



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA Y ANTI-
BACTERIAL DE UN EXTRACTO ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE
HOJAS Y RESINA DE *Dacryodes peruviana* (COPAL), BAJO
CONDICIONES DE LABORATORIO.”**

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto de Investigación.

Presentado para optar el grado académico de:
INGENIERO FORESTAL

AUTOR: ALDO ROMARIO MOLINA HERRERA

DIRECTOR: Ing. M.Sc. CARLOS FRANCISCO CARPIO COBA

Riobamba – Ecuador

2021

© 2021, Aldo Romario Molina Herrera

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo las citas bibliográficas del documento, siempre y cuando se reconozca el derecho de autor.

Yo, Aldo Romario Molina Herrera declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos que constan en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 24 de marzo del 2021

Aldo Romario Molina Herrera
050426157-9

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Proyecto de Investigación “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA Y ANTI-BACTERIAL DE UN EXTRACTO ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE HOJAS Y RESINA DE *Dacryodes peruviana* (COPAL), BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.**”, realizado por el señor: **ALDO ROMARIO MOLINA HERRERA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

| | FIRMA | FECHA |
|---------------------------------------|-------|------------|
| Ing. M.Sc. Juan Hugo Rodríguez Guerra | _____ | 2021-03-24 |

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

| | | |
|---|-------|------------|
| Ing. M.Sc. Carlos Francisco Carpio Coba | _____ | 2021-03-24 |
|---|-------|------------|

**DIRECTOR DE TRABAJO DE
TITULACIÓN**

| | | |
|--|-------|------------|
| Bqf. M.Sc. Cristina Nataly Villegas Freire | _____ | 2021-03-24 |
|--|-------|------------|

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado con mucho amor a mis Padres: Lidia Margoth Molina Herrera y Segundo Andrés Chucuri Chiluisa Gracias por su tiempo, amor y sabios consejos. Por sus esfuerzos y desvelos todo eso pensado en mi futuro. Ahora sé, que un día yo haré lo mismo por ustedes. Agradezco a la vida por la virtud de unos grandes padres como Uds., vivirá para siempre como un legado en mi vida. ¡Los amo! De igual manera a mis hermanos: Mirian, Tania, Polo, Italo, Mercedes, Omar, William, Edison y Carlos y en especial quien confió en mi Silvana, que de una u otra manera me apoyaron a culminar con éxito una más de mis metas. Ustedes me enseñaron que no hay un límite para podernos superar. A mi novia Sindi Grefa que describo el perfecto e incondicional apoyo en mi carrera, fue el mismo con el que desarrollé cada parte y punto de esta tesis mil gracias por tu apoyo incondicional. A mis amigos y personas que estuvieron involucradas en el proceso de mi formación profesional

. No te quejes de tu pobreza, de la soledad o de tu suerte. (Pablo Neruda)

ALDO ROMARIO MOLINA HERRERA

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quisiera expresar mis más profundos agradecimientos a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad por darme la fuerza y sabiduría necesaria para superar cada uno de los obstáculos presentados en mi camino.

A mis padres Segundo y Lidia por apoyarme en todo momento, por inculcarme buenos valores y enseñarme a ser una persona de trabajo, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo, por ser mi ejemplo a seguir.

Un profundo agradecimiento por la confianza, apoyo y dedicación del Ingeniero Carlos Carpio y de la Ingeniera Cristina Villegas por haberme brindado la oportunidad de recurrir a sus capacidades y conocimientos, así como también guiarme durante todo el desarrollo de mi trabajo.

A las Ingenieras Carla Haro y Ana Cunachi, quienes aportaron con su conocimiento técnico para poder desarrollar esta investigación.

Al ingeniero Eduardo Salazar por ser un excelente docente y amigo a la vez

A la ESPOCH en especial a la Escuela de Ingeniería Forestal por abrirme las puertas para ser parte de tan prestigiosa institución la cual me formo profesionalmente.

A mis profesores de la Facultad por su paciencia y enseñanzas.

ALDO MOLINA

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---------------------------------|--------------|
| <i>ÍNDICE DE TABLAS</i> | <i>xii</i> |
| <i>ÍNDICE DE FIGURAS</i> | <i>xiii</i> |
| <i>ÍNDICE DE GRÁFICOS</i> | <i>xv</i> |
| <i>ÍNDICE DE ANEXOS</i> | <i>xvi</i> |
| <i>RESUMEN</i> | <i>xvii</i> |
| <i>ABSTRACT</i> | <i>xviii</i> |
| <i>INTRODUCCIÓN</i> | <i>1</i> |

CAPÍTULO I

| | |
|--|----------|
| I. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL | 4 |
| 1.1 <i>Dacryodes peruviana</i> (Copal) | 4 |
| 1.1.1 <i>Taxonomía</i> | 4 |
| 1.1.2 <i>Generalidades</i> | 4 |
| 1.1.3 <i>Familia Burseraceae</i> | 4 |
| 1.1.4 <i>Descripción Botánica</i> | 5 |
| 1.1.5 <i>Usos</i> | 6 |
| 1.1.6 <i>Composición Química</i> | 6 |
| 1.1.6.1 <i>Terpenos</i> | 6 |
| 1.1.6.2 <i>Mono terpenos</i> | 7 |
| 1.1.6.3 <i>Sesquiterpenos</i> | 7 |
| 1.1.6.4 <i>Triterpenos</i> | 7 |
| 1.1.6.5 <i>Flavonoides</i> | 7 |
| 1.1.6.6 <i>Quinonas</i> | 7 |
| 1.2 Damping off. | 7 |

| | | |
|-------|---|----|
| 1.2.1 | <i>Fusarium sp.</i> | 7 |
| 1.3 | <i>Ralstonia solanacearum</i> (Bacteria)..... | 9 |
| 1.3.1 | <i>Taxonomía</i> | 9 |
| 1.3.2 | <i>Características</i> | 9 |
| 1.3.3 | <i>Distribución</i> | 10 |
| 1.3.4 | <i>Signos y síntomas</i> | 10 |
| 1.4 | Medios de cultivos | 11 |
| 1.4.1 | <i>Agar nutritivo (AN)</i> | 11 |
| 1.4.2 | <i>Agar patata dextrosa(PDA)</i> | 11 |
| 1.5 | Maceración | 11 |

CAPÍTULO II

| | | |
|-------|--|----|
| II. | MARCO METODOLÓGICO | 12 |
| 2.1 | Localización del Sitio de investigación | 12 |
| 2.1.1 | <i>Ubicación Geográfica</i> | 12 |
| 2.2.1 | <i>Condiciones Climáticasdel entorno</i> | 13 |
| 2.2 | Localización del sitio que se obtuvo el material vegetal | 13 |
| 2.2.1 | <i>Ubicación geográfica</i> | 13 |
| 2.2.2 | <i>Condiciones Climáticas</i> | 14 |
| 2.3 | Identificación del material vegetativo (<i>Dacryodes peruviana</i>) | 14 |
| 2.3.1 | <i>Recolección del componente vegetal</i> | 15 |
| 2.4 | Tipo de investigación | 15 |
| 2.4.1 | <i>Identificación de la variable</i> | 15 |
| 2.5 | Diseño experimental | 16 |
| 2.5.1 | <i>Tratamientos de los estudios</i> | 16 |
| 2.6 | Metodología y técnicas | 17 |
| 2.6.1 | <i>Fase de campo</i> | 17 |
| 2.6.2 | <i>Fase de laboratorio</i> | 17 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.7 | Procedimiento | 18 |
| 2.7.1 | <i>Preparación de los extractos</i> | 18 |
| 2.7.2 | <i>Tamizaje fitoquímico alcohólico</i> | 22 |
| 2.7.3 | <i>Tamizaje fitoquímico acuoso</i> | 28 |
| 2.8 | Activación de <i>Fusarium sp.</i> | 31 |
| 2.8.1 | <i>Preparación del medio Agar papa Dextrosa (PDA)</i> | 31 |
| 2.8.2 | Siembra del hongo puro en el medio Agar papa Dextrosa (PDA) | 32 |
| 2.9 | Activación de <i>Ralstonia solanacearum.</i> | 32 |
| 2.9.1 | <i>Preparación del medio Agar nutritivo (AN)</i> | 33 |
| 2.9.2 | <i>Siembra de la bacteria en el medio de Agar Nutritivo (AN)</i> | 33 |
| 2.10 | Determinación del potencial anti-fúngico | 34 |
| 2.10.1. | <i>Determinación del potencial anti-bacterial</i> | 35 |
| 2.11 | Unidad formadora de colonia (UFC) hongos | 36 |

CAPÍTULO III

| | | |
|-------|--|----|
| 3 | MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS | 38 |
| 3.1 | Evaluación del proceso de inhibición de <i>Fusarium sp.</i> con el extracto acuoso de la resina de <i>Dacryodes peruviana</i> a distintas concentraciones | 38 |
| 3.1.1 | <i>Evaluación según los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 50%</i> | 38 |
| 3.1.2 | <i>Evaluación según los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 35%</i> | 39 |
| 3.1.3 | <i>Evaluación según los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 25%</i> | 39 |
| 3.2 | Evaluación del proceso de inhibición de <i>Fusarium sp.</i> con el extracto acuoso de las hojas de <i>Dacryodes peruviana</i> a distintas concentraciones | 41 |
| 3.2.1 | <i>Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de las hojas al 50% 35% y 25%</i> | 41 |
| 3.3 | Evaluación del proceso de inhibición de <i>Fusarium sp.</i> con el extracto alcohólico | |

| | | |
|-------|---|-----------|
| | de la resina de Dacryodes peruviana a distintas concentraciones..... | 42 |
| 3.3.1 | <i>Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 50%.....</i> | 42 |
| 3.3.2 | <i>Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 35%.....</i> | 43 |
| 3.3.3 | <i>Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 25%.....</i> | 44 |
| 3.4 | Evaluación del proceso de inhibición de Fusarium sp. con el extracto alcohólico de las hojas de Dacryodes peruviana a distintas concentraciones. | 46 |
| 3.4.1 | <i>Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 50%-.....</i> | 46 |
| 3.4.2 | <i>Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 35%</i> | 47 |
| 3.4.3 | <i>Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 25%</i> | 47 |
| 3.5 | Evaluación del proceso de inhibición de Ralstonia solanacearum con el extracto acuoso de las hojas de Dacryodes peruviana a distintas concentraciones. | 49 |
| 3.5.1 | <i>Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de hojas al 50% 35% y 25%</i> | 49 |
| 3.6 | Evaluación del proceso de inhibición de Ralstonia solanacearum. con el extracto alcohólico de las resina de Dacryodes peruviana a distintas concentraciones. ... | 50 |
| 3.6.1 | <i>Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 50% 35% y 25%</i> | 50 |
| 3.7 | Evaluación del proceso de inhibición de Ralstonia solanacearum con el extracto alcohólico de las hojas de Dacryodes peruviana a distintas concentraciones..... | 51 |
| 3.7.1 | <i>Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 50%</i> | 51 |
| 3.7.2 | <i>Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 35%</i> | 52 |
| 3.7.3 | <i>Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 25%</i> | 53 |
| 3.8 | Evaluación del proceso de inhibición de Ralstonia solanacearum con el extracto | |

| | | |
|--------|---|-----------|
| | alcohólico de resina de Dacryodes peruviana a distintas concentraciones. | 55 |
| 3.8.1 | <i>Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 50%, 35% y 25%.....</i> | 55 |
| 3.9 | Análisis estadístico del proceso de inhibición de Fusarium sp. (Hongo) con los extractos acuoso y alcohólico de resina y hojas de Dacryodes peruviana a distintas concentraciones..... | 55 |
| 3.9.1 | <i>Análisis estadístico del efecto anti-fúngico a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 50%, 35% y 25%</i> | 56 |
| 3.9.2 | <i>Análisis estadístico del efecto anti-fúngico a las 120 horas del extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25%</i> | 57 |
| 3.9.3 | <i>Análisis estadístico del efecto anti-fúngico a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 50%, 35% y 25%</i> | 57 |
| 3.9.4 | <i>Análisis estadístico del efecto anti-fúngico a las 120 horas del extracto alcohólico de hoja al 50%, 35% y 25%</i> | 58 |
| 3.10 | Análisis estadístico del proceso de inhibición de Ralstonia solanacearum (Bacteria) con los extractos acuoso y alcohólico de resina y hojas de Dacryodes peruviana a distintas concentraciones. | 58 |
| 3.10.1 | <i>Análisis estadístico del efecto anti-bacterial a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 50%, 35% y 25%.....</i> | 58 |
| 3.10.2 | <i>Análisis estadístico del efecto anti-bacterial a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 50%, 35% y 25%</i> | 59 |
| 3.10.3 | <i>Análisis estadístico del efecto anti-bacterial a las 120 horas del extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25%</i> | 59 |
| 3.10.4 | <i>Análisis estadístico del efecto anti-bacterial a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 50%, 35% y 25%</i> | 60 |
| 3.11 | Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de resina y hojas de Dacryodes peruviana para el control anti-fúngico de Fusarium sp y anti-bacterial de Ralstonia solanacearum. | 60 |
| 3.12 | Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de resina y hojas de Dacryodes peruviana para el control anti-fúngico de Fusarium sp y anti-bacterial de Ralstonia solanacearum..... | 61 |

