ser mi guía y gracias a él he logrado concluir mi carrera.

A mis padres Héctor Risco y Lili Soledispa porque ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona.

A mi único hermano Jhon Risco el que sigue mis pasos él es y será mi motor para continuar en la vida.

Lili Gabriela Risco Soledispa

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de seis extractos hidroetanólicos de plantas sobre el desarrollo *in vitro* de *Moniliophthora roreri*, fitopatógeno de cacao (*Theobroma cacao* L.). Los extractos de *Amaranthus blado*, *Cyperus odoratus*, *Euphorbia hirta*, *Tagetes minuta*, *Scoparia dulcis* y *Portulaca oleracea* fueron usados en tres concentraciones (10, 20 y 30%) para modificar medio papa dextrose agar (PDA). Se evaluaron germinación de esporas y crecimiento de micelio de *M. roreri*. Adicionalmente, a través del microscopio se observaron las estructuras de las hifas del patógeno después de su cultivo en medio líquido papa dextrosa modificado con los extractos. Los resultados revelaron que el extracto de *A. blado* en todas las concentraciones inhibieron el 100% de la germinación de esporas, en los tratamientos restantes al incrementar la concentración de los extractos de 10% al 30% se incrementó la capacidad de restringir la germinación de las esporas, con la excepción de *S. dulcis*. La germinación en los medios modificados con los otros extractos decreció cuando la concentración se incrementó de 20 al 30%. Resultados similares se alcanzaron en el test de crecimiento miceliar, en donde *A. blado* y *E. hirta* mostraron tener el mayor efecto sobre el crecimiento de *M. roreri*. Los extractos estudiados no solo inhibieron el desarrollo del micelio, sino que también provocaron la muerte del mismo, alteraciones en las hifas y en las estructuras celulares de *M. roreri*. Las especies *A. blado* y *E. hirta* fueron quienes mostraron mayor efecto sobre la germinación y desarrollo de *M. roreri*.

Palabras claves: inhibición, crecimiento, extractos vegetales, *M. roreri*.

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the effect of six hydroethanolic plant extracts on the *in vitro* development of the *Moniliophthora roreri*, phytopathogen of cocoa (*Theobroma cacao* L.). Extracts of *Amaranthus blado*, *Cyperus odoratus*, *Euphorbia hirta*, *Tagetes minuta*, *Scoparia dulcis* and *Portulaca oleracea*, were used in three concentrations (10, 20 and 30%) to modify potato dextrose agar (PDA). Spore germination and mycelium growth of *M. roreri* were evaluated. In addition, the structures of hyphae of *M. roreri* were observed at microscope after they growth in modified potato dextrose media with the extracts. The results showed that the extract of *A. blado* in all the concentrations inhibited 100% germination of *M. roreri* spores, in the other treatments increasing the concentration of 10 to 30% increased the ability to restrict germination of spores, with the exception of *S. dulcis*. The germination in the modified media with the other extracts decreased when the concentrations increased to 20% and 30%. Similar results were reached in the mycelium growth test, *A. blado* and *E. hirta* had the mayor effect over the *M. roreri* growth. The studied extracts not only inhibited the mycelium growth, also provoked the mycelium death, alterations in the hyphae and cellular structures of *M. roreri*. The species of *A. blado* and *E. hirta* were the plant with the mayor effect over *M. roreri* germination and growth.

Keywords: inhibition, growth, plant extracts, *M. roreri*.

TABLA DE CONTENIDOS

Portada	i
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	iii
Certificación de culminación de la Unidad de Integración Curricular	iv
Reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico	v
Certificación de aprobación por Tribunal de Sustentación	vi
Agradecimientos	vii
Dedicatoria	viii
Reumen	ix
Summary	x
Tabla de contenido.....	xi
Índice de Tablas.....	xv
Índice de figuras	xv
Índice de Anexos	xv
Código Dublín	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1. Problematización.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema.....	4
1.1.3. Sistematización del problema	4
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo general.....	5
1.2.2. Objetivos específicos.....	5

1.3.	Justificación	5
CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN		7
2.1.	Marco conceptual	8
2.1.1.	Moniliasis	8
2.1.2.	Extracto hidroetanólico	8
2.1.3.	Fitopatógeno	8
2.1.4.	Compuestos antifúngicos.....	8
2.1.5.	Germinación de esporas.....	9
2.1.6.	Micelio.....	9
2.1.7.	Patógeno	9
2.1.8.	Medios de cultivo	9
2.1.9.	Esporas.....	9
2.1.10.	Extractos de plantas.....	9
2.2.	Marco referencial	10
2.2.1.	Cultivo de cacao.....	10
2.2.2.	Moniliasis	10
2.2.2.1.	Agente causal	11
2.2.2.2.	Descripción taxonómica	11
2.2.2.3.	Síntomas y ciclo de la enfermedad.....	11
2.2.2.4.	Manejo de la enfermedad.....	13
2.2.3.	Uso de extractos de plantas para el control de enfermedades.....	15
2.2.4.	Plantas utilizadas en el proyecto de investigación	17
2.2.4.1.	Bledo (<i>Amaranthus blado</i>).....	17
2.2.4.2.	Teatina (<i>Scoparia dulcis</i>).....	17
2.2.4.3.	Coquito (<i>Cyperus odoratus</i>)	18

2.2.4.4. Rosa de muerto (<i>Tagetes minuta</i>)	18
2.2.4.5. Lechosa (<i>Euphorbia hirta</i>)	18
2.2.4.6. Verdolaga (<i>Portulaca oleracea</i>)	19
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	20
3.1. Localización de la investigación	21
3.2. Tipo de investigación	21
3.3. Métodos de investigación	21
3.4. Fuentes de recopilación de la investigación	21
3.5. Diseño de la investigación	22
3.5.1. Factores estudiados	22
3.5.1.1. Concentraciones	22
3.5.1.2. Extractos	23
3.5.2. Tratamientos estudiados	23
3.6. Procedimiento experimental	24
3.6.1. Cultivo y conservación del patógeno	24
3.6.2. Obtención de los extractos vegetales.....	24
3.7. Variables evaluadas.....	26
3.7.1. Efecto de los extractos vegetales sobre el porcentaje de germinación de esporas	26
3.7.2. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento y viabilidad del patógeno	27
3.7.3. Efecto de extractos vegetales sobre la estructura del micelio de <i>M. roreri</i>	28
3.8. Recursos humanos y materiales	29
3.8.1. Recursos humanos.....	29
3.8.2. Recursos materiales.....	29
3.8.2.1. Materiales	29

3.8.2.2. Equipos	30
3.8.2.3. Insumos.....	30
3.8.2.4. Materia prima.....	30
3.8.2.5. Materiales de oficina	30
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Resultados.....	33
4.1.1. Efecto de los extractos vegetales sobre el porcentaje de germinación de esporas.	33
4.1.2. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento y viabilidad micelial del patógeno.....	35
4.1.3. Efecto de extractos vegetales sobre la estructura del micelio de <i>M. roreri</i>	39
4.2. Discusión	41
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
5.1. Conclusiones	44
5.2. Recomendaciones.....	44
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA	45
6.1. Referencias bibliográficas	46
CAPÍTULO VII. ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Esquema del análisis de varianza utilizado en el ensayo	22
Tabla 2.	Descripción de los tratamientos evaluados	23
Tabla 3.	Valores utilizados para evaluar la estructura del micelio de <i>M. roreri</i>	29
Tabla 4.	Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas del patógeno <i>M. roreri</i>	34
Tabla 5.	Efecto de las concentraciones de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas <i>in vitro</i> del patógeno <i>M. roreri</i>	34
Tabla 6.	Efecto de los extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> del patógeno <i>M. roreri</i>	35
Tabla 7.	Efecto de las concentraciones de los extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> del patógeno <i>M. roreri</i>	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Flujograma del proceso de investigación	25
Figura 2.	Cultivos de <i>M. roreri</i> en medio PDA enmendado con extractos de <i>E. hirta</i> al 10% (1), 20% (2) y 30% (3); <i>T. minuta</i> al 10% (4), 20% (5) y 30% (6); <i>A. bleo</i> al 10% (7), 20% (8) y 30% (9); <i>P. oleracea</i> al 10% (10), 20% (11) y 30% (12); <i>C. odoratus</i> al 10% (13), 20% (14) y 30% (15); y, <i>S. dulcis</i> al 10% (16), 20% (17) y 30% (18).	37
Figura 3.	Estructura del micelio de <i>M. roreri</i> en medio líquido PDA sin enmendar (a) y medios enmendados con <i>T. minuta</i> al 10% (b), <i>S. dulcis</i> al 10% (c), <i>C. odoratus</i> al 10% (d) y <i>P. oleracea</i> al 10% (e).....	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Filtrado de extractos (i), eliminación del alcohol de los extractos en el rotoevaporador (ii), incubación de los cultivos de <i>M. roreri</i> (iii), registro de diámetro de la colonia de <i>M. roreri</i> (iv), cajas Petri conteniendo medios de cultivo enmendado con extractos y colonias de <i>M. roreri</i> (v) y evaluación microscópica de la estructura micelial de <i>M. roreri</i>	51
----------	--	----

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	Efecto de seis extractos vegetales sobre el desarrollo del agente causal de la Moniliasis (<i>Moniliophthora roreri</i> Cif & Par) del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)
Autor:	Lili Gabriela Risco Soledispa
Palabras clave:	Inhibición, crecimiento, extractos vegetales, <i>M. roreri</i> .
Fecha de publicación	
Editorial:	
Resumen:	El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de seis extractos hidroetanólicos de plantas sobre el desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Moniliophthora roreri</i>, fitopatógeno de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.). Los extractos de <i>Amaranthus bleado</i>, <i>Cyperus odoratus</i>, <i>Euphorbia hirta</i>, <i>Tagetes minuta</i>, <i>Scoparia dulcis</i> y <i>Portulaca oleracea</i> fueron usados en tres concentraciones (10, 20 y 30%) para modificar medio papa dextrose agar (PDA). Se evaluaron germinación de esporas y crecimiento de micelio de <i>M. roreri</i>. Adicionalmente, a través del microscopio se observaron las estructuras de las hifas del patógeno después de su cultivo en medio líquido papa dextrosa modificado con los extractos. Los resultados revelaron que el extracto de <i>A. bleado</i> en todas las concentraciones inhibieron el 100% de la germinación de esporas, en los tratamientos restantes al incrementar la concentración de los extractos de 10% al 30% se incrementó la capacidad de restringir la germinación de las esporas, con la excepción de <i>S. dulcis</i>. La germinación en los medios modificados con los otros extractos decreció cuando la concentración se incrementó de 20 al 30%. Resultados similares se alcanzaron en el test de crecimiento miceliar, en donde <i>A. bleado</i> y <i>E. hirta</i> mostraron tener el mayor efecto sobre el crecimiento de <i>M. roreri</i>. Los extractos estudiados no solo inhibieron el desarrollo del micelio, sino que también provocaron la muerte del mismo, alteraciones en las hifas y en las estructuras celulares de <i>M. roreri</i>. Las especies <i>A. bleado</i> y <i>E. hirta</i> fueron quienes mostraron mayor efecto sobre la germinación y desarrollo de <i>M. roreri</i>.
Descripción:	
Url	

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta originaria de los trópicos húmedos de América, su centro de origen se cree estar situado en el noroeste de América del sur, en la zona amazónica. El cacao es de importancia relevante en la economía del Ecuador, por ser un producto de exportación que a su vez constituye una fuente de empleo para un alto porcentaje de habitantes de los sectores rurales y urbanos. Esta especie representa uno de los rubros más importantes para el país, aportando el 5% de la producción mundial. Adicionalmente, es uno de los cultivos tradicionales de interés comercial en la provincia de Los Ríos (1).