| | |
|------------------------------|-----------|
| DISCUSIÓN | 63 |
| CONCLUSIONES..... | 65 |
| RECOMENDACIONES | 66 |
| BIBLIOGRAFÍA | |
| ANEXOS | |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabla 1-1: | Clasificación taxonómica de <i>Fusarium</i> sp..... | 8 |
| Tabla 2-1: | Clasificación taxonómica de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 9 |
| Tabla 3-1: | Distribución geográfica de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 10 |
| Tabla 1-2: | Características Climáticas del Cantón Riobamba | 13 |
| Tabla 2-2: | Características Climáticas del Cantón Archidona..... | 14 |
| Tabla 3-2: | Códigos y descripciones de los tratamientos de estudio para es extracto alcohólico | 16 |
| Tabla 4-2: | Códigos y descripciones de los tratamientos de estudio para es extracto acuoso... | 16 |
| Tabla 5-2: | Preparación extracto puro..... | 18 |
| Tabla 6-2: | Preparación extracto puro..... | 19 |
| Tabla 7-2: | Extracto de las hojas y resinas de <i>Dacryodes peruviana</i> | 21 |
| Tabla 8-2: | Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico..... | 24 |
| Tabla 9-2: | Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso | 28 |
| Tabla 1-3: | Prueba de Tukey al 5% para los de inhibición en (mm) a las 120 h | 56 |
| Tabla 2-3: | Prueba de Tukey al 5% para los de inhibición en (mm) a las 120 h | 57 |
| Tabla 3-3: | Prueba de Tukey al 5% para los de inhibición en (mm) a las 120 h | 58 |
| Tabla 4-3: | Prueba de Tukey al 5% para los de inhibición en (mm) a las 120 h | 59 |
| Tabla 5-3: | Comparación del extracto alcohólico entre la resina y hojas del tamizaje fitoquímico realizado..... | 60 |
| Tabla 6-3: | Comparación del extracto acuoso entre la resina y hojas del tamizaje fitoquímico realizado | 61 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|---------------------|---|----|
| Figura 1-1 | Taxonomía del árbol de <i>Dacryodes peruviana</i> (Copal)..... | 4 |
| Figura 2-1. | Distribución geográfica de la Familia Burseracea en América..... | 5 |
| Figura 3-1. | <i>Fusarium</i> sp..... | 8 |
| Figura 4-1 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 10 |
| Figura 1-2. | Ubicación de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y de cada uno de los laboratorios utilizados | 12 |
| Figura 2-2 | Ubicación del sitio de recolección del material vegetativo | 14 |
| Figura 3-2. | Muestra dendrológica fértil de <i>Dacryodes peruviana</i> | 15 |
| Figura 4-2. | Separación del material contaminado y enfundado del material vegetal útil para los extractos | 17 |
| Figura 5-2. | Hojas molidas | |
| Figura 6-2. | Embazado de las hojas molidas..... | 19 |
| Figura 7-2. | Concentraciones del extracto..... | |
| Figura 8-2. | Filtrado de los extractos de hojas alcohólico y acuoso respectivamente | 19 |
| Figura 9-2. | Resina triturada..... | |
| Figura 10-2 | Embazado de la resina triturada..... | 20 |
| Figura 11-2 | Concentraciones del extracto..... | |
| Figura 12-2 | Filtrado de los extractos de resina alcohólico y acuoso respectivamente | 20 |
| Figura 13-2. | Tamizaje fitoquímico y materiales usados | 23 |
| Figura 14-2. | Tubo criovial (<i>Fusarium</i> sp)..... | 31 |
| Figura 15-2. | Medio de cultivo PDA | 31 |
| Figura 16-2. | Siembra del hongo puro en el medio PDA..... | 32 |
| Figura 17-2 | Tubo criovial de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 33 |
| Figura 18-2. | Evaluación de la actividad anti-fúngica de los extractos acuoso para <i>Fusarium</i> sp. (Hongo)..... | 35 |
| Figura 19-2. | Evaluación de la actividad anti-bacteriana del extracto alcohólico para <i>Ralstonia solanacearum</i> (Bacteria)..... | 36 |
| Figura 20-2. | Colocamos una gota del inculo..... | |
| Figura 21-2 | Placa lista para poder observar | 37 |
| Figura 22-2. | Conteo de las células..... | |
| Figura 23-2 | Fotografía de las Unidades formadoras de colonias (UFC)..... | 37 |
| Figura 1-3. | Halos de inhibición de <i>Fusarium</i> sp. a las 120h del extracto acuoso al 50% de | |

| | | |
|---------------------|--|----|
| | resina. | 38 |
| Figura 2-3. | Halos de inhibición de <i>Fusarium</i> sp. a las 120h del extracto alcohólico al 35% de resina. | 39 |
| Figura 3-3. | Halos de inhibición de <i>Fusarium</i> sp. a las 120h del extracto alcohólico al 35% de resina. | 40 |
| Figura 4-3. | Representación de los resultados obtenidos en el estudio con el extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25% que no presento efecto anti-fúngico ante <i>Fusarium</i> sp. | 42 |
| Figura 5-3. | Halos de inhibición de <i>Fusarium</i> sp. a las 120h del extracto alcohólico al 50% de resina. | 43 |
| Figura 6-3. | Halos de inhibición de <i>Fusarium</i> sp. a las 120h del extracto alcohólico al 35% de resina. | 44 |
| Figura 7-3. | Halos de inhibición de <i>Fusarium</i> sp. a las 120h del extracto alcohólico al 35% de resina. | 45 |
| Figura 8-3. | Halos de inhibición de <i>Fusarium</i> sp. a las 120h del extracto alcohólico al 50% de hojas..... | 46 |
| Figura 9-3. | Halos de inhibición de <i>Fusarium</i> sp. a las 120h del extracto alcohólico al 35% de hojas..... | 47 |
| Figura 10-3. | Halos de inhibición de <i>Fusarium</i> sp. a las 120h del extracto alcohólico al 25% de hojas..... | 48 |
| Figura 11-3. | Representación de los resultados obtenidos en el estudio con el extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25% que no presento efecto anti-bacterial ante <i>Ralstonia solanacearum</i> | 50 |
| Figura 12-3. | Representación de los resultados obtenidos en el estudio con el extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25% que no presento efecto anti-bacterial ante <i>Ralstonia solanacearum</i> | 51 |
| Figura 13-3. | Halos de inhibición de <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 120h del extracto alcohólico al 50% de hojas..... | 52 |
| Figura 14-3. | Halos de inhibición de <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 120h del extracto alcohólico al 35% de hojas..... | 53 |
| Figura 15-3. | Halos de inhibición de <i>Ralstonia solanacearum</i> a las 120h del extracto alcohólico al 25% de hojas..... | 54 |
| Figura 16-3. | Representación de los resultados obtenidos en el estudio con el extracto alcohólico de resina al 50%, 35% y 25% que no presento efecto anti-bacterial ante <i>Ralstonia solanacearum</i> | 55 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|---------------------|---|----|
| Gráfico 1-3. | Comparación de los halos de inhibición con los tres extractos acuoso de resina para <i>Fusarium</i> sp. | 41 |
| Gráfico 2-3. | Comparación de los halos de inhibición con los tres extractos alcohólicos de resina para <i>Fusarium</i> sp. | 45 |
| Gráfico 3-3. | Comparación de los halos de inhibición con los tres extractos alcohólicos de resina para <i>Fusarium</i> sp. | 49 |
| Gráfico 4-3. | Comparación de los halos de inhibición con los tres extractos alcohólicos de hojas para <i>Ralstonia solanacearum</i> | 54 |

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A.** Datos de las medias de los halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120 h del extracto acuoso de resina al (50,35 y 25) %
- ANEXO B.** Análisis de varianza para los halos de inhibición (mm) a las 120 h del extracto acuoso de resina
- ANEXO C.** Datos de las medias de los halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120 h del extracto alcohólico de resina al (50,35 y 25) %
- ANEXO D.** Análisis de varianza para los halos de inhibición (mm) a las 120 h del extracto alcohólico de resina
- ANEXO E.** Datos de las medias de los halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120 h del extracto alcohólico de hojas al (50,35 y 25) %
- ANEXO F.** Análisis de varianza para los halos de inhibición (mm) a las 120 h del extracto alcohólico de hojas
- ANEXO G.** Datos de las medias de los halos de inhibición de *Ralstonia solanacearum* a las 120 h del extracto alcohólico de hojas al (50,35 y 25) %
- ANEXO H.** Análisis de varianza para los halos de inhibición (mm) a las 120 h del extracto alcohólico de hojas
- ANEXO I.** Identificación *Dacryodes peruviana*
- ANEXO J.** Moteje de la muestra
- ANEXO K.** Reconocimiento del material vegetal
- ANEXO L.** Maceración de la Resina y Hojas
- ANEXO M.** Equipos usados para la extracción de los extractos alcohólico y acuoso de *Dacryodes peruviana*
- ANEXO N.** Almacenamiento en botellas ámbar de 500 mL
- ANEXO O.** Activación de las bacterias y hongos
- ANEXO P.** Montaje de la fase del estudio
- ANEXO Q.** Extractos usados en la investigación
- ANEXO R.** Halos de inhibición de *Fusarium sp.*
- ANEXO S.** Halos de inhibición de *Ralstonia solanacearum*
- ANEXO T.** Permiso de investigación de *Dacryodes peruviana*
- ANEXO U.** Certificado de *Dacryodes peruviana*

RESUMEN

El principal objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad anti-fúngica y anti-bacterial del extracto alcohólico y acuoso de las hojas y resina de *Dacryodes peruviana* como controlador biológico de *Ralstonia solanacearum* y *Fusarium* sp. Para lo cual se identificó, recolecto y almacenó las hojas y resina de *Dacryodes peruviana*, para la extracción de los diferentes extractos tanto alcohólico como acuoso se utilizó el método de maceración que consiste en el proceso solido-líquido para realizar esto se utilizó las hojas y resina trituradas con el fin de conseguir los dos extractos que fueron probados a nivel de laboratorio; para la activación de la bacteria y el hongo se lo realizó en diferentes medio de cultivo como son el Agar Nutritivo para la bacteria y Agar papa dextrosa para el hongo y se los encubó. Una vez activado los dos microorganismos se realizó la determinación del potencial anti-fúngico y anti-bacterial que consiente en lo siguiente una vez que tenemos el medio de cultivo inoculado con la bacteria y el hongo se procedió a inocular los extractos acuosos y alcohólicos de *Dacryodes peruviana* a diferentes concentraciones que fueron al 50%, 35% y 25% para el hongo y la bacteria se utilizó la metodología de inoculación directa colocando 4 gotas de 25 µL del extracto alcohólico y acuoso, se implementó un diseño experimental de tipo (DCA) Diseño completo al azar con cinco repeticiones para cada experimento. En cada tratamiento se midió los halos de inhibición a las 120 h. existiendo diferencias significativas entre los tratamientos, la eficiencia del extracto alcohólico fue mayor que la del extracto acuoso tanto para *Fusarium* sp como para *Ralstonia solanacearum* con esto se puede concluir que existe potencial anti-fungico y anti-bacterial en los extractos, dándonos una pauta para nuevas investigaciones.

Palabras clave: <FORESTAL>, <EXTRACTO ALCOHÓLICO>, <EXTRACTO ACUOSO> <COPAL (*Dacryodes peruviana*)>, <HONGO (*Fusarium* sp)>, <BACTERIA (*Ralstonia solanacearum*)>

LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS

Firmado digitalmente por LUIS
ALBERTO CAMINOS VARGAS
Nombre de reconocimiento (DN)

c=EC, l=RIOBAMBA,
serialNumber=0602766974, cn=LUIS
ALBERTO CAMINOS VARGAS
Fecha: 2021.04.05 10:32:00 -05'00'



0924-DBRAI-UTP-2021

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the antifungal and antibacterial activity of the alcoholic and aqueous extract of the leaves and resin of *Dacryodes peruviana* as controller *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium sp.* The leaves and resin of *Dacryodes peruviana* were identified, collected and stored in order to get the different extracts both alcoholic and aqueous through the maceration method. This method consists of the solid-liquid. To do this, the leaves and crushed resin were used in order to obtain the two extracts that were tested at the laboratory level. Different culture mediums were carried out for the activation of the bacteria and the fungus such as Nutritive Agar for the first one and Potato Dextrose Agar for the second one, which were covered them up. Once the two microorganisms were activated, the determination of the antifungal and antibacterial potential were performed. Once the medium culture was inoculated with the bacteria and the fungus, the aqueous extracts were inoculated and *Dacryodes peruviana* alcoholics at different concentrations that were 50%, 35% and 25% for the fungus and the bacteria, the direct inoculation methodology was used, placing 4 drops of 25 µL of the alcoholic and aqueous extract, an experimental design of the Complete Design type was implemented at the random with five repetitions for each experiment. In each treatment the halos of inhibition at 120 h. with significant differences between the treatments, the efficiency of the alcoholic extract was higher than that of the aqueous extract for both *Fusarium sp* and *Ralstonia solanacearum*. It was concluded that there was antifungal and antibacterial potential in excerpts, providing a guideline for further research.

Keywords: <FOREST ENGINEERING>, <ALCOHOLIC EXTRACT>, <EXTRACTA QUEOUS> <COPAL (*Dacryodes peruviana*)>, <FUNGUS (*Fusarium sp*)>, <BACTERIA (*Ralstonia solanacearum*)>.

Riobamba, April 12, 2021

Translated by:



Firmado digitalmente por
DENNY V. L. LOPEZ
TENELANDA LOPEZ
Fecha: 2021.04.12
13:58:25 -05'00'

Mgs. Dennys Tenelanda López
PROFESSOR OF EFL

INTRODUCCIÓN

El Ecuador es considerado como un país diverso, y dentro de él observamos que prevalece una gran variedad de especies forestales, lo que proporcionan un envidiable potencial para desarrollar una gran variedad de productos no maderables; sin embargo, las industrias apetece la extracción de especies que rigen el mercado actual, de manera que se deja de lado a las restantes por no contar con estudios que permitan conocer sus bondades y uso (Estrella et al, 2005).

Existen algunas plantas que funcionan eficazmente como fungicidas orgánicos en el combate de hongos, bacterias, Insectos, para aplicación en fitopatología. Los fungicidas, herbicidas e insecticidas son plaguicidas utilizados en la protección de cultivos, un fungicida es un tipo particular de plaguicida que controla enfermedades fúngicas, inhibiendo o eliminando al hongo que causa la enfermedad (Juste, 2019).

El problema fitosanitario mayor en los viveros es una enfermedad conocida como el complejo damping-off, mal del semillero, secadera de la planta, mal del talluelo, ahogamiento, chupadera y pudrición de raíces. La enfermedad de la secadera la produce un complejo de hongos del suelo, y destacan: *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Botrytis* sp. y *Fusarium* sp (García et al., 2016).

Ralstonia solanacearum es una bacteria fitopatógena relevante y extendida que causa una enfermedad de marchitez con efectos sobre muchos cultivos y plantas ornamentales de importancia económica. Tiene determinantes de patogenicidad efectivos para invadir y colonizar plantas hospedantes, pero también exhibe estrategias exitosas para sobrevivir en condiciones difíciles (Álvarez, Biosca y López, 2010)

En la actualidad la tendencia por el uso o aplicación de productos naturales se encuentra en auge debido a que la mayoría de las empresas industriales están enfocándose en el desarrollo de productos saludables para así satisfacer la demanda del mercado que cada vez se interesa en adquirir productos de origen natural por su enfoque holístico de bienestar (Amaguaña, y Churuchumbi, 2018 p. 10-35).

Las malas prácticas de cultivo y el uso inadecuado de abonos y pesticidas químicos, han provocado una disminución en la productividad de las parcelas campesinas, por lo que continuamente se busca la ampliación hacia los suelos fértiles del bosque. La presente investigación tiene como prioridad buscar una alternativa amigable con el medio ambiente y potenciar los productos no maderables, con la elaboración de extractos vegetales dando una solución amigable con el medio ambiente, la salud humana y el control de los patógenos. Lamentablemente, las consecuencias del uso irracional de agroquímicos se evidencian también en la salud de los seres humanos, presentándose en enfermedades como el cáncer, alteraciones

genéticas, intoxicaciones, esterilidad y muerte; y en la aparición de plagas, enfermedades y malezas más abundantes y resistentes, incremento de la salinidad y agotamiento del suelo (Ramó, y Rodas, 2007 p. 15-58).

JUSTIFICACIÓN

El uso de agroquímicos en la actualidad es una de los problemas principales que presentan las industrias forestales, agrícolas, frutícolas y el medio ambiente ya que estos generan daños irreversibles en el tiempo, debido a esto se investigan nuevas alternativas que sean eficiente y puedan reemplazar con gran facilidad a los productos químicos buscando la sostenibilidad del planeta. Con el avance de la ciencia se ha ido buscando nuevas alternativas para reducir el uso de los productos químicos que afecten el medio ambiente, los extractos naturales se encuentran en el auge, esto tiene un gran futuro por delante. Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa para protegerse de las plagas, sintetizando gran variedad de metabolitos secundarios para usarlos como mecanismos de defensa, por lo que resulta conveniente explorar el potencial de empleo de sus extractos, estos no son usados por falta de investigaciones.

Con el presente estudio se investigará los efectos anti fúngicos y antibacteriales de *Dacryodes peruviana* frente a uno los hongos que conforman el Damping off y la bacteria *Ralstonia solanacearum* para la aplicación en fitopatología, dando potencialidad al aprovechamiento de los productos forestales no maderables en la Amazonía

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar la actividad anti-fúngica y anti-bacterial de un extracto alcohólico y acuoso de hojas y resina de *Dacryodes peruviana* (copal), bajo condiciones de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el potencial antifúngico de un extracto acuoso de *Dacryodes peruviana* para controlar un hongo del Damping off.
2. Determinar el potencial antifúngico de un extracto alcohólico de *Dacryodes peruviana* para controlar un hongo del Damping off.
3. Determinar el potencial antibacteriano de un extracto acuoso de *Dacryodes peruviana* para controlar *Ralstonia*.
4. Determinar el potencial antibacteriano de un extracto alcohólico de *Dacryodes peruviana* para controlar *Ralstonia*.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA- H0

Los extractos de *Dacryodes peruviana* no presenta propiedades fúngicas o bactericidas para la aplicación en fitopatología.

HIPÓTESIS ALTERNANTE- H1

Los extractos de *Dacryodes peruviana* presenta propiedades fúngicas o bactericidas para la aplicación en fitopatología.

CAPÍTULO 1

I. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 *Dacryodes peruviana* (Copal)

1.1.1 Taxonomía

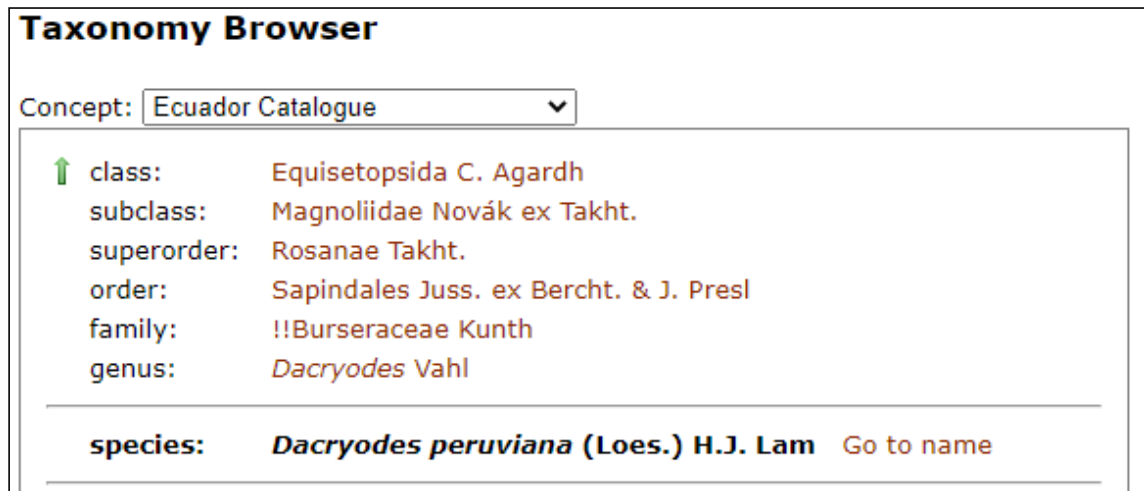


Figura 1-1 Taxonomía del árbol de *Dacryodes peruviana* (Copal).

Fuente: (Lam, 1982)

1.1.2 Generalidades

El Ecuador es considerado como uno de los países con mayor biodiversidad del planeta. Esta biodiversidad no se limita al número de especies por unidad de área, también incluye los distintos tipos de ambiente naturales o ecosistemas que aquí existen (Bravo, 2014). Desde una ciudad interandina podemos llegar a desiertos, nieves eternas, páramos, lagos, bosques húmedos altos y bajos, manglares y océanos en pocas horas en un vehículo. La cantidad de ecosistemas, especies y variedades de estas especies en nuestro país es impresionante y en algunos casos somos los "campeones del mundo" a pesar de nuestro tamaño relativamente muy pequeño (formamos parte de los que se conocen como países "mega diversos" (UICN y Ecocinecia, 2015).

1.1.3 Familia Burseraceae

En la familia Burseraceae se reconocen hoy día 18 géneros, con más de 600 especies distribuidas por los países de América tropical, Malasia y el Noroeste de Africa. Ocho géneros están representados en el continente americano, seis de los cuales son endémicos (Bursera,

Crepidospermum, Hemicrepidospermum, Paraprotium, Tetragastris y Trattinickia); los otros dos (Dacryodes y Protium) se extienden también al viejo mundo. Esta familia se compone de árboles y arbustos provistos de conductos (Robles, 2000).



Figura 2-1. Distribución geográfica de la Familia Burseraceae en América.

Fuente: (Stevens, 2001)

1.1.4 Descripción Botánica

Dacryodes peruviana fue descrita por (Loes.) H.J.Lam y publicado en Bulletin du Jardin Botanique de Buitenzorg, árbol de unos 50-120 cm de diámetro y 20-35 m de altura total, con el fuste recto, la ramificación en el segundo tercio, la base del fuste sin modificaciones o con aletas pequeñas de hasta 0.5 m de alto (Alvarez, 2017).

Corteza externa: lenticelada color marrón claro, las lenticelas circulares, de unos 3-5 mm de diámetro, regularmente distribuidas y poco protuberantes (Alvarez, 2017).

Corteza interna: homogénea, color rosado blanquecino, con olor fuerte y resinoso, similar al del incienso o la trementina; al ser cortada exuda una resina traslúcida, oleosa y con el fuerte olor descrito, el exudado muy lento y en gotitas; la resina es inflamable cuando seca (Alvarez, 2017).

Hojas compuestas: imparipinnadas, alternas y dispuestas en espiral, de unos 45- 70 cm de longitud, el peciolo de 18-25 cm de longitud, plano en la haz, los folíolos 7-9, los laterales opuestos, los peciolos de 1 cm de longitud, pulvinulados, las láminas oblongas, de 20-30cm de longitud y 8-10 cm de ancho, enteras, los nervios secundarios 14-16 pares, prominulos por ambas caras, la nervación terciaria reticulada, el ápice rotundo a obtuso con un acumen de 1-1.5 cm de

longitud, la base aguda, algo asimétrica en los folíolos laterales, las hojas glabras (Alvarez, 2017).

Inflorescencias: en panículas terminales a subterminales de 12-20 cm de longitud, multifloras (Alvarez, 2017).

Fruto: ovoide, de 1.5-2.cm de longitud, con la superficie lisa y rojiza, drupáceo e indehiscente; el pericarpio es carnoso y balsamífero, y contiene un endocarpio leñoso o pirreno con 2-3 cavidades y una sola semilla por aborto de las otras (Alvarez, 2017).

1.1.5 Usos

Uno de los principales usos de *Daryodes peruviana* es como fuente de alimentación ya que una vez que el fruto está maduro este es comestible siendo consumido por las comunidades aborígenes del lugar. Su madera es utilizada para diversos trabajos como: carpintería, viviendas, leña y la comercialización de la misma. Otras de las bondades de esta especie es su resina que es utilizada como fuente para la fabricación de inciensos y como fuente de combustible para los mecheros (Alvarez, 2017).

Los frutos son alimento de monos y aves. Los frutos son para consumo humano. La resina se usa como incienso. El tronco se emplea en la construcción de viviendas, ebanisterías y carpinterías (Pérez y Valencia, 2019).

1.1.6 Composición Química

El copal es una oleorresina compuesta por monoterpenos, diterpenos y flavonoides. En cuanto a la densidad de la resina, los monoterpenoides presentan una densidad menor a 1g/cm³ y el diterpeno de 1.27 g/cm³, la densidad obtenida de la resina resultó de 1.017 g/cm³. Por medio de la técnica de difracción de rayos X, determino que el copal presenta regiones cristalinas en su estado nativo, pero al someterlo a procesos de mezclado y calentamiento, se modifican sus propiedades estructurales, presentando rasgos característicos de un amorfo (Pilatuña, 2016).

Este árbol exuda una oleo-gomo-resina al ser dañada la corteza. La resina se compone de terpenoides, los componentes volátiles son a menudo diterpenos compuestos fenólicos tales como flavonoides, cumarinas y varios lignanos. El copal consiste en una mezcla compleja de componentes orgánicos insolubles en agua, que son sobre todo terpenos predominando esqueletos de labdano con fracciones menores de mono y sesquiterpenos (Pilatuña, 2016).

1.1.6.1 Terpenos

Son una familia de compuestos diversos que tienen esqueletos formados por unidades de isopentilo (isopreno) se suelen aislar de los aceites esenciales de las plantas (Pilatuña, 2016).

1.1.6.2 Mono terpenos

Son usualmente la clase dominante en la familia, con Limoneno, α -felandreno y pcimeno particularmente muy distribuidos. Derivados monocíclicos también están presentes como aldehídos, cetonas y con menor frecuencia los ácidos. Monoterpenos bicíclicos incluyen los del tipo tujano, pinano y canfano (Pilatuña, 2016).

1.1.6.3 Sesquiterpenos

Constituyen la fracción de ebullición de los aceites esenciales. Más de 30 diferentes sesquiterpenos están registrados con una amplia variación de estructuras (Pilatuña, 2016).

1.1.6.4 Triterpenos

En las resinas de las Burseraceas se encuentran triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos. Los cuales pueden ser clasificados en 4 series: tetracíclicos: euphano, tirucalano pentacíclicos: lupano, ursano y oleanano (Pilatuña, 2016).

1.1.6.5 Flavonoides

Son a menudo importantes en sistemática vegetal, pero muy pocos han sido reportados en los copales (Pilatuña, 2016).

1.1.6.6 Quinonas

Las antraquinonas son una clase de metabolitos secundarios vegetales con una funcionalidad p-quinoides en un núcleo antracénico, se caracterizan por su acción antibacterianas y antifúngicas y las antraquinonas por su acción laxante (Pilatuña, 2016).

1.2 Damping off.

el termino Damping-off describe la muerte de las semillas por enfermedades fungosas, antes o después de la emergencia. El mayor responsable de la falta de salud de las plántulas en las instalaciones de producción son las micosis que dan lugar a esta infección que es producida por hongos (Schwirllich, 2002).

1.2.1 Fusarium sp.

En el género *Fusarium* se han reconocido entre nueve y 78 especies, dependiendo del sistema taxonómico utilizado, el cual se basa principalmente en las características culturales de las colonias y de las esporas del hongo. Los principales causantes de enfermedades de las plantas

son: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides* (Arbeláez, 2000).