Entre las enfermedades más frecuentes que afectan la producción y calidad de las cosechas de este cultivo se destacan: la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par), mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), escoba de bruja provocada (*Moniliophthora perniciosa*). Las tres enfermedades atacan a las mazorcas desde estadíos tempranos, afectando su desarrollo y por ende el potencial productivo del cultivo. A pesar de la importancia económica del cultivo y del impacto negativo de los patógenos sobre las cosechas hasta el momento no existe una herramienta de control 100 % efectiva (2).

Actualmente existe una creciente preocupación pública sobre el nivel de residuos de pesticidas en los alimentos alentando a los investigadores a buscar soluciones alternativas al uso de pesticidas sintéticos (3). La seguridad alimentaria se ha convertido en una preocupación compartida entre los países desarrollados y en desarrollo, por lo que es imperativo dirigir la investigación actual hacia la utilización de nuevas alternativas de sustratos vegetales para promover la seguridad y sostenibilidad de la producción (4).

Las plantas tienen capacidad para sintetizar metabolitos secundarios aromáticos, como fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarina (4). Estos grupos de compuestos muestran un efecto antimicrobiano y sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra microorganismos patógenos. Algunas plantas contienen componentes que son tóxicos para los patógenos que cuando se extraen y se aplican en cultivos infestados pueden realizar un control efectivo de las enfermedades, a estos productos se los llaman (pesticidas botánicos o productos botánicos) (3).

Considerando lo anterior, la presente investigación pretende explorar el potencial antifúngico *in vitro* de extractos vegetales de seis plantas locales contra el hongo fitopatógeno *M. royeri*, para de este modo aprovecharlas para su control, dándole una mayor apreciación y otra perspectiva a estas plantas que comúnmente son consideradas como malezas.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problematización

1.1.1. Planteamiento del problema

En Ecuador uno de sus principales cultivos es el cacao, sin embargo, también es considerado como uno de los países de origen de la enfermedad conocida como moniliasis (*M. roreri*) del cacao. Por tanto, es una prioridad nacional desarrollar alternativas que sean amigables con los agro ecosistemas y eficaces para el control de esta enfermedad tan limitante, pero accesibles a los productores de cacao, que contribuya a disminuir su incidencia, debido a que esta enfermedad es una de las más problemáticas en el cultivo sobre todo en la época lluviosa. Esta patología sola o combinada con otras enfermedades puede llegar a disminuir la producción entre un 30 – 80 %, repercutiendo tanto en lo productivo y económico.

Aún con las inversiones que se realizan para su control (mano de obra y usos de plaguicidas), es casi imposible detener su propagación dentro del campo, debido a las condiciones climáticas del país y la elevada presión de inóculo del patógeno.

1.1.2. Formulación del problema

¿Cuál es el efecto de extractos hidroetanólicos vegetales de seis plantas sobre el desarrollo *in vitro* de *Moniliophthora roreri* fitopatógeno del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.)?

1.1.3. Sistematización del problema

- ¿Cuál es el efecto de seis extractos de plantas sobre la germinación de esporas de *M. roreri*. en condiciones *in vitro*?
- ¿Qué respuesta presenta el crecimiento y viabilidad del micelio del patógeno *M. roreri* en medios de cultivo adicionados con los seis extractos vegetales?
- ¿Qué cambios en la estructura del micelio del patógeno *M. roreri* en medios de cultivo produce la adición con los seis extractos vegetales?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de extractos hidroetanólicos vegetales de seis plantas sobre el desarrollo *in vitro* de *Moniliophthora roreri* fitopatógeno del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.).

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de seis extractos de plantas sobre la germinación de esporas de *M. roreri*. en condiciones *in vitro*.
- Evaluar el crecimiento y viabilidad del micelio del patógeno *M. roreri* en medios de cultivo adicionados con los seis extractos vegetales.
- Evaluar la estructura del micelio del patógeno *M. roreri* en medios de cultivo adicionados con los seis extractos vegetales.

1.3. Justificación

La Moniliasis es la enfermedad más difícil de controlar en el cultivo de cacao (4). Las medidas de control químico y biológico desarrolladas para la enfermedad no han sido ampliamente adoptadas por los pequeños agricultores debido a que incrementan los costos de producción (1).

El Ecuador presenta las condiciones para la diseminación de la Moniliasis, sobre todo en la época lluviosa donde presenta las características idóneas para la propagación de esta enfermedad, provocando grandes pérdidas a los productores, que aun tomando las medidas preventivas necesarias se ven afectados en cada cosecha. Los productos químicos sintéticos usados para el manejo de *M. roreri* no son lo suficientemente efectivos para controlar la enfermedad y a su vez provocan un deterioro de la calidad ambiental y afectan a la salud humana (5).

La investigación se realizó con la finalidad de identificar plantas locales, algunas catalogadas como malezas, que tengan potencial para el control de *M. royeri* en el cultivo de cacao, las plantas seleccionadas para el estudio en algunos casos presentan reportes internacionales y locales sobre su uso como antisépticos o antiinflamatorios, lo que indicaría que potencialmente contengan compuestos con actividad antimicrobiana. Las plantas utilizadas en el presente estudio son: bleo (*Amaranthus bleo*), coquito (*Cyperus odoratus*), lechosa (*Euphorbia hirta*), rosa de muerto (*Tagetes minuta*), teatina (*Scoparia dulcis*) y verdolaga (*Portulaca oleracea*).

El conocimiento obtenido permitirá a futuro incursionar en la investigación del efecto de los extractos sobre este y otros patógenos a nivel de campo, así como también la identificación de los compuestos presentes en los extractos estudiados.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

Se presentan a continuación algunos de los términos de mayor relevancia empleados en el desarrollo de la investigación, con la finalidad de conocer su significado y que sean comprendidos con mayor facilidad.

2.1.1. Moniliasis

Es una enfermedad de importancia económica en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), el agente causal de la Moniliasis es el hongo *M. roreri* que se disemina fácilmente con la acción del aire, lluvias, animales y las personas. La infección se da principalmente en las primeras etapas de desarrollo del fruto. La penetración del hongo ocurre directamente a través de la epidermis de los frutos llegando a destruir la calidad de las semillas (5).

2.1.2. Extracto hidroetanólico

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol y agua, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico (7).

2.1.3. Fitopatógeno

Organismo capaz de causar enfermedad o cualquier proceso patológico en una especie vegetal (8).

2.1.4. Compuestos antifúngicos

Cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (9).

2.1.5. Germinación de esporas

Es el proceso por el cual las esporas pasan a formar células vegetativas, el cual se lleva a cabo cuando se las coloca en el medio adecuado y se requiere en muchos casos la disponibilidad, entre otros, de glucosa, aminoácidos y nucleósidos (10).

2.1.6. Micelio

Es el cuerpo vegetativo de un hongo, el cual consiste de una red de filamentos profusamente ramificados conocidos como hifas, y una masa de hifas (11).

2.1.7. Patógeno

Es un agente infeccioso que puede provocar una enfermedad a su huésped. Este término se emplea normalmente para describir microorganismos como los virus, bacterias y hongos, entre otros. Estos agentes pueden perturbar la fisiología normal de plantas (12).

2.1.8. Medios de cultivo

Es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos (13).

2.1.9. Esporas

Son el medio de dispersión de los hongos hacia nuevos lugares, y algunas de ellas ayudan al hongo a sobrevivir en condiciones adversas, como la deshidratación o la congelación (14).

2.1.10. Extractos de plantas

Son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal (14).

2.2. Marco referencial

2.2.1. Cultivo de cacao

El árbol del cacao está presente en los bosques húmedos tropicales con clima cálido y a una altitud de hasta 500 metros sobre el nivel del mar. Es un pequeño árbol de cuatro a ocho metros de altura, que en condiciones silvestres puede alcanzar hasta los diez metros, si crece con buena sombra (10).

Sus frutos, denominados comúnmente mazorcas, son bayas que presentan una coloración amarillo-rojiza, son de forma alargada, con surcos de hasta 20 cm de largo, contienen de 30 a 40 semillas de color marrón-rojizo al exterior y están cubiertas de una pulpa blanca dulce comestible (10)

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es de gran importancia en la economía del Ecuador, por ser un rubro prometedor y que constituye una fuente de empleo para un alto porcentaje de habitantes de los sectores rurales y urbanos (11). Es de vital importancia para la balanza comercial del mismo, este rubro se encuentra en el cuarto puesto de las exportaciones no petroleras del mismo (12).

2.2.2. Moniliasis

La Moniliasis del cacao es potencialmente la enfermedad más destructiva de este cultivo (13), está actualmente distribuida en Belice, Bolivia, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú y Ecuador (14). La enfermedad fue por primera vez reportada por el fitopatólogo James B. Rorer en 1918.

La enfermedad puede llegar a causar pérdidas superiores al 50% de la producción. Evaluaciones, en plantaciones con bajo nivel de tecnología han revelado que la pérdida de mazorcas puede llegar a niveles superiores al 80% (15).

2.2.2.1. Agente causal

El agente causal es el hongo *Moniliophthora roreri* que se describió originalmente por Ciferri y Parodi en 1933, clasificándolo como *Monilia roreri*, sin embargo, Evans y su grupo de investigadores en el año 2007 observaron características miceliales típicas de Basidiomycetes, por lo que decidieron crear un nuevo nombre para denominar la especie con el nombre de *Moniliophthora roreri*. Mediante técnicas moleculares se confirmó que el hongo es un Basidiomycete perteneciente al orden Agaricales. Posteriormente, confirmaron la ubicación de *M. roreri* dentro de la familia *Tricholomataceae* (13).

2.2.2.2. Descripción taxonómica

La taxonomía del fitopatógeno causante de la Moniliasis del cacao perteneciente es la siguiente:

Clase: Deuteromycetes

Orden: Hyphales

Familia: Moniliaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *roreri* (16).

M. roreri es un patógeno que tiene dos fases: una parasítica en la que crece activamente seguida de una fase necrofítica en los tejidos secos y muertos del hospedero. El micelio del hongo es monocariótico que luego se vuelve dicariótico en la etapa saprófita del patógeno. Las esporas usualmente son redondas que con el tiempo se vuelven globosas o subglobosas de 8-15 µm tienen una pared celular gruesa y su color poder ir de hialinas a marrones (14).

2.2.2.3. Síntomas y ciclo de la enfermedad

Durante la fase biotrófica de la enfermedad los únicos síntomas observados son las malformaciones de las mazorcas, sin embargo, no ocurre en todas las mazorcas infectadas. El daño externo es caracterizado por una necrosis, deformación y pudrición en mazorcas, aunque algunos frutos de 60 y 80 días pueden completar su desarrollo sin síntomas externos, pero con el tejido interno necrosado. Esto conlleva a la muerte del fruto, con un color café

oscuro, para luego cubrirse de una “felpa” de color crema, que son las esporas del hongo (15).

El daño interno causado por la enfermedad puede ser más grave que el externo, pudiendo llegar a perderse casi todas las almendras, sin importar la edad del fruto. Los tejidos centrales, pulpa, semillas y algunas veces la cáscara, forman una sola masa en donde los tejidos son rodeados por una sustancia acuosa debido a la descomposición de ellos, siendo también las almendras destruidas parcial o completamente, dependiendo del tiempo de infestación de los frutos (15).

En los frutos menores de dos meses, la infección aparece primero como pequeños abultamientos o gibas (protuberancias) en la superficie de la mazorca, incluso esa área se descolora (se vuelve más clara); después que emerge esa giba, se presenta una mancha café (chocolate) que se va extendiendo (el fruto muere poco después), empezando a aparecer una felpa blanca correspondiendo al micelio del hongo (filamentos vegetativos), para luego de tres a siete días, sobre el micelio blanquecino emerger las esporas de tipo conidias de color crema. Un síntoma adicional es la llamada madurez prematura, donde las mazorcas cambian de color dando la apariencia de madurez en frutos que todavía están inmaduros. Los frutos pequeños son susceptibles hasta las diez semanas de edad (15).

La sobrevivencia del patógeno empieza en los residuos de cosecha (mazorcas contaminadas). Luego las conidias son diseminadas por el viento y la lluvia, ocurriendo también contaminación de frutos o mazorcas con moniliasis de una plantación a otra. La diseminación de las conidias es realizada por el viento, pudiendo el agua de lluvia tener un papel importante en las infecciones a corta distancia en la copa del cacao. Además, debido al movimiento producido por las labores de cosecha las esporas se movilizan en el aire y bajo condiciones propicias de humedad y temperatura, infectan constantemente los frutos que recién están formándose. La mayor cantidad de esporas de moniliasis se encuentran a un metro de altura en las plantas de cacao (16).

Las conidias se depositan sobre el fruto, germinan si hay agua o mueren por la radiación/desecación; estas al germinar pueden penetrar directamente a la cáscara del fruto. Su penetración ocurre directamente a través de las estomas, creciendo entre las células del córtex, produciendo conidias dentro y en la superficie de los frutos. Una de las características

del patógeno es su largo período de incubación antes de aparecer los síntomas. El tiempo de infección puede ser de 3 a 8 semanas, pudiendo variar según la edad del fruto, la severidad del ataque, la susceptibilidad del árbol y las condiciones de clima, principalmente presencia de lluvias, mientras que, en frutos tiernos, en días lluviosos y calurosos, el período de incubación se acorta a tres semanas (13).

2.2.2.4. Manejo de la enfermedad

En una plantación de cacao desatendida técnicamente, la Moniliasis puede destruir hasta el 100 % en los frutos (17), lo que hace antieconómico el cultivo aun en épocas de buenos precios en el mercado. Por el contrario, cuando se realizan prácticas de manejo como control de malezas, podas a los árboles de cacao, regulación de sombra, hace remoción frecuente de frutos enfermos y mejora los drenajes, entre otras prácticas, las pérdidas en la producción pueden reducirse considerablemente (16).

Para tener estos bajos niveles de incidencia de la enfermedad, es necesario no desatender las otras labores agrícolas como deshijes, la chapia, el despunte de ramas y eliminación de aquellas ramas entrecruzadas, cosechas frecuentes de frutos sanos y enfermos y finalmente la fertilización, ya sea con abonos orgánicos o químicos, teniendo como base los resultados del análisis químico del suelo (17).

Existen diversas técnicas de manejo que permiten realizar un control parcial de la enfermedad. Todas tienen como objetivo eliminar por completo el inóculo del patógeno, sin embargo, sólo llevan a reducir los daños. Los métodos usados varían sólo en el proceso y la herramienta base, otorgando un nombre según el modo de aplicación. Entre los más comunes se encuentran (17):

- **Control cultural**

Para un control satisfactorio de la enfermedad se deben realizar podas frecuentes y suaves a los árboles, controlar la sombra del cultivo y remover los frutos con síntomas para su posterior incineración. Adicionalmente, se propone una frecuencia con la que se deberían hacer las remociones de los frutos, teniendo en cuenta los síntomas de la enfermedad, la época del año y la metodología de poda. Se recomienda entonces, que la remoción de frutos

con síntomas se haga cada siete días, para evitar así que el hongo alcance la fase de esporulación y diseminación de las esporas a frutos sanos. Finalmente, es factible hacer podas de mantenimiento, dos veces al año, justo después de la cosecha, para incrementar el número de flores y frutos en los árboles (19).

- **Control químico**

Para el control de la moniliasis tradicionalmente se han empleado productos protectantes, con una eficiencia limitada. No obstante, se han venido enriqueciendo con sulfato de cobre en dosis de 2 kg/ha y protectantes orgánicos, lo que muestra una reducción en la incidencia de la enfermedad. Estos productos deben ser aplicados en cultivos con alta densidad, semanalmente, durante tres meses, e iniciando en los picos más altos de floración. Por otro lado, los fungicidas sistémicos pueden mejorar la eficiencia en el control de *M. roreri* pero incrementan los costos de producción (19).

- **Control biológico**

Se basa en la implementación de organismos vivos (microorganismos) como herramienta base en la erradicación o reducción del inóculo de un patógeno. Se emplean organismos antagonistas nativos para la inhibición del crecimiento del patógeno. Este tipo de control debe ser utilizado conjuntamente con otros métodos. Se han obtenido resultados promisorios utilizando microorganismos como *Trichoderma sp.*, *Clonostachys rosea* y *C. byssicola* para controlar *M. roreri* (19).

- **Control genético**

El control de enfermedades fúngicas en utilización de clones resistentes, sin duda, la alternativa más atractiva para los agricultores ya que por este método se reducen drásticamente los costos de producción y se favorece el medio ambiente. No obstante, hasta la fecha se han desarrollado muy pocos genotipos altamente resistentes a las infecciones, lo que indica que gran parte de la población vegetal actual contiene genotipos débiles, vulnerables a infecciones por patógenos. Para minimizar este riesgo, dependiendo del sitio

de cultivo, es necesario seleccionar clones de cacao adecuados, se debe implementar la siembra de híbridos o clones con mayor resistencia (17).

2.2.3. Uso de extractos de plantas para el control de enfermedades

A nivel mundial muchos investigadores han demostrado los efectos negativos que tienen los extractos vegetales de ciertas especies sobre el desarrollo de fitopatógenos (20). El empleo de plantas que son consideradas malezas resulta una fuente económica y muy importante de obtención de extractos vegetales con actividad antimicrobiana (21).

Entre los principales compuestos que tienen actividad antifúngica tenemos: fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, flavonoles, flavonoides, taninos y cumarinas, compuestos que forman parte de las plantas y que sirven como mecanismos de defensa frente a los patógenos (22). Cabe destacar, que a diferencia de los compuestos vegetales con acción insecticida los compuestos de origen vegetal con acción fungicida tienen relativamente muy baja o poca toxicidad lo que incrementa su potencial para el desarrollo de fungicidas botánicos (23).

Los compuestos como fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, flavonoles, flavonoides, taninos y cumarinas tienen registros de actividad antifúngica, compuestos que forman parte de las plantas y que sirven como mecanismos de defensa frente a los patógenos (4).

Algunos patógenos fúngicos de importancia económica han sido utilizados para pruebas frente a extractos vegetales. Por ejemplo, los extractos vegetales de neem (*Azadirachta indica*), cebolla (*Allium cepa*) y ajo (*Allium sativum*) han mostrado tener efectos negativos sobre el desarrollo del patógeno *Cercospora cajani* en frejol gandul (*Cajanus cajan* L.) a nivel de campo (24). En estudios *in vitro* se ha encontrado que los extractos de ajo presentaron un efecto similar sobre el desarrollo del micelio de *Phytium ultimum*, resultados que fueron similares a los observados en los tratamientos químicos (captan y metalaxyl), lo que indicaría el potencial de esta especie para el control del patógeno.

En investigaciones similares, extractos de especies de malezas como *Cyperus rotundus* inhibieron la germinación de esporas y/o desarrollo de micelio de *Colletotrichum gloesporoides* y *Curvularia* spp (25), *Fusarium udum* (26), *Puccinia arachidis* (27) entre

otros patógenos; resultados similares han sido observados por extractos obtenidos a partir de *Amaranthus* spp. frente a patógenos como *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* sp. y *Aspergillus ochraceus* (28); *Tagetes minuta* frente a *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium rolfsii* (29); *Euphorbia hirta* frente a *Fusarium moniliforme* y *Phoma sorghina* (30).

En el caso de patógenos del cultivo de cacao, muy pocas investigaciones se han llevado a cabo para evaluar el uso de extractos frente a los agentes causales de las principales enfermedades del cultivo, y aunque los resultados han sido efectivos muy poca atención se ha enfocado en el desarrollo de herramientas de manejo de la enfermedad que incluyan estas opciones (29). Extractos de romero y lavanda han mostrado efecto sobre las especies de *Phytophthora* spp. que afectan al cacao (32). En el caso de la moniliasis, especies como *Lippia* spp. (33) , *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* han usadas para preparar extractos o destilados con los que se han enmendado medios de cultivo sobre los que se ha evaluado el desarrollo de *M. roreri* encontrándose que las especies vegetales tienen un efecto negativo sobre la germinación y desarrollo de micelio del patógeno (34) (35).

Los extractos de *A. espinosus* a partir tanto de raíces, hojas, como de flores fueron efectivos para disminuir la germinación de esporas de *P. pachyrhizi*, provocan mayor porcentaje de lisis de esporas del mencionado hongo. *Amaranthus* contiene alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y terpenoides por lo que puede ser utilizado como fungicida botánico para controlar la germinación de esporas (45).

La concentración en la que se aplican los diferentes extractos vegetales es un factor clave para el control de enfermedades causadas por diferentes patógenos. Mukherjee *et al* (2011), evidenció que al incrementar la concentración de los extractos de *S. macrophylla*, *Z. officinale*, *N. tabacum*, *C. gigantea*, *A. sativum* y *S. apetala*, desde el 30 al 70%, se incrementó significativamente la inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* desde el 21.51% hasta un 41.04%.

2.2.4. Plantas utilizadas en el proyecto de investigación

A continuación, se resume la información botánica de las plantas a ser utilizadas en el presente estudio de acuerdo a lo publicado en el Manual de Identificación Taxonómica de Malezas (36).

2.2.4.1. Bledo (*Amaranthus bledo*)

Esta planta pertenece a la familia Amaranthaceae. Es de tipo anual y erecta, llegando a alcanzar hasta un metro de altura. Posee tallos redondos con rayas longitudinales, a veces de color rojizo. Sus hojas son opuestas, ovadas, rómbicas, de hasta 12 cm de largo y de hasta 6.5 cm de ancho, puntiagudas, angostadas en la base, peciolo delgado, de 12 cm de largo. La inflorescencia es una espiga, terminal, erguida, de 10 a 20 cm de largo, formada por pequeñas flores, las cuales tienen cinco tépalos ampliamente lanceolados, los externos ligeramente más largos que los internos, puntiagudos, con escasos pelillos. Sus frutos son subglobosos, de 1.5 a 2.5 mm de largo, se abre transversalmente. Las semillas son de contorno circular, de color negro, brillante, de más o menos 1.2 mm de diámetro (36).

2.2.4.2. Teatina (*Scoparia dulcis*)

La teatina pertenece a la familia Plantaginaceae. Es una especie anual a perenne en función de las condiciones de humedad del suelo. Se multiplica principalmente por semillas. El tallo es poligonal y lleno. A menudo es sublignificado en la base. Es glabro. Las hojas son opuestas o verticiladas en tres. Son simples y sésiles. El limbo es oblanceolado, largo de 2.5 a 5 cm y ancho de 1.5 cm. La base es atenuada en ángulo agudo, formando un pseudo-pecíolo. El ápice es en ángulo ancho. Las dos caras son glabras y con glándulas verdes, brillantes. El margen es entero en la mitad inferior y dentado en la mitad superior. Las flores son solitarias o por pares en la axila de las hojas. Son de color azulado. Son portadas por un pedúnculo de 6 a 8 mm de largo. El cáliz está formado de 5 sépalos libres casi hasta la base. Son de forma elíptica, terminan en punta en el ápice. Son finamente pubescentes. La corola está formada de 4 pétalos, raramente 5, libres casi hasta la base. Son ovales, con ápice apiculado. La totalidad del cáliz y la corola tiene un largo de 3 a 4 mm. Los 4 estambres poseen anteras con 2 lóculos iguales. El ovario está coronado por un estilo filiforme que no

rebasa la corola. Las semillas son en extremo pequeñas midiendo 0,1 mm de largo. Son de forma obcónica (36).