1.2.1.1 Taxonomía

Tabla 1-1: Clasificación taxonómica de *Fusarium* sp

| | |
|---------|-----------------|
| Phyllum | Ascomycota |
| Clase | Sordariomycetes |
| Orden | Hypocreales |
| Familia | Nectriaceae |

Fuente: (Global catalogue of microorganisms, 2020)

Elaborado por: Molina A. 2021

1.2.1.2 Característica

Fusarium es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, Existen distintos medios que permiten su crecimiento; entre ellos, agar papa dextrosa (PDA) con esto podemos observar el diámetro de la colonia, morfología y pigmento (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) (Tapia y Amaro, 2014).



Figura 3-1. *Fusarium* sp.

Realizado por: (Molina A.2021)

1.2.1.3 Daños causados

Fusarium spp. en su avance, libera toxinas y los síntomas característicos que presenta la planta, son marchitez vascular, clorosis de hojas, enanismo y pudrición seca de túberos. Al morir la planta, el hongo queda en los restos de los tejidos vegetales invernando como espóra, micelio o clamidospora; éstas se dispersan a otras áreas por: el viento, propágulos vegetales o semillas infectadas, lluvia, maquinaria o implementos agrícolas (Andrea y Almonacid, 2005).

Las enfermedades de las plantas causadas por especies del género *Fusarium* consisten en marchitamientos vasculares, manchas y añublos de las hojas, pudrición de raíces y de tallos, pudrición de frutos, granos y semillas (Arbeláez, 2000).

1.3 *Ralstonia solanacearum*

Por lo menos tres razas de *Ralstonia solanacearum* son las que producen enfermedades en varios hospedantes como son las solanáceas y algunos plátanos; otras sólo atacan a plantas de la familia del plátano y una tercera ataca a la papa y en ocasiones al tabaco (Chavarro et al. 2006).

En el plátano y banano causa moko, y en papa la enfermedad se conoce como dormidera, pudrición parda o marchitez bacteriana. *R. solanacearum* se diferencia por el rango de hospedero que ataca, distribución geográfica y propiedades fisiológicas (Chavarro et al. 2006).

1.3.1 *Taxonomía*

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de *Ralstonia solanacearum*

| | |
|---------|-------------------------------|
| Dominio | Bacteria |
| Filo | Proteobacteria |
| Clase | Beta Proteobacteria |
| Orden | Burkholderiales |
| Familia | Ralstoniaceae |
| Genero | Ralstonia |
| Especie | <i>Ralstonia solanacearum</i> |

Fuente:(Herbario Virtual s.f)

Elaborado por: Molina A. 2021

1.3.2 *Características*

Ralstonia solanacearum puede causar graves pérdidas en muchos cultivos de importancia económica. Es una bacteria gramnegativo, no encapsulados y no formaban esporas. Tiene forma de bastón, estrictamente aeróbica, de 0.5-0.7 x 1.5-2.0 µm de tamaño. Es muy sensible a la desecación y se inhibe en cultivo por bajas concentraciones 2% de cloruro de sodio (NaCl) (Chandrashekara y Prasannakumar, 2010). La temperatura óptima de crecimiento es de 27- 32°C, sin embargo, algunas cepas tienen una temperatura óptima inferior de 27°C (Herbario Virtual. s.f).

Según Torres, Díaz y Casas (2013) La bacteria se caracteriza por formar colonias de aspecto mucoide debido a su abundante producción de polisacáridos.

Las colonias normales son lisas, fluidas, irregularmente redondeadas y opacas. En entorno de Kelman, que contiene tetrazolio, las colonias son de centro rojizo y bordes blancos, mientras que las avirulentas son totalmente rojas, tradicionalmente, también *R. solanacearum* ha sido dividida en cinco biovars y en cinco razas, con base en propiedades bioquímicas y en la reacción sobre una gama de hospedantes, respectivamente. Sin embargo, no hay una relación perfecta entre la diferenciación de razas y la clasificación en biovars (Remache, 2018).

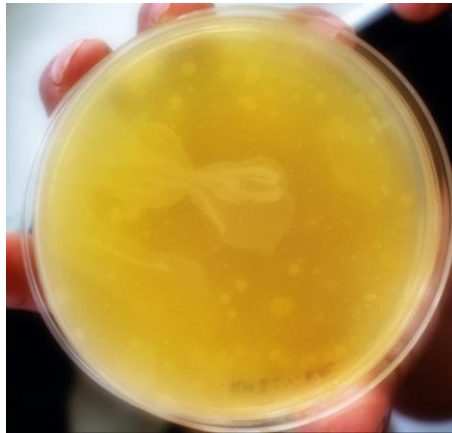


Figura 4-1 *Ralstonia solanacearum*.

Realizado por: Molina A. 2021

1.3.3 Distribución

Tabla 3-1: Distribución geográfica de *Ralstonia solanacearum*

| | |
|-----------------------------|---|
| Asia | Filipinas, Indonesia, Malasia (Sabah, Oeste), India (Tamil Nadu, Bengala Occidental), Tailandia, Vietnam, Sri Lanka, Taiwán |
| África | Etiopía, Libia, Malawi, Nigeria, Senegal, Sierra Leona, Somalia |
| América central y el Caribe | Belice, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Granada, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Jamaica, Martinica, Nicaragua, Panamá, San Vicente y las Granadinas, Trinidad y Tobago. |
| América del Norte | México (Chiapas y Tabasco) y Estados Unidos de América (Florida). |
| América del Sur | Argentina, Brasil (Amapá, Amazonas, Bahía), Colombia, Ecuador, Guyana, Paraguay, Perú, Surinam y Venezuela. |
| Europa | Países bajos |

Fuente:(SADER, 2017).

Elaborado por: Molina A. 2021

1.3.4 Signos y síntomas

Marchitamiento general la bacteria invade a las plantas hospederas a través de la raíz y coloniza los vasos del xilema en el sistema vascular. Las plantas infectadas muestran disminución de crecimiento, amarillamiento, marchitamiento repentino y mueren rápidamente (Sanchez Perez et al., 2008).

Uno de los síntomas con mayor presencia es en la sección de los tallos que son los más infectados por un exudado viscoso y lechosos que son claros síntomas de bacterias con mayor recurrencia en el xilema (Champoiseau, Jones y Allen, 2009).

1.4 Medios de cultivos

Formulación de sustancias que contienen compuestos naturales y/o sintéticos, en forma líquida, semi-sólida o sólida que tienen como propósito permitir la multiplicación, o preservar la viabilidad de microorganismos. La mayoría de hongos y bacterias fitopatógenas pueden cultivarse en medios de cultivos artificiales, sólidos o líquidos. La mayoría de los hongos crecen en medios de cultivo de alto contenido de carbohidratos, con un pH entre 5 y 6, mientras que las bacterias crecen mejor a un pH próximo a 7. No existe un medio perfecto para el cultivo de hongos y bacterias ya que las exigencias de las diferentes especies varían considerablemente (Enríquez, 2016).

1.4.1 Agar nutritivo (AN)

Nutrient Agar (agar nutriente) es un medio de uso general para cultivo de una amplia variedad de organismos bacterianos (BBL Nutrient Agar, 2006).

1.4.2 Agar patata dextrosa (PDA)

Agar de dextrosa de papa se utiliza para el aislamiento, enumeración y cultivo de levaduras y mohos a partir de muestras. También se puede utilizar en la identificación de hongos y levaduras en paralelo con su morfología celular (Xu et al., 2008).

Según Xu et al., (2008) es un medio efectivo para poder observar los aspectos morfológicos y la coloración de la colonia. Su mayor contenido de carbohidratos ayuda para un mayor crecimiento, en la carencia de la esporulación que suele tardar hasta un mes.

1.5 Maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretenden extraer. También la maceración puede ser simple y estática que consiste en colocar el material en contacto con el solvente, en recipientes o equipos cerrados, protegidos de la luz solar, a temperatura ambiente por unas horas o varios días y meses en maceración. Se realiza agitaciones ocasionales (Tituaña, 2013).

CAPÍTULO II

II. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Localización del Sitio de investigación

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales, en los laboratorios de productos naturales y de Análisis Bioquímico de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.1.1 Ubicación Geográfica

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo está ubicada en la Panamericana Sur km 1 ½ Riobamba-Ecuador.

El laboratorio de la Facultad de Ciencias se ubica a 2837 msnm

El laboratorio de la Facultad de Recursos Naturales está ubicada a 2831 msnm

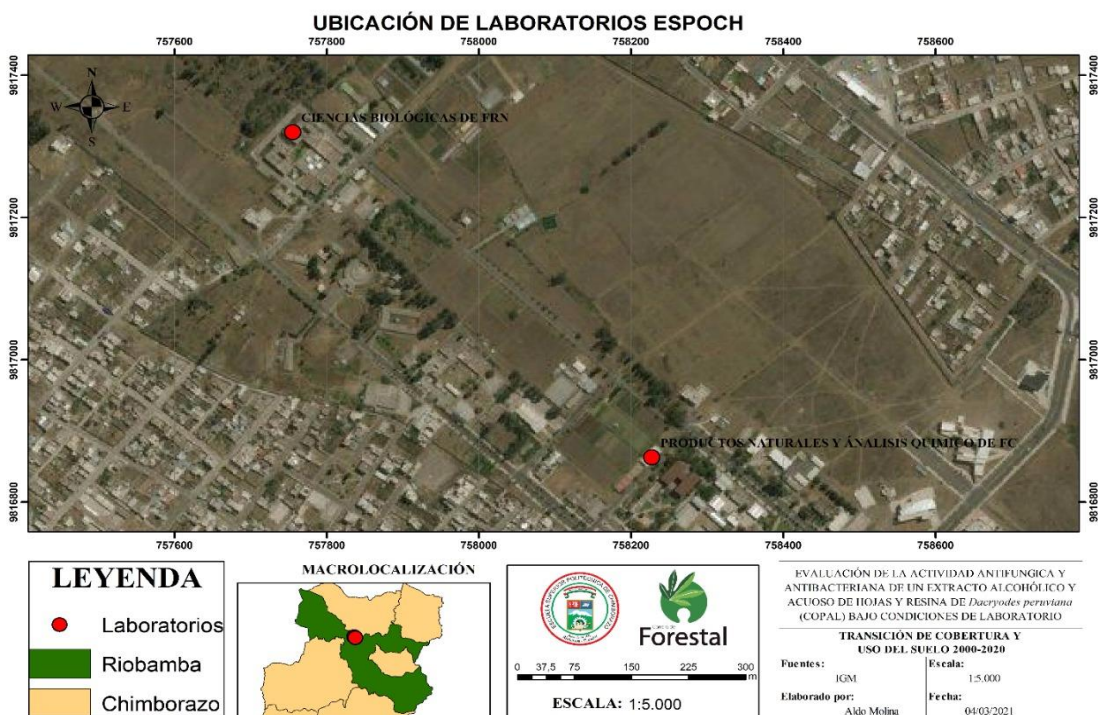


Figura 1-2. Ubicación de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y de cada uno de los laboratorios utilizados

Realizado por: Molina A. 2021

2.2.1 Condiciones Climáticas del entorno

Según la Estación Meteorológica ESPOCH (2019) las características climáticas del cantón Riobamba son:

Tabla 1-2: Características Climáticas del Cantón Riobamba

| | |
|-----------------------------------|---------------------------|
| Velocidad del viento: | 2,0 m/s |
| Precipitación Atmosférica: | 491,3 mm H ₂ O |
| Presión Atmosférica: | 544,5 mm hg |
| Temperatura: | 13,6 ° C |
| Humedad Relativa: | 71,50% |
| Heliófila: | 42% |
| Tensión de Vapor: | 11,4 mlb |
| Punto de Rocío: | 8,8 ° C |

Fuente:(Estación Agrometeorológica - ESPOCH 2019).

Elaborado por: Molina A. 2021

2.2 Localización del sitio que se obtuvo el material vegetal

El material para la elaboración de los extractos copal (*Dacryodes peruviana*) fue obtenido de Comunidad Pachakutik, Parroquia Cotundo, Cantón Archidona, Provincia de Napo.

2.2.1 Ubicación geográfica

La Comunidad Pachakutik se encuentra en la Parroquia Cotundo, Cantón Archidona, Provincia de Napo A 1097,85 msnm con las coordenadas -77.724869S, -0.718763W.