2.2.4.3. Coquito (*Cyperus odoratus*)

Pertenece a la familia Cyperaceae. Es de tipo perenne, con raíces fibrosas. Puede llegar a alcanzar hasta 60 cm de alto. El tallo es triquetro, hasta de 5 mm de ancho. Las hojas tienen láminas en forma de V o de M, de 10 a 65 cm de largo y de 4 a 12 mm de ancho. La inflorescencia consta de brácteas de 5 a 9, horizontales a ascendentes, rayos hasta 25 cm de largo, espigas sésiles, de 14 cm de largo; Espiguillas: Oblongas a lineares, teretes de 5 a 27 mm de largo y hasta 2 mm de ancho, cafés a rojizas. El fruto es aquenio de sección triangular con alas persistentes, de hasta 2 mm de largo y hasta 1 mm de ancho, casi liso, café a negro, la superficie con puntuaciones diminutas (36).

2.2.4.4. Rosa de muerto (*Tagetes minuta*)

Esta planta se encuentra dentro de la familia Asteraceae. Es una planta de ciclo anual, de 0.30 hasta 1.80 m de alto. El tallo es erecto cilíndrico. Sus hojas son de 8 a 15 cm de largo, folíolos de 9 a 17, estrechamente lanceoladas a linear-lanceolados de 1.2 a 2.5 y hasta 5 cm de largo por 0.2 hasta 0.7 mm de ancho. La inflorescencia consta de cabezuelas (inflorescencia flores densas, sésiles, sobre una estructura parecida a un cojín) en corimbos (flores a una misma altura, pero con pedicelos de diferentes longitudes), pedúnculo (sostén de la inflorescencia) de 0.1 a 0.5 cm de largo. Involucro (grupo de hijitas que rodean a la inflorescencia) de 0.7 a 1 cm de largo por 0.15 a 0.3 cm de ancho. Las flores son liguladas (flores periféricas) de 1 a 3, amarillas, ovadas (con forma de huevo) a elípticas de 0.1 a 0.2 cm de largo. Flores del disco (flores centrales) de 3 a 5, corola de 0.3 a 0.4 cm de largo. Vilano (cáliz modificado) 1 o 2 de escamas subuladas (angostamente triangular) de 0.2 a 0.3 cm de largo. El fruto de esta planta es una cápsula (fruto simple, seco que abre al madurar) desde 0.45 hasta 0.7 cm de largo (36).

2.2.4.5. Lechosa (*Euphorbia hirta*)

La lechosa es una maleza que pertenece a la familia Euphorbiaceae. Es una planta herbácea anual, erecta o decumbente, pilosa. Tamaño: Hasta de 50 cm de largo. Posee tallo ramificado

en forma dicotómica, de hasta 60 cm de largo, con tricomas cortos y patentes. Sus hojas son opuestas, ovadas a romboides, estípulas pequeñas, en forma de aristas, márgenes aserrados, de 0.4 a 4 cm de largo y de 0.3 a 3 cm de ancho. Inflorescencia: Ciatios aglomerados en cimas en forma de umbela, terminales; involucros pequeños, de hasta 1 mm de alto, petaloides blancos a rojizos densamente pubescente. El fruto es una cápsula trilobada, con pelos cortos. Posee semillas ovoides de 0.7 a 1.2 mm de largo, de color café rojizo (36).

2.2.4.6. Verdolaga (*Portulaca oleracea*)

Es de la familia Urticaceae. Es una planta de tipo herbácea anual, erecta. Tamaño: De hasta 40 cm de alto. Posee tallos succulento, carnosos, glabros, ramificados. Las hojas son opuestas, pecioladas, cada par difiere de tamaño, generalmente de hasta 6 mm de largo, pecioladas, glabras, ovadas y se encuentran agrupadas a lo largo del tallo, excepto en el ápice. Las inflorescencias son axilares, en cada axila se encuentran de 5 a 25 flores, cortamente pedunculadas. Presente flores pequeñas, de aproximadamente 1 mm de largo, las femeninas de color blanquecino, las flores masculinas de color rojizo. Su fruto es seco, ovado, de hasta 0.6 mm de largo, de color negruzco, cada fruto contiene una semilla. Las semillas son ovadas de color café, lisas (36).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Rumiología del campus “La María”, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en el km 7.5 de la vía Quevedo – El Empalme, recinto San Felipe, cantón Mocache, provincia de Los Ríos, ubicada entre las coordenadas geográficas de 01° 06’ de latitud Sur y 79° 29’ de longitud Oeste, a una altitud de 120 m.s.n.m con una temperatura media de 25.8 °C.

3.2. Tipo de investigación

La investigación se fundamentó bajo la línea de investigación No. 2 de la UTEQ: “Desarrollo de conocimiento y tecnologías de agricultura alternativa aplicable a las condiciones del trópico húmedo y semihúmedo del Litoral Ecuatoriano”, al evaluar el efecto de seis extractos vegetales sobre el desarrollo del agente causal de la moniliasis (*M. royeri*) del cacao (*Theobroma cacao* L). La investigación fue de tipo experimental-exploratoria consiste en determinar el efecto de extractos etanólicos vegetales sobre el desarrollo *in vitro* de fitopatógenos para el control de enfermedades de importancia económica en el cultivo de cacao.

3.3. Métodos de investigación

Se utilizó los métodos inductivo, deductivo y analítico. El primero permitió plantear las variables de respuesta, el segundo posibilitó la determinación del efecto de los extractos sobre la germinación de esporas y evaluar el crecimiento, viabilidad y estructura del micelio del patógeno *M. royeri*, en medios de cultivo enmendados con extractos vegetales. Finalmente, el método analítico sirvió para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en la evaluación de las variables de respuesta.

3.4. Fuentes de recopilación de la investigación

La información obtenida en la investigación se consiguió mediante fuentes primarias a través de la obtención de medios de cultivo y como fuentes secundarias se utilizó: libros, artículos científicos, tesis de ingeniería, entre otros.

3.5. Diseño de la investigación

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial 3x6+1 en 10 repeticiones, considerando como unidad experimental una caja de Petri. Se consideraron dos factores en estudio: concentraciones y extractos, cuyas combinaciones se compararon con un tratamiento control. Para establecer diferencias entre las medias de los tratamientos se hizo uso de la prueba de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$). El procesamiento estadístico se lo realizó en “R”

Tabla 1. Esquema del análisis de varianza utilizado en el ensayo

Fuentes de variación	Grados de libertad
Concentraciones	2
Extractos	5
Concentraciones * Extractos	10
Control vs factorial	1
Error	171
Total	190

Modelo matemático

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

μ = es el efecto de la media

α_i = es un efecto del nivel “i-ésimo” del factor A

β_j = es un efecto del nivel “j-ésimo” del factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = es un efecto debido a la interacción del “i-esimo” nivel del factor A con el “jota-ésio” nivel del factor B

ε_{ijk} = es un efecto aleatorio (2).

3.5.1. Factores estudiados

3.5.1.1. Concentraciones

C₁: 10% v/v

C₂: 20% v/v

C₃: 30% v/v

3.5.1.2. Extractos

E₁: Bledo (*Amaranthus blado*)

E₂: Coquito (*Cyperus odoratus*)

E₃: Lechosa (*Euphorbia hirta*)

E₄: Rosa de muerto (*Tagetes minuta*)

E₅: Teatina (*Scoparia dulcis*)

E₆: Verdolaga (*Portulaca oleracea*)

3.5.2. Tratamientos estudiados

La combinación de los dos factores en estudio reflejó 18 tratamientos, los mismos que se compararon con un tratamiento control (testigo), tal como se describen a continuación:

Tabla 2. Descripción de los tratamientos evaluados

Trat	Cod.	Concentración	Extractos	UE
T ₁	C ₁ E ₁	10% v/v	Bledo (<i>A. blado</i>)	10
T ₂	C ₁ E ₂		Coquito (<i>C. odoratus</i>)	10
T ₃	C ₁ E ₃		Lechosa (<i>E. hirta</i>)	10
T ₄	C ₁ E ₄		Rosa de muerto (<i>T. minuta</i>)	10
T ₅	C ₁ E ₅		Teatina (<i>S. dulcis</i>)	10
T ₆	C ₁ E ₆		Verdolaga (<i>P. oleracea</i>)	10
T ₇	C ₂ E ₁	20% v/v	Bledo (<i>A. blado</i>)	10
T ₈	C ₂ E ₂		Coquito (<i>C. odoratus</i>)	10
T ₉	C ₂ E ₃		Lechosa (<i>E. hirta</i>)	10
T ₁₀	C ₂ E ₄		Rosa de muerto (<i>T. minuta</i>)	10
T ₁₁	C ₂ E ₅		Teatina (<i>S. dulcis</i>)	10
T ₁₂	C ₂ E ₆		Verdolaga (<i>P. oleracea</i>)	10
T ₁₃	C ₃ E ₁	30% v/v	Bledo (<i>A. blado</i>)	10
T ₁₄	C ₃ E ₂		Coquito (<i>C. odoratus</i>)	10
T ₁₅	C ₃ E ₃		Lechosa (<i>E. hirta</i>)	10
T ₁₆	C ₃ E ₄		Rosa de muerto (<i>T. minuta</i>)	10
T ₁₇	C ₃ E ₅		Teatina (<i>S. dulcis</i>)	10
T ₁₈	C ₃ E ₆		Verdolaga (<i>P. oleracea</i>)	10
T ₁₉	Control		Testigo sin aplicación de extractos	10

3.6. Procedimiento experimental

3.6.1. Cultivo y conservación del patógeno

Para este estudio se utilizó el aislamiento del patógeno *M. roreri* (código MR. Nacional 01) perteneciente a la colección de fitopatógenos del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, previamente obtenido a partir de tejidos infectados de mazorcas de cacao (*T. cacao* L.) e identificado molecularmente por los técnicos del laboratorio.

Los cultivos puros del patógeno fueron obtenidos a partir de la cepa madre mediante repique en cajas de Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) incubados durante quince días a temperatura ambiente (25 °C).

3.6.2. Obtención de los extractos vegetales

Las plantas a usarse en el estudio fueron previamente seleccionadas para el proyecto de investigación en función de su potencial actividad antimicrobiana y/o antioxidante, a través de índices fitoquímicos bibliográficos y su disponibilidad en la región.

Las seis plantas que se estudiaron fueron: bledo (*A. blede*), coquito (*C. odoratus*), lechosa (*E. hirta*), rosa de muerto (*T. minuta*), teatina (*S. dulcis*) y verdolaga (*P. oleracea*).

De cada planta se colectaron muestras de hojas, tallos y flores que fueron secadas en estufa a 35 °C hasta que alcancen peso constante. Las muestras secas se trituraron con un molino y se colocaron en una solución hidroetanólica (50% agua destilada estéril y 50% etanol) a razón de 140 g de tejido vegetal triturado por litro de solución. Después de un periodo de ocho días se obtuvo los extractos mediante filtración con papel filtro estéril, las soluciones obtenidas fueron sometidas a un proceso de eliminación de alcohol usando un rotoevaporador. Los extractos fueron conservados en botellas de vidrio estéril a 14 °C.

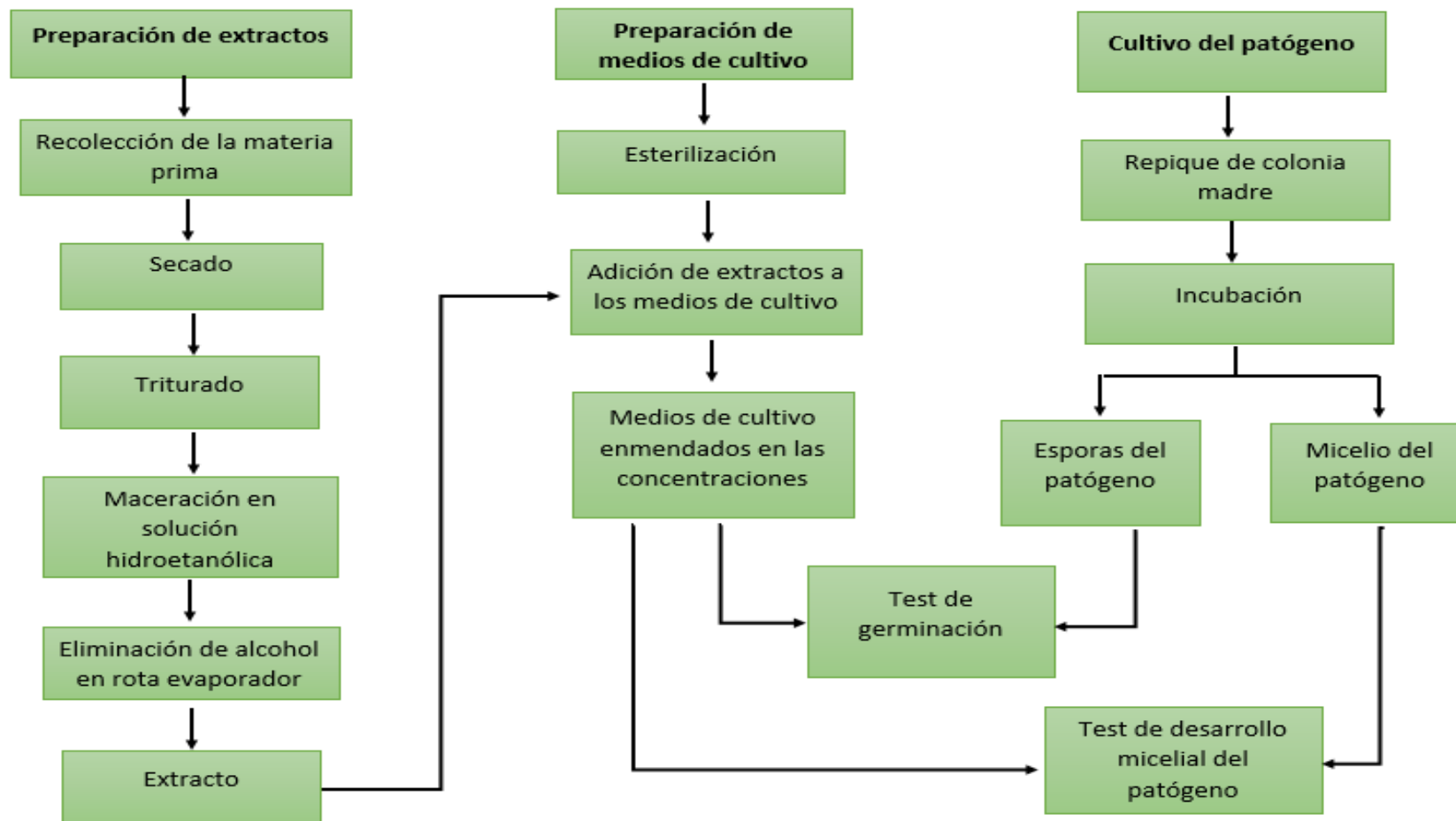


Figura 1. Flujograma del proceso de investigación

Elaboración: Autora

3.7. Variables evaluadas

3.7.1. Efecto de los extractos vegetales sobre el porcentaje de germinación de esporas

Para obtener esporas del patógeno *M. royeri* se realizaron subcultivos en placas de Petri conteniendo medio PDA. La incubación se realizó durante 24 días a 25 °C±2 °C. Al finalizar el periodo de incubación, en cada placa se colocaron 20 ml de agua destilada estéril con Tween 20 al 0.01 % y con la ayuda de un asa de Drigalsky se removieron las esporas de la superficie del medio de cultivo. La suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidias/ml.

El medio de cultivo utilizado en este ensayo fue PDA enmendado con los extractos vegetales en tres concentraciones diferentes. Para ello se preparó, el medio PDA que luego se diluyó y mezcló con los extractos (a una temperatura de 55 °C) en las tres concentraciones estudiadas: 10, 20 y 30% v/v. Adicionalmente, se preparó medio de cultivo sin enmendar para el control.

La inoculación se realizó distribuyendo 100 µL de la suspensión de conidios sobre la superficie del medio de cultivo. Por cada extracto/concentración se inoculó diez placas de Petri; además, se inoculó el patógeno en diez placas con medio PDA (control). La incubación se realizó a una temperatura de 25 °C±2 °C. Las evaluaciones se realizaron a las 8, 16 y 24 horas después de la inoculación. Para ello, en cada ocasión se realizó observaciones al microscopio (lente objetivo 40 X), y cuando el control alcanzó el 100 % de germinación se detuvo la germinación en todos los tratamientos colocando cuatro gotas de una solución de Trypan Blue al 0.4 %, se escogieron cuatro campos ópticos para realizar conteo de cien esporas (germinadas y no germinadas) por cada caja de Petri y con estos datos se calcularon los porcentajes de germinación. Siendo por tanto de cada cien esporas observadas:

Nº esporas germinadas = % esporas germinadas

Nº esporas no germinadas = % esporas no germinadas

3.7.2. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento y viabilidad del patógeno

Para evaluar el efecto de los extractos vegetales sobre el crecimiento del micelio del patógeno se inoculó *M. roreri* en medio de cultivo PDA enmendado con los extractos vegetales en tres concentraciones diferentes: 10, 20 y 30% v/v.

Inicialmente, se obtuvieron cultivos del patógeno en PDA de 21 días de edad. Para ello, a partir del cultivo madre se realizaron repiques a placas de Petri conteniendo 20 ml de medio PDA estéril. Las placas se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 21 días en oscuridad.

Los medios enmendados se prepararon mezclando medio PDA 100% (diluido y a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) con los extractos en las concentraciones antes mencionadas. Se inocularon diez placas de Petri por cada uno de los extractos y tres concentraciones diferentes. La inoculación se realizó colocando discos de micelio del patógeno de 5 mm de diámetro en el centro de cada placa de Petri previamente envasada con 20 ml de medio de cultivo enmendado. Adicionalmente, se inocularon diez placas de Petri conteniendo medio PDA sin enmendar (testigo). La incubación se realizó a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 días tiempo en el que el micelio en el control cubrió totalmente la superficie de la placa de Petri (9 cm de diámetro). Durante el periodo de incubación se registró el diámetro de crecimiento de *M. roreri* cada 48 horas, con los datos obtenidos se elaboró una curva de crecimiento y se calcularon los porcentajes de inhibición, con los valores registrados a los 24 días a través de la fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del testigo} - \text{Diámetro del tratamiento}}{\text{Diámetro del testigo}} \times 100$$

En aquellos tratamientos/repeticiones en donde no se presentó crecimiento de los microorganismos, se tomaron los discos de micelio usados como inóculo y se colocaron en placas de Petri conteniendo medio PDA estéril, con la finalidad de determinar su viabilidad. Se establecieron los testigos siguiendo el mismo procedimiento del anterior (cultivo del patógeno en medio PDA sin enmendar). La evaluación se realizó una vez que los testigos cubran completamente el medio de cultivo y consistió en registrar los diámetros de crecimiento de los patógenos en cada una de las placas. Aquellas placas en donde no se

registró crecimiento se consideró como muerte del micelio y en ese caso se consideró como efecto fungicida. Con los datos obtenidos (número de placas sin crecimiento) se calculó el porcentaje de acción fungicida por cada uno de los extractos y concentraciones usadas:

$$\text{Porcentaje de acción fungicida} = \frac{\text{Número de placas con muerte del micelio}}{\text{Número de placas del testigo}} \times 100$$

3.7.3. Efecto de extractos vegetales sobre la estructura del micelio de *M. roreri*

Para evaluar el efecto de los extractos vegetales sobre la estructura del micelio del patógeno se inoculó *M. roreri* en medio de cultivo líquido Papa Dextrosa enmendado con los extractos vegetales en tres concentraciones diferentes: 10, 20 y 30% v/v.

Inicialmente, se obtuvieron cultivos del patógeno en PDA de 21 días de edad. Para ello, a partir del cultivo madre se realizó repiques a placas de Petri conteniendo 20 ml de medio PDA estéril. Las placas se incubaron a 25 °C±2 °C durante 21 días en oscuridad.

Los medios enmendados se prepararon utilizando medio líquido Papa Dextrosa 100% al que se le añadió los extractos en las concentraciones antes mencionadas. Se inoculó tres matraces Erlenmeyer de 25mL (10 ml de medio líquido cada uno) por cada uno de los extractos y tres concentraciones diferentes, en cada matraz se colocaron dos discos de micelio del patógeno de 5 mm de diámetro. Adicionalmente, se inoculó tres matraces con medio sin enmendar (testigo). La incubación se realizó a 25°C±2°C durante 15 días, al final de los cuales se realizó la evaluación de la estructura del micelio y desarrollo del mismo en los medios líquidos.

Por cada matraz se retiraron los discos de micelio y se verificó su crecimiento. Adicionalmente, en los tratamientos con crecimiento micelial se preparó placas para observación microscópica con aumento de 100X. De acuerdo a la estructura del micelio del patógeno en cada tratamiento se le asignaron los valores:

Tabla 3. Valores utilizados para evaluar la estructura del micelio de *M. roreri*

Valores	Descripción
0 (-)	Sin crecimiento de micelio
1 (+)	Crecimiento del micelio con estructuras celulares y citoplasma alteradas, desorganización de los contenidos celulares
2 (++)	Crecimiento de micelio sin alteraciones en el citoplasma

3.8. Recursos humanos y materiales

3.8.1. Recursos humanos

Esta investigación se realizó con la orientación metodológica por parte de la Ing. Raquel Guerrero, Ing. Pablo Ramos e Ing. Erick Eguez miembros del equipo del Proyecto de Investigación “Aprovechamiento de la actividad antifúngica de plantas para el control de enfermedades en cultivos de interés económico” financiado por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo a través del Fondo Competitivo de Investigación Científica y Tecnológica FOCICYT quinta convocatoria extraordinaria.

3.8.2. Recursos materiales

3.8.2.1. Materiales

- Agitador calentador magnético.
- Autoclave
- Balanza
- Cámara de aislamiento.
- Cámara de incubación
- Estufa
- Lupa estereoscópica Difco R
- Microscopio
- Roto evaporador
- Trituradora

3.8.2.2. Equipos

- Algodón
- Botellas para medios de cultivo
- Cajas Petri
- Embudos
- Jeringas
- Matraces
- Mechero
- Papel aluminio
- Papel filtro

3.8.2.3. Insumos

- Agua destilada
- Alcohol
- PDA (agar de papa dextrosa) D
- Trypan Blue
- Tween 20

3.8.2.4. Materia prima

- Bledo (*A. hybridus*)
- Coquito (*C. odoratus*)
- Rosa de muerto (*T. minuta*)
- Teatina (*S. dulcis*)
- Verdolaga (*P. oleracea*)
- Lechosa (*E. hirta*)

3.8.2.5. Materiales de oficina

- Agenda
- Computadora

- Esferos
- Hojas de papel bond A4
- Impresora
- Lápiz
- Pendrive
- Regla

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Efecto de los extractos vegetales sobre el porcentaje de germinación de esporas.

En la Tabla 4, se presenta el efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de las esporas de *M. roreri*. Todos los extractos evaluados tuvieron un efecto sobre la germinación de esporas, observándose que en todos los casos al aumentar las concentraciones disminuye el porcentaje de germinación de las mismas.

Se observó que los extractos que tuvieron mayor efecto sobre la germinación de esporas fueron los de las especies *A. bleado*, *E. hirta* y *T. minuta*, los cuales no presentaron diferencias estadísticas entre ellos, llegando a inhibir en el caso de *A. bleado* el 100% de la germinación en las tres concentraciones, mientras que en las especies *E. hirta* y *T. minuta* las esporas del patógeno germinaron en 0.40 y 1.40%, respectivamente, cuando se enmendó el medio con la concentración del 10%. En ambos extractos no se observaron esporas germinadas en las concentraciones de 20 y 30%.