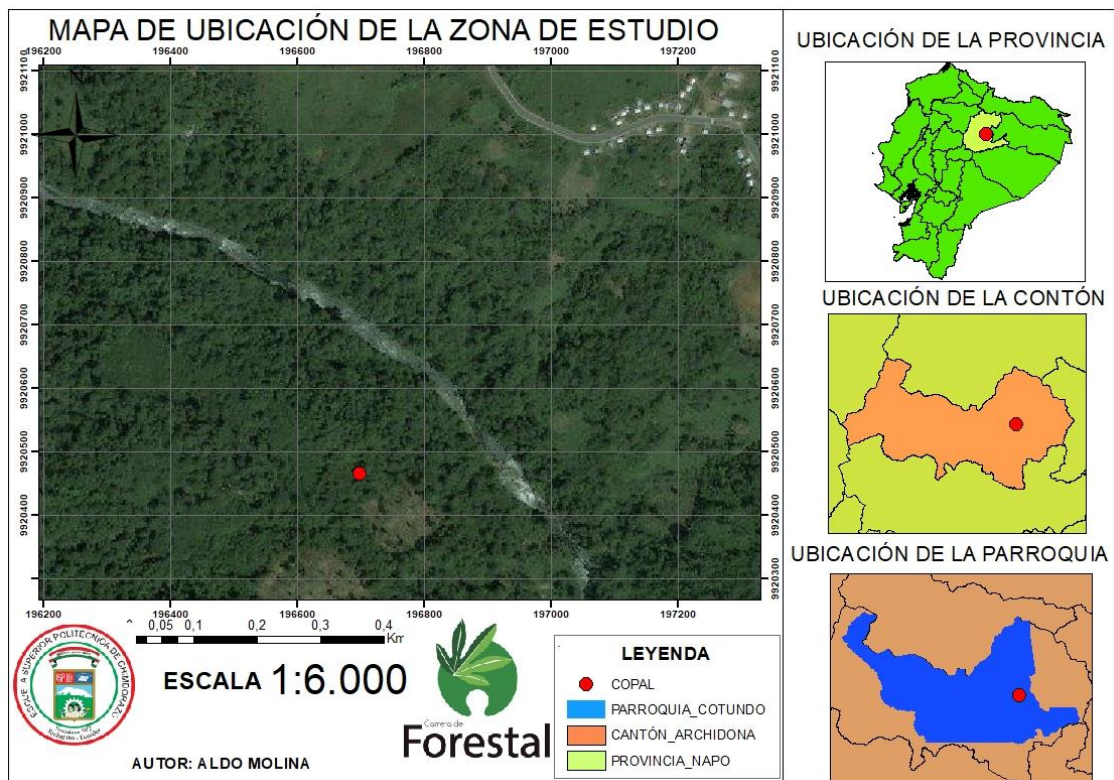


Figura 2-2 Ubicación del sitio de recolección del material vegetativo

Elaborado por: Molina A. 2021

2.2.2 Condiciones Climáticas

Según INAMHI-PDOT (2019); las condiciones climática del cantón Archidona son:

Tabla 2-2: Características Climáticas del Cantón Archidona

| | |
|--------------------------------------|------------------|
| Temperatura Promedio anual: | 24°C |
| Velocidad del viento: | 2.3 m/seg |
| Precipitación Promedio anual: | 4.000 y 5.000 mm |
| Humedad Relativa | 80% |

Fuente: (INAMHI-PDOT, 2019)

2.3 Identificación del material vegetativo (*Dacryodes peruviana*)

En primer lugar, se identificó una rama fértil (es decir en etapa de floración o fructificación) después se procedió a recolectar una muestra dendrológica de (*Dacryodes peruviana*) se la etiqueto y la prensamos para poderla conservar, esta fue previamente identificada en el herbario

de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo con la ayuda de la colección de los especímenes vegetales del herbario.



Figura 3-2. Muestra dendrológica fértil de *Dacryodes peruviana*

Realizado por: Molina A. 2021

2.3.1 *Recolección del componente vegeta*

Una vez identificada la especie se continuo con la fase de recolección de las hojas y resina de *Dacryodes peruviana* en la Comunidad de Pachakutik , Parroquia Cotundo, Cantón Archidona, Provincia de Napo.

2.4 Tipo de investigación

El presente estudio es de categoría empírica, con evaluaciones del extracto alcohólico y acuso de hojas y resina de *Dacryodes peruviana* para contrarrestar el crecimiento de los hongos (*Fusarium sp*) y bacterias (*Ralstonia solanacerum*). E ilustrativo ya que atreves de la recopilación de diferentes autores y bibliografías podemos establecer diversos efectos inhibitorios.

2.4.1 *Identificación de la variable*

Dependiente

- Halos de inhibición evaluados en (mm) del desarrollo de *Fusarium sp* y *Ralstonia solanacearum*

Independiente

- Distintas concentraciones del extracto alcohólico y acuoso de *Dacryodes peruviana*

2.5 Diseño experimental

El modelo empleado fue un diseño completo al azar (DCA), con 5 repeticiones y cada repetición con 4 submuestras para cada concentración, en cada extracto se trabajó con tres concentraciones al 50, 35 y 25% respectivamente, además se utilizó una tabla para registrar el tamaño del halo de inhibición en milímetros; obtenido experimentalmente a diferentes concentraciones del extracto alcohólico y acuoso de *Dacryodes peruviana* en el hongo *Fusarium sp.* y en la bacteria *Ralstonia solanacearum*, esto se evaluó transcurrido las 120 horas para la bacteria y el hongo respectivamente después de la incubación.

Después se procedió a realizar pruebas de Shapiro Wilks para comprobar que los datos cumplieran con el supuesto de la normalidad.

2.5.1 Tratamientos de los estudios

Tabla 3-2: Códigos y descripciones de los tratamientos de estudio para es extracto alcohólico

| Código | Descripción |
|--------|--|
| T 50% | Tratamiento 1 extracto alcohólico concentración 50 % para Fusarium |
| T 35 % | Tratamiento 2 extracto alcohólico concentración 35 % para Fusarium |
| T 25 % | Tratamiento 3 extracto alcohólico concentración 25 % para Fusarium |
| T 50% | Tratamiento 7 extracto alcohólico concentración 100 % para Ralstonia |
| T 35 % | Tratamiento 8 extracto alcohólico concentración 50 % para Ralstonia |
| T 25 % | Tratamiento 9 extracto alcohólico concentración 25 % para Ralstonia |

Realizado por: Molina A. 2021

Tabla 4-2: Códigos y descripciones de los tratamientos de estudio para es extracto acuoso

| Código | Descripción |
|--------|--|
| T 50% | Tratamiento 1 extracto acuoso concentración 50 % para Fusarium |
| T 35 % | Tratamiento 2 extracto acuoso concentración 35 % para Fusarium |
| T 25 % | Tratamiento 3 extracto acuoso concentración 25 % para Fusarium |
| T 50% | Tratamiento 7 extracto acuoso concentración 100 % para Ralstonia |
| T 35 % | Tratamiento 8 extracto acuoso concentración 50 % para Ralstonia |
| T 25 % | Tratamiento 9 extracto acuoso concentración 25 % para Ralstonia |

Realizado por: Molina A. 2021

2.6 Metodología y técnicas

2.6.1 Fase de campo

- Una vez obtenido el material vegetal (hojas y resina) en la zona ya mencionada, que forma parte de la materia prima; se examinó y se separó manualmente materiales extraños que puedan existir y partes deterioradas, enfermas o contaminadas.
- Ya con el material listo y clasificado se lo guardó en fundas plásticas con su respectiva etiqueta para posteriormente transportarlas al lugar donde se va a realizar la investigación previamente desinfectadas para su respectivo secado.



Figura 4-2. Separación del material contaminado y enfundado del material vegetal útil para los extractos

Realizado por: (Molina A. 2021)

2.6.2 Fase de laboratorio

- Activación de los patógenos para la investigación; *Fusarium sp.* (hongo) y *Ralstonia solanacearum* (Bacteria).
- Reproducción de los patógenos para la investigación; *Fusarium sp.* (hongo) y *Ralstonia solanacearum* (Bacteria).
- Evaluaciones correspondientes que ayuden a determinar el potencial anti-fúngico de cada una de las concentraciones de los extractos tanto alcohólico como acuoso de la resina y hojas de *Dacryodes peruviana*.
- Evaluaciones correspondientes que ayuden a determinar el potencial anti-bacteriano de cada una de las concentraciones de los diferentes extractos tanto alcohólico como acuoso de la resina y hojas de *Dacryodes peruviana*.
- Tamizaje de los macerados acuoso y alcohólico.

2.7 Procedimiento

2.7.1 Preparación de los extractos

Según Tituaña (2013) se denomina extracción sólida – líquido al procedimiento consistente en poner en contacto un sólido triturado (material vegetal) con un líquido (disolvente de extracción) en el que son solubles algunas de las sustancias que incorpora el sólido en su composición. Del proceso se obtiene un sólido agotado y una disolución o extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas en él. El material se agita esporádicamente por un período de 2-4 días en recipiente cerrado. Finalizado el proceso se decanta el líquido filtrando y exprimiendo el residuo.

Preparación del extracto de hojas alcohólico y acuoso respectivamente

- Una vez con el material ya seco y libre de impurezas.
- Se lo llevo al laboratorio en el cual se molió la resina y hojas .
- Pesamos 200 gramos de hojas de copal molido en la balanza (METTLER pm 300).
- Lo pesado se embazo en dos botellas de 500 mL de vidrio de color ámbar y se añadió 400 mL de solvente, para él un caso solvente agua destilada (H₂O) y para el otro caso solvente alcohol metílico al 96% (OH).
- Se lo dejo reposar durante 5 días, cada día se lo agita por un periodo de cinco minutos respectivamente y se deja reposar nuevamente. Este proceso se lo repite de unas siete a ocho veces por día.
- Luego de los cinco días de maceración se procede a filtrar cada uno de los extractos por medio del equipo de filtración con bomba al vacío.

Tabla 5-2: Preparación extracto puro

| Acuoso (H ₂ O) | Alcohólico (OH) |
|----------------------------|----------------------------|
| Maceración | Maceración |
| 200 g hoja molida de Copal | 200 g hoja molida de Copal |
| 800 ml Agua Destilada | 800 ml OH metílico |

Realizado por: Molina A. 2021



Figura 5-2. Hojas molidas

Realizado por: Molina A. 2021



Figura 6-2. Embazado de las hojas molidas

Realizado por: Molina A. 2021



Figura 7-2. Concentraciones del extracto alcohólico y acuoso respectivamente

Realizado por: Molina A. 2021



Figura 8-2. Filtrado de los extractos de hojas

Realizado por: Molina A. 2021

Preparación del extracto de resina alcohólico y acuoso respectivamente

- Una vez con el material ya seco y libre de impurezas.
- Después procedió a triturar en un mortero de porcelana la resina de forma manual.
- Pesamos 200 gramos de resina de copal triturado en la balanza (METTLER pm 300).
- Lo pesado se embazo en dos botellas de 500 mL de vidrio de color ámbar y se añadió 400 mL de solvente, para él un caso solvente agua destilada (H₂O) y para el otro caso solvente alcohol metílico al 96% (OH).

- Se lo dejó reposar durante 5 días, cada día se lo agita por un periodo de cinco minutos respectivamente y se deja reposar nuevamente. Este proceso se lo repite de unas siete a ocho veces por día.
- Luego de los cinco días de maceración se procede a filtrar cada uno de los extractos por medio del equipo de filtración con bomba al vacío.

Tabla 6-2: Preparación extracto puro

| Acuoso (H ₂ O) | Alcohólico (OH) |
|------------------------------|------------------------------|
| Maceración | Maceración |
| 200 g resina molida de Copal | 200 g resina molida de Copal |
| 800 ml Agua Destilada | 800 ml OH metílico |

Realizado por: Molina A. 2021



Figura 9-2 Resina triturada

Realizado por: Molina A. 2021



Figura 10-2 Embazado de la resina triturada

Realizado por: Molina A. 2021



Figura 11-2 Concentraciones del extracto alcohólico y acuoso respectivamente

Realizado por: Molina A. 2021



Figura 12-2 Filtrado de los extractos de resina

Realizado por: Molina A. 2021

Elaboración de los extractos alcohólico de la resina y hojas de *Dacryodes peruviana* (copal) a distintas concentraciones.

Para poder preparar las distintas concentraciones de los extractos de resina y hojas de copal se utilizó 6 frascos de vidrio con tapa de rosca de 100 mL previamente esterilizados, todas las medidas se realizaron con una probeta de 50 ml. Ya que el volumen a preparar del extracto es de 50mL.

A continuación, se describe las distintas concentraciones del extracto de las hojas y resina se realizó la disolución con alcohol debido a que el extracto alcohólico de la resina en contacto con el agua este se solidifico debido a esto se optó para disolverlo con alcohol.

Tabla 7-2: Extracto de las hojas y resinas de *Dacryodes peruviana*

| Porcentaje de concentración | Extracto de las hojas (mL) | alcohol (mL) |
|-----------------------------|----------------------------|--------------|
| 50% | 25 | 25 |
| 35% | 17,5 | 32,5 |
| 25% | 12,5 | 37,5 |

Realizado por: Molina A. 2021

Porcentaje de Concentración al 50%

Para la concentración al 50% se colocó 25 mL del extracto y 25 mL de alcohol en el frasco de vidrio con tapa de 100 mL y se agito bien para que estos se mezclen bien, el cálculo se pudo determinar realizando una regla de tres.

$$\begin{array}{ccc} 50 \text{ ml} & & 100\% \\ & \swarrow \quad \searrow & \\ x & & 50\% \end{array}$$

X= 25 ml del extracto

$$\begin{array}{ccc} 50 \text{ ml} & & 100\% \\ & \swarrow \quad \searrow & \\ x & & 50\% \end{array}$$

X= 25 ml de alcohol

Porcentaje de Concentración al 35%

Para la concentración al 35% se colocó 17.5 mL del extracto y 32.5 mL de alcohol en el frasco de vidrio con tapa de 100 mL y se agito bien para que estos se mezclen bien, el cálculo se pudo determinar realizando una regla de tres.

Regla de tres

$$\begin{array}{ccc} 50 \text{ ml} & & 100\% \\ & \swarrow \quad \searrow & \\ x & & 35\% \end{array}$$

X= 17,5 ml del extracto

$$\begin{array}{ccc} 50 \text{ ml} & & 100\% \\ & \swarrow \quad \searrow & \\ x & & 65\% \end{array}$$

X= 32,5 ml de alcohol

Extracto al 25% de *Dacryodes peruviana*

Para la segunda concentración que es la del 25% para un volumen total del 50 mL se agregó 12,5 ml del extracto y 37,5 mL de alcohol en un frasco de vidrio el cual se agito bien durante unos treinta segundos para que la mezcla se homogenice bien estos cálculos lo hicimos atreves de una regla de tres

$$\begin{array}{ccc} 50 \text{ ml} & & 100\% \\ & \swarrow \quad \searrow & \\ x & & 25\% \end{array}$$

X= 12,5 ml del extracto

$$\begin{array}{ccc} 50 \text{ ml} & & 100\% \\ & \swarrow \quad \searrow & \\ x & & 75\% \end{array}$$

X= 37,5 ml de alcohol

Elaboración de los extractos acuosos de la resina y hojas de *Dacryodes peruviana* (copal) a distintas concentraciones

Para la elaboración de los extractos acuosos se realizó el mismo procedimiento antes detallado con la diferencia que el disolvente utilizado fue agua destilada.

2.7.2 Tamizaje fitoquímico alcohólico

Para los extractos alcohólicos de hojas y resina se realizó una caracterización mediante un tamizaje fotoquímico

1. Preparación de los extractos con los reactivos

- Se utilizó 28 tubos de ensayo, 14 para cada extracto.
- Se utilizó una gradilla de metal como soporte de los tubos de ensayo.

- Una vez obtenido los extractos se tomó una muestra en un vaso de 250 mL aproximadamente 15 mL del extracto alcohólico de resina y 15 mL del extracto alcohólico de hojas.
- Colocamos 1 mL de extracto alcohólico de la resina en cada tubo de ensayo y 1 mL de extracto alcohólico de las hojas.
- Se colocó los tubos de ensayo en vasos de precipitación de 600 mL para calentarlos a baño maría (los tubos que necesitaban este procedimiento).
- Se procedió añadir los diferentes reactivos en cada tubo que contenía los extractos y se los agitó.
- Se observó e identificó las características que los extractos presentaban.

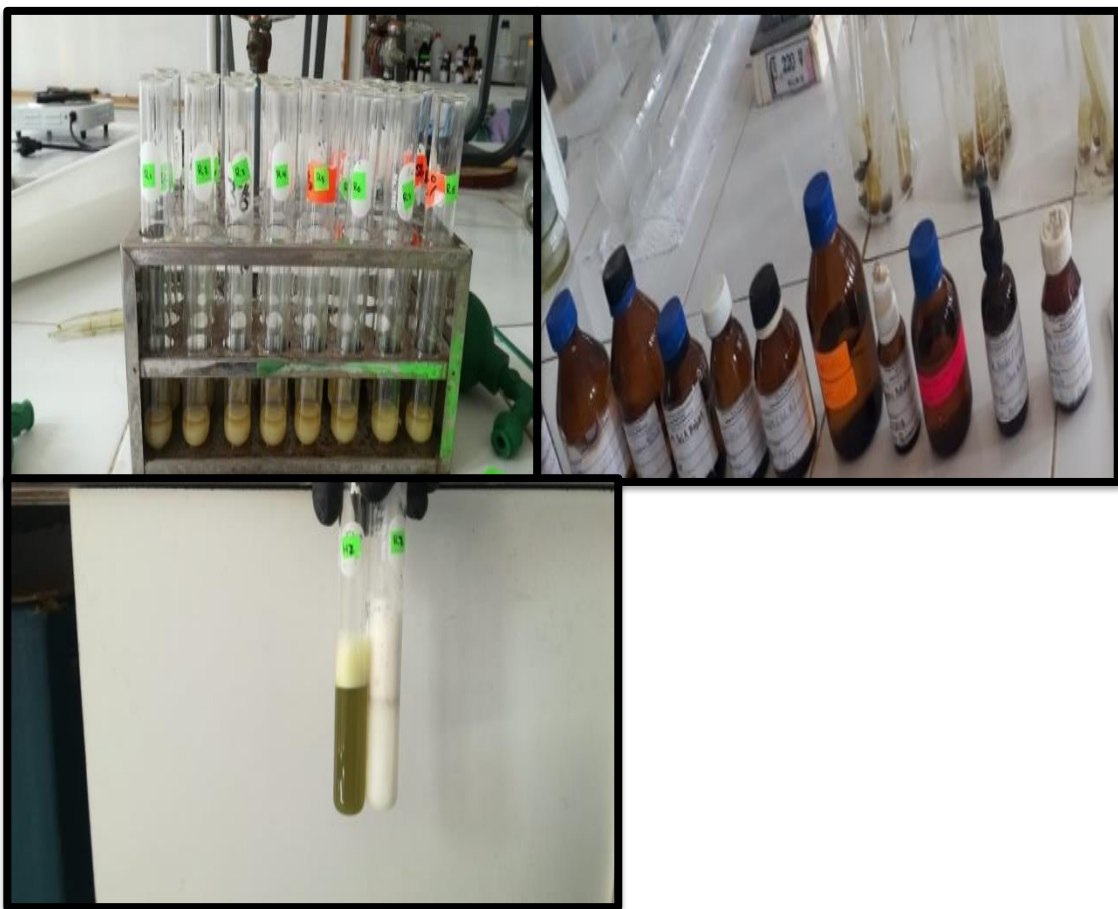


Figura 13-2. Tamizaje fitoquímico y materiales usados

Realizado por: Molina A. 2021

Tabla 8-2: Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico

| | Ensayo | Metabolito secundario |
|---------------------|------------------------------|------------------------|
| Extracto alcohólico | Ensayo de Catequias | Catequinas |
| | Ensayo de Resinas | Resinas |
| | Ensayo de Fehling | Az. Reductores |
| | Ensayo de baljet | Lactonas |
| | Ensayo de Libermann | Triterpenos-Esteroides |
| | Ensayo de Cl ₃ Fe | Fenoles y Taninos |
| | Ensayo de Espuma | Saponinas |
| | Ensayo de Ninhidrina | Aminoácidos |
| | Ensayo de Bontrager | Quinonas |
| | Ensayo de Shinoda | Flavonoides |
| | Ensayo de Antocianidina | Antocianos |
| | Ensayo de Dragendorff | Alcaloides |
| | Ensayo de Mayer | Alcaloides |
| | Ensayo de Wagner | Alcaloides |

Fuente: (Facultad de Ciencias , 2020)

Elaborado por: Molina A. 2021

2. Descripción del tamizaje Fitoquímico

- Prueba de catequinas

Se tomó una muestra de la solución obtenida una gota y esta se la coloco en un papel filtro, sobre la mancha se aplicó la solución de carbonato de sodio. Si en este proceso aparece una mancha verde carmelita en la luz UV, podemos concluir que el ensayo es positivo (Miranda, 2006).

- Prueba de resinas

Se tomó una muestra de 2 ml de la solución alcohólica de hojas y resina y se adiciono 10 ml de agua destilada. Si esta presenta un precipitado nos indica que el ensayo es positivo (Miranda, 2006).

- Prueba de Fehling

El presente ensayo nos permite reconocer la presencia de azúcares reductores en el extracto.

Devemos tener en cuenta si la alícuota de los extractos no contiene agua este debe evaporarse a baño maría y el sobrante debe redisolverse en 1 o 2 milímetros de agua. Después se procede a colocar 2 milímetros del reactivo y se calienta en baño maría de 5 – 10 minutos la mezcla consideramos un ensayo positivo si la solución presenta tonalidades rojas o precipitados rojo (Miranda, 2006).

- Prueba de Baljet

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico.

En particular Coumarinas, aunque otros compuestos pueden dar positivo en el ensayo. “si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y re disolver en la menor cantidad de alcohol (1ml). En estas condiciones se adiciona 1ml del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente (Miranda, 2006).

- Prueba de Liebermann-Burchard

El presente ensayo nos permite reconocer la presencia de de triterpenos o esteroides.

Tenemos que tener en cuenta principalmente si la alícuota de la solución se encuentre cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño maría y la sobra redisolverse en un mililitro de cloroformo después se añade 1 mililitro de anhídrido acético y se homogeniza bien con mucho cuidado por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar de 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado si mover o agitar. La lectura es positivo si posee rápidamente un cambio de coloración.

Color rosado-azul muy rápido

Color verde intenso- visible

Color verde oscuro- negro final de la reacción (Miranda, 2006).

- Prueba de Cloruro Férrico

Con este ensayo podemos reconocer en un extracto vegetal la presencia de compuestos fenólicos o taninos.

Con el extracto de la planta en alcohol podemos determinar tanto fenoles como taninos. Colocamos una alícuota de 2 milímetros en el tubo de ensayo a este se le adiciona tres gotas de la solución de tricloruro férrico al 5% en una solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 9,9% en agua) en cambio si el extracto es acuoso el ensayo determinara la presencia de taninos. Colocamos una alícuota del extracto se añade una pizca de acetato para poder neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en la solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede presentar la siguiente información:

Presentar una coloración rojo-vino, esto nos indica la presencia de fenoles en general

Presentar una coloración verde intenso, esto nos indica la presencia de taninos del tipo pirocatecólicos

Presentar una coloración azul, esto nos indica la presencia de taninos de tipo pirogalotánicos (Miranda, 2006)

- Prueba de la presencia de espuma

Con este ensayo podemos presenciar la presencia de saponinas en el extracto alcohólico de tipo esteroideal como triterpénoica.

Como la alícuota se encuentra en alcohol, esta se diluye con cinco veces su volumen en agua destilada y homogenizamos muy bien la mezcla en un tiempo de cinco a diez minutos. Consideramos que el ensayo es positivo si este presenta espuma en la superficie del líquido de más de dos mm de espesor y dura por más de dos minutos (Miranda, 2006).

- Prueba de la Ninhidrina

Con este ensayo podemos presenciar en el extracto la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general.

Con la alícuota del extracto en alcohol o el residuo de la concentración en baño de agua maría si el extracto se encuentra en otro solvente se lo mezcla con dos mililitros de solución al 2% de ninhidrina en agua destilada, después se procede a calentar la mezcla en baño de agua maría en un tiempo de 5-10 minutos el ensayo es considerado positivo cuando presenciamos una coloración azul violáceo (Miranda, 2006).

- Prueba de Borntrager

Con este ensayo podemos presenciar en el extracto la presencia de compuestos como son la presencia de quinonas.

Debemos tener en cuenta si la alícuota se encuentra en cloroformo esta debe evaporarse el solvente en baño de agua maría y el sobrante redissolver en un mililitro cloroformo a este se le adiciona un mililitro de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua destilada se homogenizan las mezclas o fases y se deja en reposo hasta su posterior separación. Si la fase nos presenta la acuosa alcalina (superior) se colorea de color rosado o rojo tenemos un ensayo positivo y si nos presenta una coloración rosada (++) , coloración roja (+++) (Miranda, 2006).

- Prueba de Antocianidinas

El siguiente ensayo nos permite reconocer en los extractos si tenemos presencia de estructuras de secuencia C6-C3-C6 pertenecientes al grupo de los flavonoides. Para esta prueba se calienta 2 milímetros del extracto etanólico por 10 minutos con un mililitro de ácido clorhídrico concentrado.

Dejamos enfriar y se le coloca 1 mililitro de agua destilada y dos mililitros de alcohol amílico se homogeniza la mezcla bien y se deja separar las dos fases cuando presenciamos la aparición de color rojo a marrón en la fase amílica esto nos quiere decir que presenciamos un ensayo positivo (Miranda, 2006).

- Prueba de Dragendorff

El siguiente ensayo nos permite reconocer en un extracto la presencia o ausencia de alcaloides para ello verificamos si la alícuota del extracto se encuentra disuelta en un solvente orgánico, si es así vemos evaporarlo en un baño de agua maría el sobrante lo redisolvemos en 1 mililitro de ácido clorhídrico al 1 % en agua destilada en cambio si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado, después se calienta suavemente y se deja enfriar hasta que presente acidez. Con la solución acuosa ácida se realiza la prueba colocando tres gotas del reactivo de dragendorff, en cambio si está presente opalescencia se considera (+), con turbidez definida (++) , precipitado (+++) (Miranda, 2006).

- Prueba de Mayer

Este se procedió de la misma forma antes descrita, hasta obtener la solución ácida añadiendo una pizca de cloruro de sodio en polvo, después agitamos y filtramos se añadio de 2 a 3 gotas del reactivo de mayer si se observa opalescencia se considera (+), con turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++) (Miranda, 2006).

- Prueba de Wagner

Para este partimos de igual manera que los casos anteriores desde la solución ácida colocamos de 2 a 3 gotas del reactivo clasificando los resultados de la misma manera que los casos anteriores (Miranda, 2006).

- Prueba de Shinoda

Este ensayo nos permitió reconocer la presencia de flavonoides del extracto.

Verificamos si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol este se diluye en 1 mililitro de ácido clorhídrico concentrado y con un trocito de cinta de magnesio metálico. Una vez obtenida la reacción se espera uno cinco minutos, se coloca 1 mililitro de alcohol amílico, se homogeniza las fases y se deja reposar hasta que se separen. Si la muestra de la alícuota se encuentra en agua se procede de la misma manera, continuando de la misma manera adicionando el ácido clorhídrico concentrado, consideramos al ensayo positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita, o rojo intenso en todos los casos (Miranda, 2006).

2.7.3 Tamizaje fitoquímico acuoso

Para los extractos acuosos de hojas y resina se realizó una caracterización mediante un tamizaje fotoquímico

3. Preparación de los extractos con los reactivos

- Se utilizó 18 tubos de ensayo, 9 para cada extracto.
- Se utilizó una gradilla de metal como soporte de los tubos de ensayo.
- Una vez obtenido los extractos se tomó una muestra en un vaso de 250 mL aproximadamente 15 mL del extracto acuoso de la resina y 15 mL del extracto acuoso de las hojas.
- Colocamos 1 mL de extracto acuoso de la resina en cada tubo de ensayo y 1 mL de extracto acuoso de las hojas.
- Se colocó los tubos de ensayo en vasos de precipitación de 600 mL para calentarlos a baño maría (los tubos que necesitaban este procedimiento).
- Se procedió añadir los diferentes reactivos en cada tubo que contenía los extractos y se los agitó.
- Se observó e identificó las características que los extractos presentaban.