Las esporas del patógeno no germinaron en los medios de cultivo enmendados con las especies *C. odoratus* y *P. oleracea*, en las concentraciones de 20 y 30%, sin embargo, se observaron esporas germinadas en los medios enmendados con los extractos al 10%, obteniéndose porcentajes de germinación de 21.40 y 26.60 %, respectivamente.

Por otra parte, el extracto con el que se obtuvo germinación de las esporas en todas las concentraciones fue *S. dulcis* con porcentajes de germinación de 38.80% de esporas germinadas (medio enmendado con 10% de extracto), 6.5% (medio enmendado con 20% de extracto) y 1,80% (medio enmendado con 30% de extracto), lo que indicaría que de los seis extractos evaluados *S. dulcis* sería la especie con menor efecto sobre la germinación de las esporas de *M. roreri*.

Tabla 4. Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas del patógeno *M. roreri*

Especie	Porcentajes de germinación de <i>M. roreri</i>					
	Medio al 10 %		Medio al 20 %		Medio al 30 %	
Bledo (<i>A. bleado</i>)	0.00	d	0.00	b	0.00	b
Coquito (<i>C. odoratus</i>)	21.40	c	0.00	b	0.00	b
Lechosa (<i>E. hirta</i>)	0.40	d	0.00	b	0.00	b
Rosa de muerto (<i>T. minuta</i>)	1.40	d	0.00	b	0.00	b
Teatina (<i>S. dulcis</i>)	38.80	a	6.50	a	1.80	a
Verdolaga (<i>P. oleracea</i>)	26.60	b	0.00	b	0.00	b

Promedios con la misma letra en cada grupo de datos, no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey al 5%.

En la Tabla 5, se muestran los resultados del análisis del efecto de las concentraciones de los extractos sobre la germinación de esporas de *M. roreri*. Los resultados indican que en los extractos de *A. bleado*, *E. hirta* y *T. minuta*, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas, evidenciándose que todos afectan significativamente la germinación de esporas del patógeno aún en la concentración más baja (10%).

Para los extractos restantes, la concentración de 10% mostró diferencias significativas por encima de las concentraciones de 20 y 30%, registrándose valores de 21.40, 38.80 y 26.60% de germinación en los extractos de *C. odoratus*, *T. minuta* y *P. oleracea* aplicados al 10%, respectivamente.

Tabla 5. Efecto de las concentraciones de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas *in vitro* del patógeno *M. roreri*

Concentraciones	<i>A. bleado</i>	<i>C. odoratus</i>	<i>E. hirta</i>	<i>T. minuta</i>	<i>S. dulcis</i>	<i>P. oleracea</i>
C ₁ : 10% v/v	0	21.4 a	0.4	1.4	38.8 a	26.6 a
C ₂ : 20% v/v	0	0 b	0	0	6.5 b	0 b
C ₃ : 30% v/v	0	0 b	0	0	1.8 c	0 b

Promedios con la misma letra en cada grupo de datos, no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey al 5%.

4.1.2. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento y viabilidad micelial del patógeno

El efecto de los sustratos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* del patógeno *M. roreri* se presenta en la Tabla 6. Los resultados muestran que el extracto de Bledo (*A. bleado*) usado al 10% tuvo mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento micelial (100%) del patógeno, mostrando diferencias significativas con los demás extractos. Los tratamientos con extractos de *E. hirta* y *C. odoratus* al 10% registraron porcentajes de inhibición de 46.11 y 21.29%, respectivamente, mientras que los extractos restantes en esta concentración, no provocaron efecto alguno sobre el crecimiento micelial.

Al evaluarse el uso de los extractos a una concentración del 20%, los porcentajes más altos de inhibición del crecimiento micelial de *M. roreri* se obtuvieron con *A. bleado*, *E. hirta* y *T. minuta*, alcanzándose con los dos primeros el 100%, y 97.64% de inhibición con el tercero, superando significativamente a los demás que registraron entre 12.24 y 60.23% de inhibición del crecimiento micelial. El extracto de *C. odoratus* no inhibió el crecimiento micelial.

Cuando se aplicaron los extractos en una concentración del 30%, no se encontraron diferencias significativas entre los extractos aplicados, evidenciándose que todos éstos, a excepción del de *C. odoratus* que mostró un 98.24% de inhibición, alcanzaron un 100% de inhibición del crecimiento micelial del hongo.

Tabla 6. Efecto de los extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* del patógeno *M. roreri*

Extractos	Inhibición del crecimiento micelial		
	Medio al 10 %	Medio al 20 %	Medio al 30 %
Bledo (<i>A. bleado</i>)	100.00 a	100.00 a	100.00
Coquito (<i>C. odoratus</i>)	21.29 c	60.00 d	98.24
Lechosa (<i>E. hirta</i>)	46.11 b	100.00 a	100.00
Rosa de muerto (<i>T. minuta</i>)	0.00 d	97.64 a	100.00
Teatina (<i>S. dulcis</i>)	0.00 d	12.24 c	100.00
Verdolaga (<i>P. oleracea</i>)	0.00 d	60.23 b	100.00

Promedios con la misma letra en cada grupo de datos, no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey al 5%.

En lo correspondiente al efecto de las concentraciones sobre la inhibición del crecimiento micelial de *M. roreri*, como se muestra en la Tabla 7, las concentraciones no difirieron entre sí para el extracto de *A. bleado*, con un 100.00% de inhibición en cada concentración. En los extractos de *C. odoratus*, *T. minuta*, *S. dulcis* y *P. oleracea*, la concentración 30% mostró mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, evidenciándose diferencias significativas por encima de las concentraciones de 10 y 20%.

Las concentraciones del extracto de *E. hirta* al 20 y 30% mostraron un 100.00% de inhibición del crecimiento micelial de *M. roreri*, cada una, superando estadísticamente a la concentración del 10% que registró un 46.12% de inhibición.

Tabla 7. Efecto de las concentraciones de los extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* del patógeno *M. roreri*

Concentraciones	<i>A. bleado</i>		<i>C. odoratus</i>		<i>E. hirta</i>		<i>T. minuta</i>		<i>S. dulcis</i>		<i>P. oleracea</i>	
C ₁ : 10%	100.00	a	21.29	c	46.12	b	0.00	c	0.00	c	0.00	c
C ₂ : 20%	100.00	a	60.00	b	100.00	a	97.65	b	12.24	b	60.24	b
C ₃ : 30%	100.00	a	98.24	a	100.00	a	100.00	a	100.00	a	100.00	a

Promedios con la misma letra en cada grupo de datos, no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey al 5%.

Los análisis de correlación de las concentraciones de cada uno de los extractos y el tiempo de evaluación del diámetro micelial de *M. roreri*, reflejaron coeficiente de determinación superiores al 0.88, que por ser más próximos a 1, demuestran que la variación observada del diámetro del micelio del patógeno puede ser explicada en función del tiempo de evaluación.

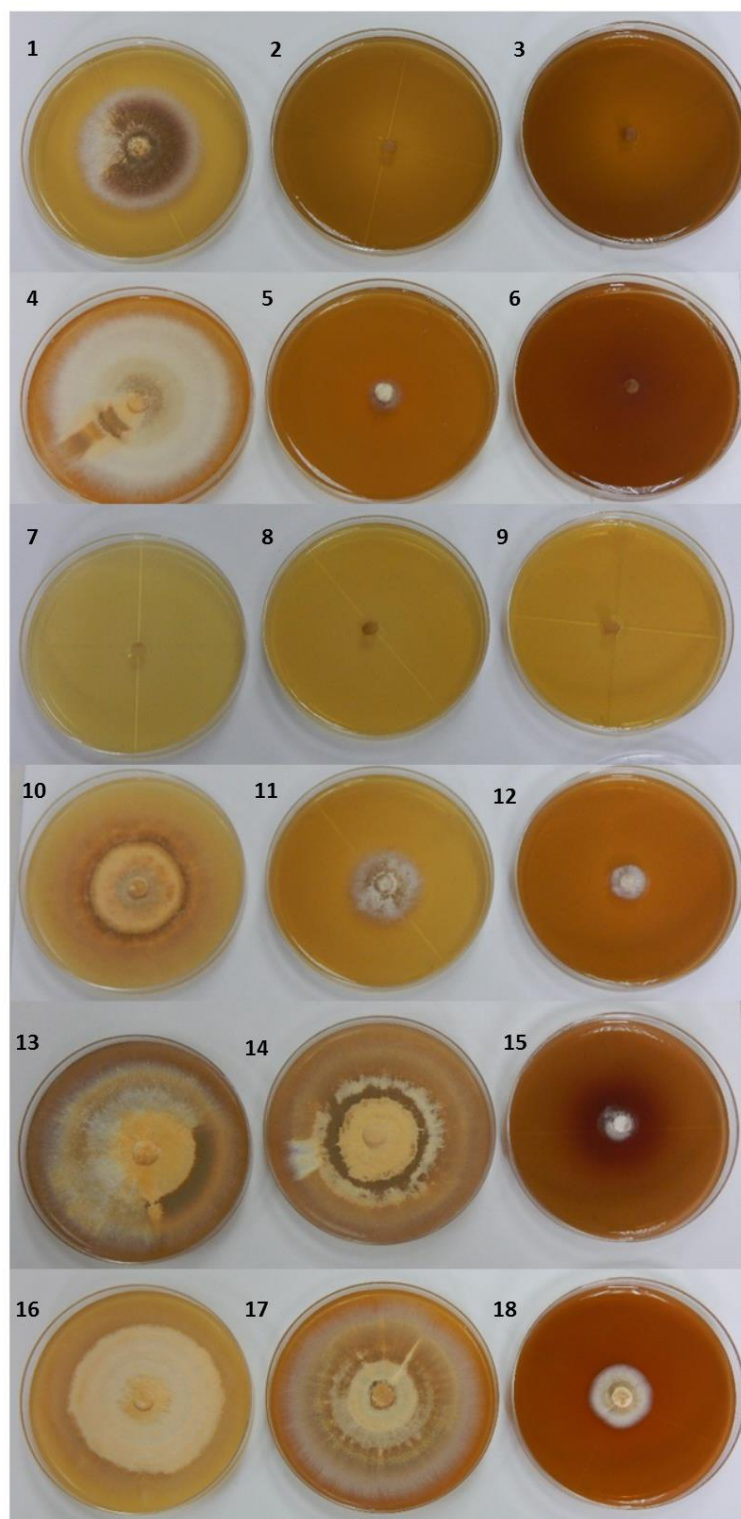
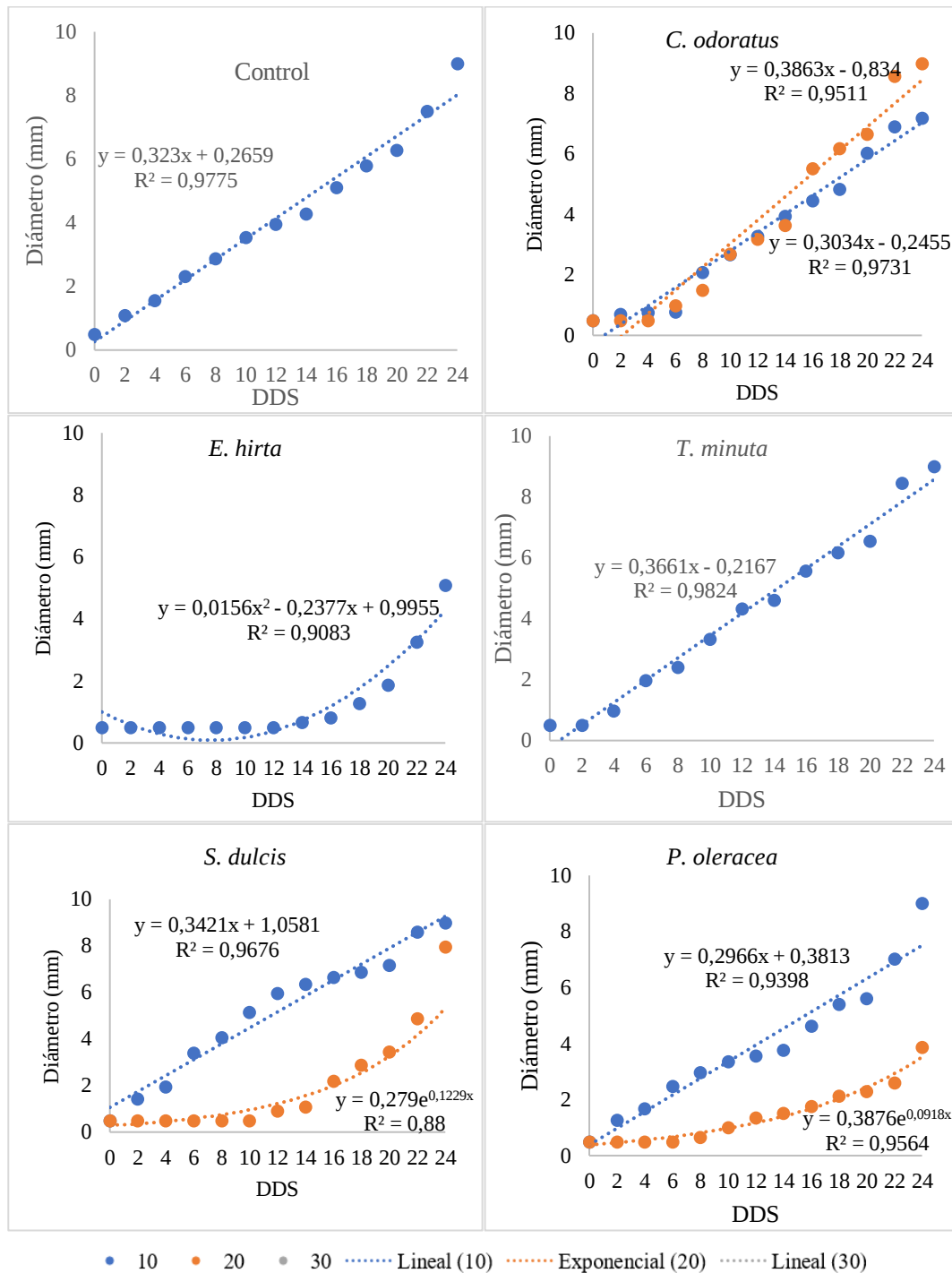


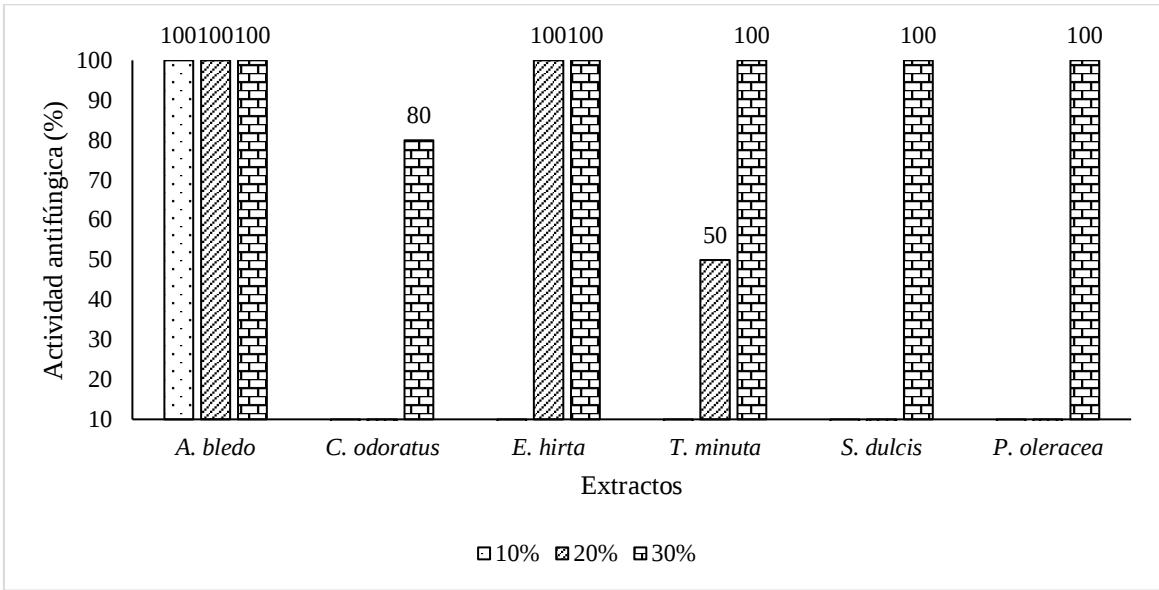
Figura 2. Cultivos de *M. roreri* en medio PDA enmendado con extractos de *E. hirta* al 10% (1), 20% (2) y 30% (3); *T. minuta* al 10% (4), 20% (5) y 30% (6); *A. bleado* al 10% (7), 20% (8) y 30% (9); *P. oleracea* al 10% (10), 20% (11) y 30% (12); *C. odoratus* al 10% (13), 20% (14) y 30% (15); y, *S. dulcis* al 10% (16), 20% (17) y 30% (18).

Gráfico 1. Análisis de correlación de las concentraciones de cada uno de los extractos y los días de evaluación del diámetro del micelio.



Al evaluarse la viabilidad de los discos de micelio del patógeno (también llamada actividad antifúngica) en aquellos tratamientos/repeticiones en donde no se presentó crecimiento en el experimento anterior, se encontró que la actividad antifúngica del extracto de *A. bleado* fue del 100% en todas las concentraciones evaluadas, es decir, que ninguno de los discos del patógeno tenía micelio viable (micelio vivo). En la concentración del 20% el extracto de *E. hirta* también registró un 100% de actividad antifúngica, mientras que el extracto de *T. minuta* alcanzó un 50% de actividad antifúngica. En el caso del extracto de *C. odoratus* únicamente la concentración del 30% mostró tener actividad antifúngica (80%), en este caso los discos de micelio que en los medios enmendados no mostraron crecimiento si se desarrollaron en el medio PDA puro, lo que indica que el extracto inhibe el crecimiento del micelio, pero no produce la muerte del mismo en las concentraciones de 10 y 20%. Los extractos restantes, todos alcanzaron un 100% de actividad antifúngica en la concentración de 30% (Gráfico 2).

Gráfico 2. Acción antifúngica (%) de los extractos vegetales frente al patógeno *M. roreri*



4.1.3. Efecto de extractos vegetales sobre la estructura del micelio de *M. roreri*

En la Tabla 8, se presentan los cambios generados por los extractos, sobre la estructura del micelio de *M. roreri*. Los extractos de bleado (*A. bleado*) y lechosa (*E. hirta*) no permitieron el desarrollo de micelio del patógeno en los medios líquidos enmendados. Igual efecto se obtuvo con los extractos de *C. odoratus* (coquito), *P. oleracea* (verdolaga), *T. minuta* y *S.*

dulcis cuando fueron utilizados para enmendar los medios de cultivo con concentraciones de 20 y 30%. Sin embargo, los extractos de *C. odoratus* y *P. oleracea* al 10% permitieron el crecimiento de micelio, pero se observó que las estructuras internas de las hifas del patógeno sufrieron alteraciones a nivel de citoplasma, con desorganización de los contenidos celulares. *M. roreri* presentó crecimiento del micelio sin mostrar alteraciones cuando creció en los medios enmendados con *T. minuta* y *S. dulcis* al 10%.

Tabla 8. Efecto de los extractos vegetales sobre la estructura del micelio de *M. roreri*

Tratamientos	Valores
Control	++
Bledo 10%	-
Bledo 20%	-
Bledo 30%	-
Coquito 10%	+
Coquito 20%	-
Coquito 30%	-
Lechosa 10%	-
Lechosa 20%	-
Lechosa 30%	-
Rosa 10%	++
Rosa 20%	-
Rosa 30%	-
Teatina 10%	++
Teatina 20%	-
Teatina 30%	-
Verdolaga 10%	+
Verdolaga 20%	-
Verdolaga 30%	-

-: Sin crecimiento de micelio
 +: Crecimiento del micelio con estructuras celulares y citoplasma alteradas, desorganización de los contenidos celulares
 ++: Crecimiento de micelio sin alteraciones en el citoplasma

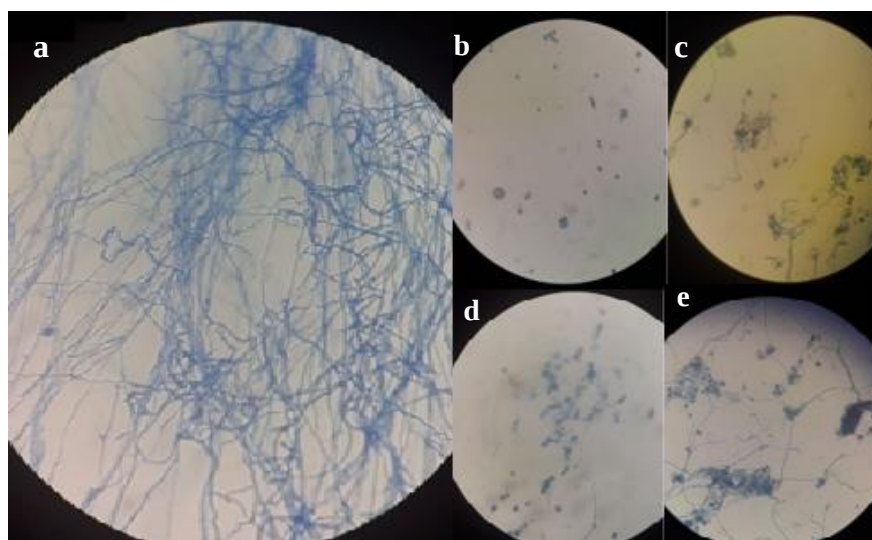


Figura 3. Estructura del micelio de *M. roreri* en medio líquido PDA sin enmendar (a) y medios enmendados con *T. minuta* al 10% (b), *S. dulcis* al 10% (c), *C. odoratus* al 10% (d) y *P. oleracea* al 10% (e).

4.2. Discusión

Los resultados demuestran que *A. blede* y *E. hirta* tienen el mayor potencial para afectar el desarrollo de los patógenos, tanto en su germinación como en el crecimiento y viabilidad de su micelio. El efecto observado es similar al que fue reportado por Yusnawan (45) al evaluar los extractos de una de las especies de *Amaranthus* (*A. espinosus*), los mismos que fueron efectivos para disminuir la germinación de esporas de *P. pachyrhizi*, provocando mayor porcentaje de lisis de esporas del mencionado hongo. El mencionado autor sostiene que las especies de *Amaranthus* sp. contienen alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y terpenoides por lo que puede ser utilizado como fungicida botánico para controlar la germinación de esporas. Esto coincide con lo señalado por Singh y Kumar (3), quienes sostienen que compuestos como fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, flavonoles, flavonoides, taninos y cumarinas tienen registros de actividad antifúngica, compuestos que forman parte de las plantas y que sirven como mecanismos de defensa frente a los patógenos.

Por otro lado, al evaluarse el crecimiento micelial de los hongos, se observó una tendencia similar a la alcanzada en la germinación, siendo el incremento de la concentración un factor importante para causar un mayor impacto en el crecimiento micelial, de tal manera que al aumentarla, también se incrementa la efectividad en la inhibición del crecimiento micelial. Estos resultados son corroborados por los reportes de Mukherjee *et al.* (48), quienes al

incrementar la concentración de los extractos de *S. macrophylla*, *Z. officinale*, *N. tabacum*, *C. gigantea*, *A. sativum* y *S. apetala*, desde el 30 al 70%, observaron un incremento significativo en la inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* desde el 21.51% hasta un 41.04%, respectivamente.