Tabla 9-2: Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso

| | Ensayo | Metabolito secundario |
|-----------------|------------------------------|-----------------------|
| Extracto acuoso | Ensayo de Fehling | Az. Reductores |
| | Ensayo de Cl ₃ Fe | Fenoles y Taninos |
| | Ensayo de Espuma | Saponinas |
| | Ensayo de Shinoda | Flavonoides |
| | Ensayo de Dragendorff | Alcaloides |
| | Ensayo de Mayer | Alcaloides |
| | Ensayo de Wagner | Alcaloides |
| | Ensayo Mucílagos | Mucílagos |
| | Ensayo de Principios amargos | Principios amargos |

Fuente: (Facultad de Ciencias , 2020)

Elaborado por: Molina A. 2021

- Prueba de Fehling

El presente ensayo nos permite reconocer la presencia de azúcares reductores en el extracto.

Devemos tener en cuenta si la alícuota de los extractos no contiene agua este debe evaporarse a baño maria y el sobrante debe redisolverse en 1 0 2 milímetros de agua. Después se procede a colocar 2 milímetros del reactivo y se calienta en baño maria de 5 – 10 minutos la mezcla consideramos un ensayo positivo si la solución presenta tonalidades rojas o precipitados rojo (Miranda, 2006).

- Prueba de cloruro Férrico

Con este ensayo podemos reconocer en un extracto vegetal la presencia de compuestos fenólicos o taninos.

Con el extracto de la planta en alcohol podemos determinar tanto fenoles como taninos. Colocamos una alícuota de 2 milímetros en el tubo de ensayo a este se le adiciona tres gotas de la solución de tricloruro férrico al 5% en una solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 9,9% en agua) en cambio si el extracto es acuoso el ensayo determinara la presencia de taninos. Colocamos una alícuota del extracto se añade una pizca de acetato para poder neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en la solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede presentar la siguiente información:

Presentar una coloración rojo-vino, esto nos indica la presencia de fenoles en general

Presentar una coloración verde intenso, esto nos indica la presencia de taninos del tipo pirocatecólicos

Presentar una coloración azul, esto nos indica la presencia de taninos de tipo pirogalotánicos (Miranda, M. 2006).

- Prueba de la presencia de espuma

Con este ensayo podemos presenciar la presencia de saponinas en el extracto alcohólico de tipo esteroideal como triterpénoica.

Como la alícuota se encuentra en alcohol, esta se diluye con cinco veces su volumen en agua destilada y homogenizamos muy bien la mezcla en un tiempo de cinco a diez minutos. Consideramos que el ensayo es positivo si este presenta espuma en la superficie del líquido de más de dos mm de espesor y dura por más de dos minutos (Miranda, 2006).

- Prueba de Shinoda

Este ensayo nos permitió reconocer la presencia de flavonoides del extracto.

Verificamos si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol este se diluye en 1 mililitro de ácido clorhídrico concentrado y con un trozito de cinta de magnesio metálico. Una vez obtenida la reacción se espera uno cinco minutos, se coloca 1 mililitro de alcohol amílico, se homogeniza las fases y se deja reposar hasta que se separen. Si la muestra de la alícuota se encuentra en agua se procede de la misma manera, continuando de la misma manera adicionando el ácido clorhídrico

concentrado, consideramos al ensayo positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita, o rojo intenso en todos los casos (Miranda, 2006).

El siguiente ensayo nos permite reconocer en un extracto la presencia o ausencia de alcaloides para ello verificamos si la alícuota del extracto se encuentra disuelta en un solvente orgánico, si es así vemos evaporarlo en un baño de agua maría el sobrante lo redisolvemos en 1 mililitro de ácido clorhídrico al 1 % en agua destilada en cambio si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado, después se calienta suavemente y deja enfriar hasta que presente acidez. Con la solución acuosa ácida se realiza la prueba colocando tres gotas del reactivo de dragendorff, en cambio si está presenta opalescencia se considera (+), con turbidez definida (++) , precipitado (+++) (Miranda, 2006).

- Prueba de Mayer

Procedió de la misma forma que en el ensayo de Dragendorff hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++). Observación: en el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, estos solo se encontraran en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) o (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias (Miranda, 2006).

- Prueba de Wagner

Procedió de la misma forma que en el ensayo de Dragendorff hasta obtener la solución ácida. Añadiendo 2 o 3 gotas de solución reactiva de Wagner, clasificar los resultados de la misma forma que en los ensayos de Dragendorff y Mayer (Miranda, 2006).

- Prueba de Mucílagos

El siguiente ensayo nos permite reconocer de los extractos la presencia de una estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo que contiene un alto índice de masa que ayuda a aumentar la densidad del agua de donde se extrae, entonces colocamos una alícuota del extracto acuoso se refrigera a 0.5 °C y si el extracto toma una consistencia gelatinosa la prueba es considerada positiva (Miranda, 2006).

- Ensayo de principios amargos

Este ensayo es súper sencillo ya que consiste en saborear una o dos gotas del extracto acuoso o del vegetal distinguiendo el sabor de cada uno de estos principios esto más se basa en el sentido del gusto

2.8 Activación de *Fusarium sp.*

Para la activación del hongo *Fusarium sp.* se sacó de la congeladora (INDURAMA ri 395) del laboratorio un tubo criovial donde se hallaba almacenado el hongo *Fusarium sp.*. El tubo criovial se dejó a temperatura ambiente del laboratorio 22°C por 30 min. para después sembrar en el medio de Agar Papa Dextrosa (PDA).



Figura 14-2. Tubo criovial (*Fusarium sp.*)

Realizado por: Molina A. 2021

2.8.1 Preparación del medio Agar Papa Dextrosa (PDA)

En la preparación del medio se utilizó 125 mL de agua destilada se añadió 4.88 g de PDA, procedimos a pesar en la balanza analítica (METLER) el agar papa dextrosa PDA y colocamos en el frasco de vidrio autoclave de 250 mL en el cual se encontraba ya los 100 mL de agua destilada, se agito con movimientos circulares hasta que se disuelva el PDA por último se colocó en el autoclave (HIRAYAMA 3030 e) el frasco de vidrio de 250 mL por 20 minutos a 121 °C y a 1.1 atm para que se esterilice el medio y así se elimine cualquier microorganismo que pueda contaminar el medio.



Figura 15-2. Medio de cultivo PDA

Realizado por: Molina A. 2021

2.8.2 Siembra del hongo puro en el medio Agar Papa Dextrosa (PDA)

Con el medio de cultivo listo se procedió a llevar a la cámara de flujo (LABCONCO MISSOURI64132) y esperamos que el medio se comience a enfriar por unos 30 min, una vez con el medio tibio se procedió a verter en tres cajas Petri de vidrio que se encontraban esterilizadas bajo radiaciones UV por 15 min. Después de verter el medio en las cajas Petri se esperó por aproximada 30 min para que el medio se solidifique y se pueda sembrar el hongo. Para proceder con la siembra por estría en placa del hongo se tomó el tubo criovial que contiene el hongo puro que ya estaba previamente descongelado a 22°C temperatura ambiente del laboratorio, con la ayuda de la asa de siembra se dispersó en el medio solidificado con cuidado para que no se rompa el medio. Para cada proceso la asa se la desinfectaba con ayuda del mechero de Bunsen. Por último, se incubó (REVCO) el hongo a una temperatura de 30°C, a las 96 horas presentaron abundante micelio de color blanquecino y una coloración lila, característico de *Fusarium sp.*

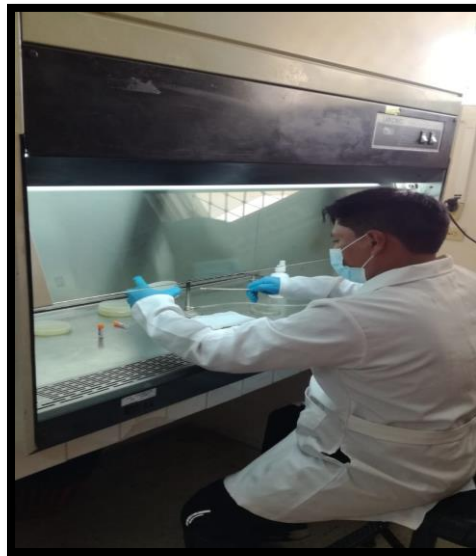


Figura 16-2. Siembra del hongo puro en el medio PDA

Realizado por: Molina A. 2021

2.9 Activación de *Ralstonia solanacearum*.

Para la activación de la bacteria *Ralstonia solanacearum* se sacó de la congeladora (INDURAMA ri 395) del laboratorio un tubo criovial donde se hallaba almacenado la bacteria *Ralstonia solanacearum*. El tubo criovial se dejó a temperatura ambiente del laboratorio 22°C por 30 min. para después sembrar en el medio de Agar nutritivo (AN).

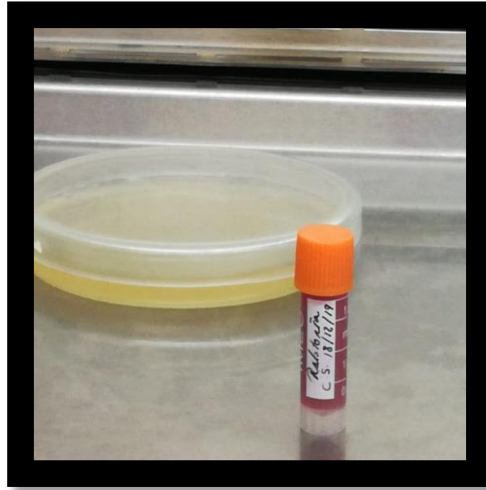


Figura 17-2 Tubo criovial de *Ralstonia solanacearum*

Realizado por: Molina A. 2021

2.9.1 *Preparación del medio de Agar Nutritivo (AN)*

En la preparación del medio se utilizó 125 mL de agua destilada se añadió 2.88 g de Agar Nutritivo (AN), procedimos a pesar en la balanza analítica (METTLER pm 3000 el AN y colocamos en el frasco de vidrio autoclave de 250 mL en el cual se encontraba ya los 100 mL de agua destilada, se agito con movimientos circulares hasta que se disuelva el AN por último se colocó en el autoclave (HIRAYAMA 3030 e) el frasco de vidrio de 250 mL por 20 minutos a 121°C y a 1.1 atm para que se esterilice el medio y así se elimine cualquier microorganismo que pueda contaminar el medio.

2.9.2 *Siembra de la bacteria pura en el medio de Agar Nutritivo (AN)*

Con el medio de cultivo listo lo llevamos a la cámara de flujo y esperamos que el medio se comience a enfriar por unos 30 min, una vez con el medio tibio se procedió a verter en tres cajas Petri de vidrio que se encontraban esterilizadas bajo radiaciones UV por 15 min. Después de verter el medio en las cajas Petri se esperó por aproximada 30 min para que el medio se solidifique y se pueda sembrar la bacteria. Para proceder con la siembra por estría en placa de la bacteria se tomó el tubo criovial que contiene la bacteria puro que ya estaba previamente descongelado a 22°C por 30 min temperatura ambiente del laboratorio, con la ayuda de la asa de siembra se dispersó la bacteria en zigzag en el medio solidificado con cuidado que no se rompa el medio, para cada proceso la asa se la desinfectaba con ayuda del mechero de Bunsen. Por último, se incubó la bacteria a una temperatura de 30°C, a las 96 horas la bacteria estaba colonizada la caja Petri ver (Figura 15.2).

2.10 Determinación del potencial anti-fúngico

Para el cumplimiento del primer objetivo y determinar si algunas de las concentraciones del extracto acuoso sirven para controlar el desarrollo de los patógenos se realizó el método de vertido en placa que se describe a continuación:

Propagación del hongo

- Para continuar con la propagación se tomó dos tubos de vidrio con tapa de rosca de plástico, y se colocó 10 mL de agua destilada en cada tubo.
- Una vez infestado el hongo en la caja Petri se recogió 1 g de este. Trabajamos con la proporción 1 g del hongo en 10 ml de agua destilada y se agito para que la solución se mezcle por completo.
- Para cada concentración se preparó el medio del cultivo el que consistía de 120 mL de agua destilada y 4.68 g de agar papa dextrosa (PDA) esperamos a que se enfrié el medio y colocamos 1 mL de la solución del hongo en el medio del cultivo, la mezcla la agitamos en forma circular hasta que se homogenice por completo.
- La mezcla infectada con el hongo la vertimos en 5 cajas Petri y esperamos media hora hasta que esta se solidifique.
- Con el medio ya solidificado se procedió a inocular con cuatro gotas de 25 μ L del extracto en cada caja Petri se esperó 20 minutos aproximadamente hasta que cada gota se concentre en el medio de cultivo infestado.
- Después se colocó en la incubadora
- El ritmo de crecimiento se midió a las 120 horas se tomó los valores de los halos de inhibición
- Cada prueba, estuvo constituida por cinco repeticiones.