En investigaciones similares, extractos de especies de malezas como *Cyperus rotundus* inhibieron la germinación de esporas y/o desarrollo de micelio de *Colletotrichum gloeosporoides* y *Curvularia* spp (25), *Fusarium udum* (26), *Puccinia arachidis* (27) entre otros patógenos; resultados similares han sido observados por extractos obtenidos a partir de *Amaranthus* spp. frente a patógenos como *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* sp. y *Aspergillus ochraceus* (28); *Tagetes minuta* frente a *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium rolfsii* (29); *Euphorbia hirta* frente a *Fusarium moniliforme* y *Phoma sorghina* (30).

Los daños ocasionados por los extractos de *A. blede* y de *E. hirta* en todas las concentraciones fueron a nivel celular dado que no solo inhibieron el desarrollo del patógeno sino que provocaron la muerte del mismo debido al efecto de los extractos sobre la integridad de la membrana plasmática, puesto que esta tiene un papel crucial en el mantenimiento de la viabilidad fúngica, tal como lo mencionan Shao *et al.* (41) y Tao *et al.* (42) en sus investigaciones. En aquellos extractos en que se observó crecimiento micelial, pero con alteraciones en su estructura se alcanza un efecto importante aun cuando no hay muerte celular debido que la desorganización de los contenidos celulares puede afectar *a posteriori* el desarrollo y multiplicación del patógeno (41). Adicionalmente, autores como Tao *et al.* (42), Shreaz *et al.* (43) y OuYang *et al.* (44), encontraron indicios que demuestran que por ejemplo los aceites esenciales de plantas (que también son ricos en compuestos antimicrobiano presentes en los extractos vegetales) pueden aumentar la permeabilidad de la membrana celular y dañar la integridad de la membrana al disminuir los componentes importantes de la estructura de la membrana celular, los lípidos totales y el ergosterol.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Todos los extractos evaluados tuvieron efecto sobre la germinación de esporas de *M. roreri*, destacándose las especies *A. bleo* y *E. hirta* cuyo efecto fue considerablemente mayor que el alcanzado con las otras malezas.
- Al igual que en el caso de la germinación, los extractos de las especies evaluadas ejercieron un efecto negativo sobre el desarrollo del micelio del patógeno, en donde las especies *A. bleo* y *E. hirta* mostraron tener el mayor efecto inhibitorio sobre el desarrollo del patógeno.
- Los extractos evaluados no solo inhibieron el desarrollo del micelio, sino que también provocaron la muerte del micelio y alteraciones en la estructura del micelio y contenidos celulares.

5.2. Recomendaciones

- Identificar el tipo de compuestos con efecto antifúngico presentes en las plantas evaluadas, especialmente en las especies *A. bleo* y *E. hirta* que se destacaron por su efecto tanto en la germinación como en el desarrollo y viabilidad del micelio del hongo fitopatógeno usado en el estudio.
- Evaluar el efecto de los extractos con mayor efecto sobre el *M. roreri*, a nivel de campo para determinar si el efecto se mantiene en las condiciones en la que el patógeno se desarrolla de manera natural.
- Determinar las dosis mínimas inhibitorias de los extractos para el control de *M. roreri*.
- Evaluar los extractos con mejor desempeño frente a otras especies de fitopatógenos.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Referencias bibliográficas

1. Sánchez F, Garcés F. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*. 2012; 3(3): 249–58.
2. Kumar B, Singh K. *Ecofriendly Innovative Approaches in Plant Disease Management*: International Book Distributors; 2012.
3. Singh M, Ali S, Akhtar M, Suraj K. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*. 2012; 3(3).
4. Flood J, Ten G, Krauss U, Akrofi A. Root-infecting fungi attacking *Theobroma cacao*. In Bailey B, Meinhardt L. *Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters*.: Springer International Publishing Switzerland. 449-480; 2016.
5. Celi K, Figueroa D. Diagnóstico del estado de la moniliasis del cacao (*Moniliophthorora roreri*) y mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), en el proyecto “Santo Cacao” del Gad Provincial de Santo Domingo de los Tsáchilas Santo Domingo de los Tsáchilas. Escuela Superior Politécnica del Ejército; 2017.
6. Carbay E. Efecto en el manejo de malezas y su impacto en la producción en el cultivo de arroz Machala-Ecuador: Universidad Técnica de Machala; 2017.
7. González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Manizales: Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Departamento de Ingeniería Química; 2004.
8. Isaza P. *Glosario de Epidemiología*. Tolima:, Academia Nacional de Medicina; 2015.
9. Gregorí B. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*. 2005; 39(2): p. 1-2.
10. Tornés J, Hernández L. Cacao, una aportación de México al mundo. *Ciencia*. 2015 julio-septiembre.
11. Cueva E. Proyecto de prefactibilidad para la exportación de pasta de cacao orgánico de Puerto Quito Quito-Ecuador. Universidad Internacional del Ecuador; 2012.
12. Evans H. Frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*). In Bailey B, Meinhardt L. *Cacao Diseases a History of Old Enemiess and New Encounters*. New York-United States: Springer Cham Heidelberg; 2016. p. 63.

13. Bailey B, Meinhardt L. Cacao diseases: a history of old enemies and new encounters New York: Springer Cham Heidelberg; 2016.
14. Sánchez F, Gamboa E, Rincón J. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. Revista de la Facultad de Agronomía 20(2): 188-194. 2003.
15. Echeverría J, Campos V. Efecto de diferentes coadyuvantes en el establecimiento y supervivencia de *Trichoderma* (*Thichordema* sp.) sobre mazorcas de cacao , para el Control Biológico de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*). Sangolquí: Universidad de la Fuerzas Armadas, Ciencias de la Vida y la Agricultura; 2018.
16. Evans H. Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). In Bailey B, Meinhardt L. Cacao Diseases a History of Old Enemiess and New Encounters. New York: Springer Cham Heidelberg; 2016. p. 63.
17. Bailey B, Meinhardt L. Cacao Diseases New York: Springer Cham Heidelberg; 2016.
18. Evans H. Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). In Bailey B, Meinhardt L. Cacao Diseases a History of Old Enemiess and New Encounters. New York: Springer Cham Heidelberg; 2016. p. 63.
19. Evans H. Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). In Bailey B, Meinhardt L. Cacao Diseases a History of Old Enemiess and New Encounters. New York: Springer Cham Heidelberg; 2016. p. 63.
20. Correa Alvarez J, Castro Martinez S, Coy J. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. Acta Agronómica. 2014; 63 (4)(388-399).
21. Correa J, Castro Martinez S, Coy J. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. Acta Agronómica. 2014; 63 (4)(388-399).
22. Isman M. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Iregulated World. Annu. Rev. Entomol. 2006; 51(46-66).
23. Kumar P. Antifungal activity of some common weed extracts against wilt causing fungi, *Fusarium oxysporum*. ResearchGate. 2013 January; 2 (1)(62-67).
24. Geeta Singh PK. Phytochemical study and screening for antimicrobial activity of flavonoids of *Euphorbia hirta*. International Journal of Applied and Basic Medical Research. 2013 December; 3(2).

25. Yoon MY, Byeongjin C, Cheo J. Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *The Plant Pathology Journal*. 2012; 29 (1): 1-9.
26. Chanda L, Kushwaha K. Efficacy of Fungicides, Biocontrol agents and botanicals on severity of cercospora leaf spot of pigeon pea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018; 7(08).
27. Meera P, Srivastava J. Antifungal activity of the ethyl acetate extract of *Cyperus rotundus* rhizome against certain fungi responsible for food spoilage and plant diseases. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 2019; 4(3): 88-89.
28. Singh U, Prithviraj B, Khiste S, Kumar , Srivastava J, Manickam M. Effect of *Cyperus rotundus* rhizome extract on *Fusarium udum*. *Indian Phytopath.* 1999; 52 (1): 18-23.
29. Yusnawan E, Inayati. Antifungal activity of crude extracts of *Ageratum conyzoides*, *Cyperus rotundus*, and *Amaranthus spinosus* Against Rust Disease. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*. 2018; 40 (3): 403-414.
30. Rivillas L, Soriano M. Antifungal activity of a protean extract from *Amaranthus hypochondriacus* Seeds. *Sociedad Química de México*. 2007; 51 (3)(136.140).
31. Saha S, Walia S, Kundu A, Kumar B, Joshi D. Antifungal acetylinic thiophenes from *Tagetes minuta*: potential biopesticide. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 85: 207-211. 2012.
32. Karanga Y, Ilboudo O, Bonzi S, Tapsoba I, Somda I, Bonzi Y. Phytochemical and antifungal properties of *Euphorbia hirta* L against *Fusarium moliniforme* and *Phoma sorghina*. *Natural Products : An Indian Journal*. 2017; 13 (1):1-10.
33. Hoopen T. Conclusion and perspectives. In Bailey , Meinhardt. *Cacao Diseases a History of Old Enemies and New Encounters*. New York : Springer Cham Heidelberg; 2016]. p. 630.
34. Widmer T, Laurent N. Los extractos de plantas que contienen ácido cafeico y ácido rosmarínico inhiben la germinación de zoosporas de *Phytophthora spp.* patógeno para el cacao. *European Journal of Plant Pathology*. 2006 Julio;(315- 377).
35. Lozada B, Herrera L, Perea J, Stashenko E, Escobar P. Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*. 2012; 61 (2)(101-110).

36. Tamayo L, Ramírez S, López O, Quiroga R. Extractos por destilación de *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* para el manejo de *Moniliophthora roreri* de *Theobroma cacao*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2016 Agosto; 7(1065-1076).
37. Joya J. Efecto antifúngico de hidrodestilados de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif&Par). *Ciencia y Agricultura*. 2015 Junio; 12 (2)(21-29).
38. Santillán M. Manual de identificación taxonómica de malezas en cultivos de importancia económica del Ecuador Quito: Agrocalidad; 2017.
39. Vera B J, Vera J. Resumen de principios de diseños experimentales. 2018th ed. Guayaquil: Grupo Compás; 2018.
40. Shao X, Cheng S, Wang H, Yu D, Mungai C. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology* 114: 1642–1649. 2013.
41. Tao N, OuYang Q, Jia L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. *Food Control* 41: 116–121. 2014.
42. Shreaz S, Wani W, Behbehani J, Raja V, Irshad M, Karched M, et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia* jul-2016: 116–131. 2016.
43. OuYang Q, Tao N, Jing G. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. *BMC Genomics* 17(1):599. 2016.
44. Mukherjee A, Khandker S, Islam M, Shahid S. Efficacy of some plant extracts on the mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of the Bangladesh Agricultural University* 9(1): 43–47. 2011.
45. Yusnawan E. Inhibition of Spore Germination of *Phakopsora pachyrhizi* using crude extracts of *Amaranthus spinosus*. *Procedia Food Science* 3: 340-347. 2015.
46. Yusnawan E. The effectiveness of methanolic and n-hexane extracts of *Amaranthus spinosus* to control *Puccinia arachidis* and phytochemical screenings of active compounds (In Bahasa Indonesia). In Saleh N, Harsono A, Nugrahaeni N, A R, Sholihin J, Heriyanto M, et al. National Seminar of Legumes and Tuber Crops. Malang-Indonesia: ICFCRD; 2014. p. 399-405.

CAPÍTULO VII

ANEXOS



Anexo 1. Filtrado de extractos (1), eliminación del alcohol de los extractos en el rotoevaporador (2), incubación de los cultivos de *M. roreri* (3), registro de diámetro de las colonias de *M. roreri* (4), cajas de Petri conteniendo medios de cultivo enmendados con extractos y colonias de *M. roreri* (5) evaluación microscópica de la estructura micelial de *M. roreri* (6).