De igual manera para cumplir con el segundo objetivo, se repitió cada paso al pie de la letra, pero con el extracto alcohólico

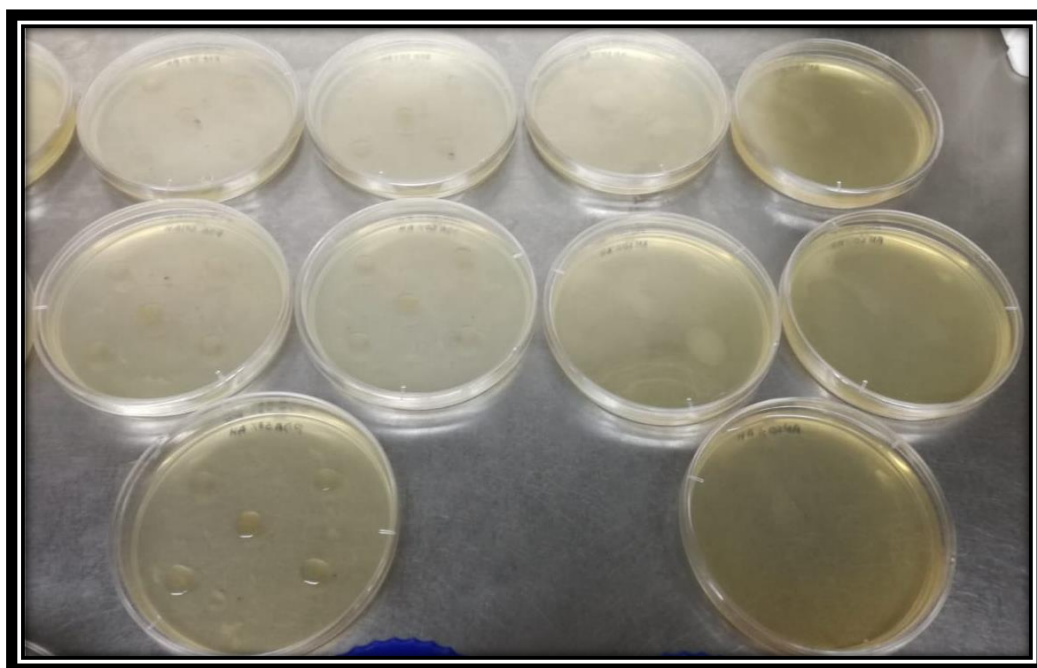


Figura 18-2. Evaluación de la actividad anti-fúngica de los extractos acuoso para *Fusarium sp.* (Hongo).

Realizado por: Molina A. 2021

2.10.1. Determinación del potencial anti-bacterial

Para el cumplimiento del tercer objetivo y determinar si algunas de las concentraciones del extracto acuoso sirven para controlar el desarrollo de las bacterias se realizó el método de vertido en placa que se describe a continuación:

Propagación y control de la bacteria

- Para continuar con la propagación se tomó dos tubos de vidrio con tapa de rosca de plástico, y se colocó 10 mL de agua destilada en cada tubo.
- Una vez infestado la bacteria en la caja Petri se recogió 1 g de este. Trabajamos con la proporción 1 g de la bacteria en 10 ml de agua destilada y se agito para que la solución se mezcle por completo.
- Para cada concentración se preparó el medio del cultivo el que consistía de 120 mL de agua destilada y 2.76 g de AN esperamos a que se enfrié el medio y colocamos 1 mL de la solución de la bacteria en los 120 mL del medio, la mezcla la agitamos en forma circular hasta que se homogenice por completo.
- La mezcla infectada con la bacteria la vertimos en 5 cajas Petri y esperamos media hora hasta que esta se solidifique.
- Con el medio ya solidificado se procedió a inocular con cuatro gotas de 25 μ L del extracto en cada caja Petri se esperó 20 minutos aproximadamente hasta que cada gota se concentre en el medio de cultivo infestado.

- Después se colocó en la incubadora
- El ritmo de crecimiento se midió a las 120 horas se tomó los valores de los halos de inhibición
- Cada prueba, estuvo constituida por cinco repeticiones.

De igual manera para cumplir con el cuarto objetivo, se repitió cada paso al pie de la letra, pero con el extracto alcohólico

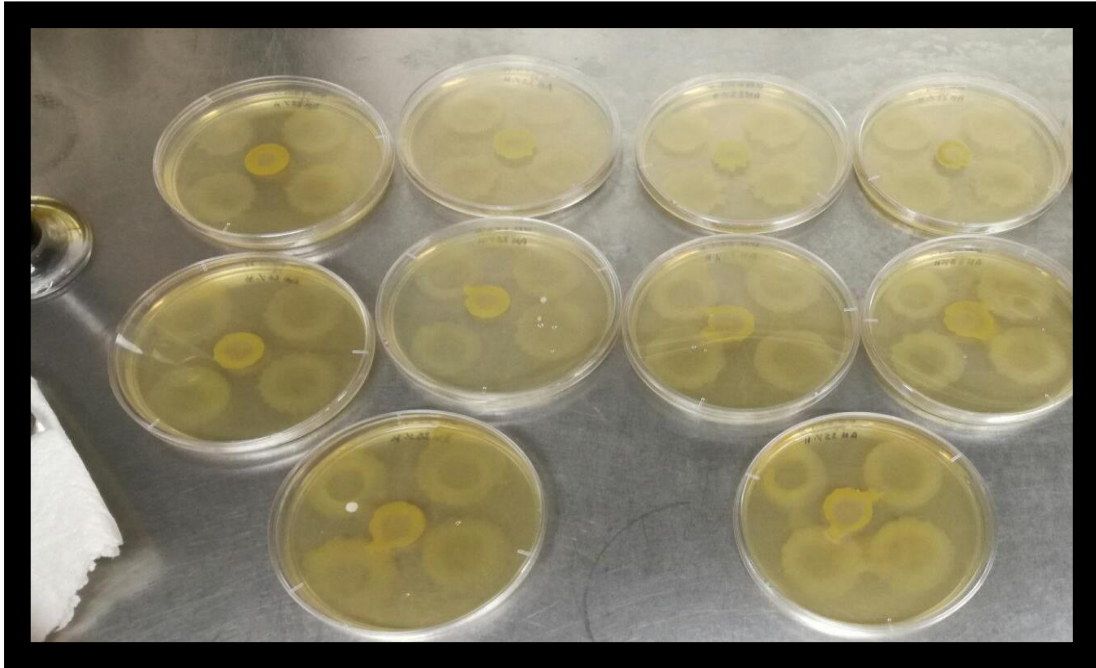


Figura 19-2. Evaluación de la actividad anti-bacteriana del extracto alcohólico para *Ralstonia solanacearum* (Bacteria).

Realizado por: Molina A. 2021

2.11 Unidad formadora de colonia (UFC) hongos

Para conocer la cantidad de unidades formadoras de colonias de los hongos se lo realizó de la siguiente manera:

- Se tomó uno de los dos tubos que contiene el inóculo de los hongos, con un cuenta gotas se tomó una muestra se colocó una gota en el improved neubauer chamber (SPENCER 867124) se colocó el cubre objeto
- Después se llevó la placa al microscopio en la cual observamos con el lente de 100x.
- Se comenzó a contabilizar cada una de las células de los 4 extremos y cada extremo posee 16 recuadros.
- Con esto se pudo conocer el número exacto de las unidades formadora de colonias de hongos
- 1 mL de solución de inóculo de los hongos posee $9,0745 \times 10^3$ unidades formadoras de colonias.

- El mismo procedimiento se realizó para la unidad formadora de colonia (UFC) bacteria.
- En 1 mL de solución del inóculo de la bacteria Posee lo siguiente $8,522916 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colonias
- Los dos estudios poseen cantidades altas de microorganismos esto quiere decir que los extractos que tengan resultados a estas pruebas tienen alto poder de inhibición



Figura 20-2. Colocamos una gota del inóculo

Realizado por: Molina A. 2021

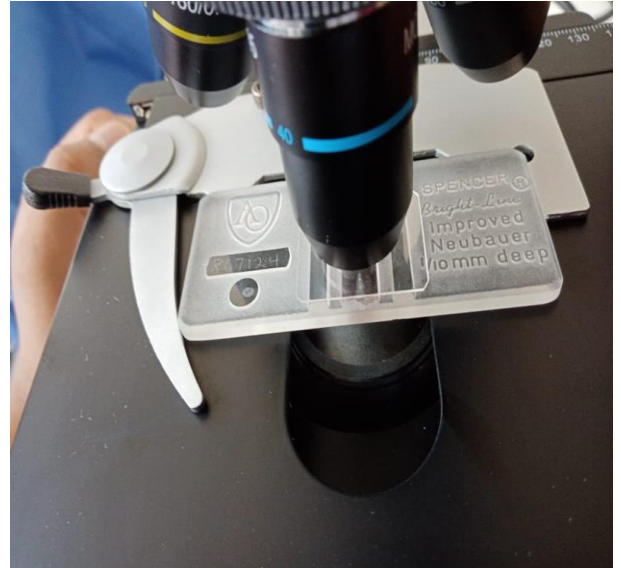


Figura 21-2 Placa lista para poder observar

Realizado por: Molina A. 2021



Figura 22-2. Conteo de las células

Realizado por: Molina A.2020

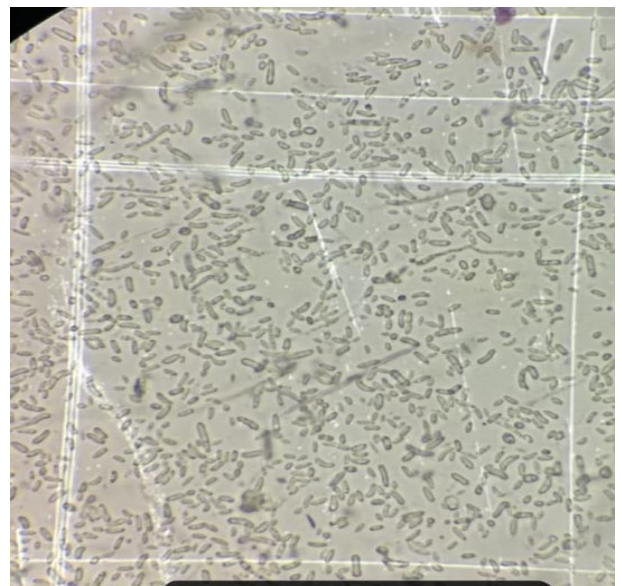


Figura 23-2 fotografía de las Unidades formadoras de colonias (UFC)

Realizado por: Molina A. 2021

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1 Evaluación del proceso de inhibición de *Fusarium sp.* con el extracto acuoso de la resina de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

3.1.1 Evaluación según los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 50%

En la (Figura 1-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto acuoso de resina al 50% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto acuoso de resina, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de color crema y de forma circular, se puede observar que en todas las repeticiones hubo efecto anti-fungico. También se pudo observar una coloración lila que es una característica morfológica del patógeno esto coincide con lo reportado por (Duarte, Echeverría y Martínez, 2016) para *Fusarium sp.* (Hongo).

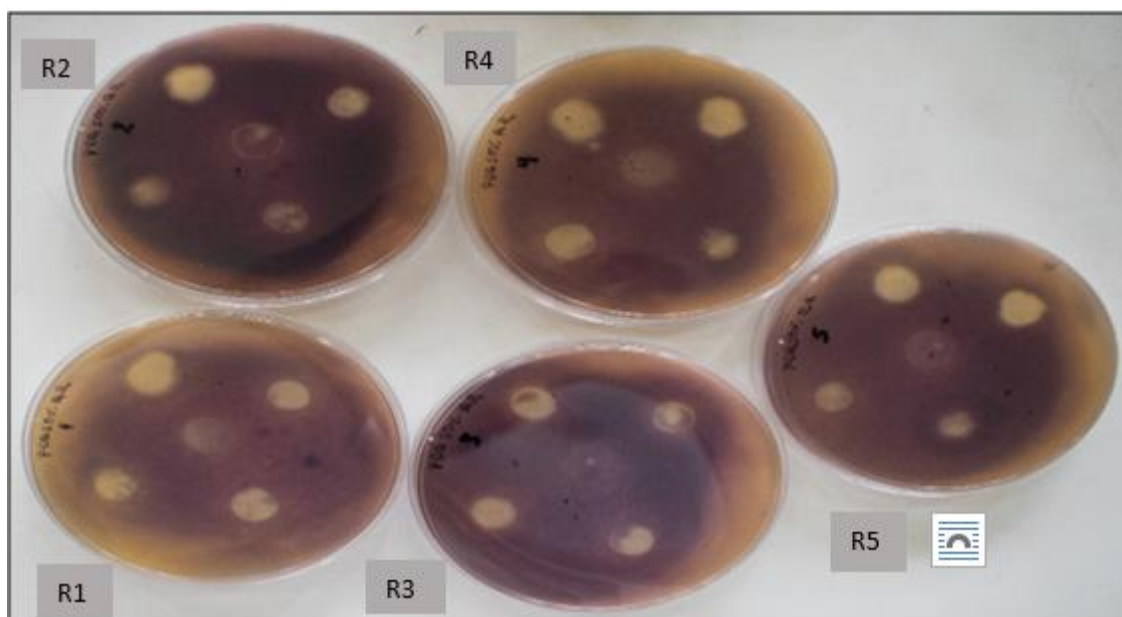


Figura 1-3. Halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120h del extracto acuoso al 50% de resina.

Realizado por: Molina A. 2021

En el (ANEXO A) se detalla el diámetro registrado de los halos de inhibición, la repetición R1 y R4 del extracto acuoso de resina al 50% registró los mayores diámetros con una media de 14,75 mm, seguida de la repetición R5 que presento una media de 14,5 mm, la repetición R2 con una media de 14 mm y la repetición R3 fue la que presento la media más baja con una media de 15

mm de halo.

3.1.2 Evaluación según los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 35%

En la (Figura 2-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto acuoso de resina al 35% de *Dacryodes peruviana* implementadas, se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de color crema y de forma circular, se puede observar que en todas las repeticiones hubo efecto anti-fúngico. También se pudo observar una coloración lila que es una característica morfológica del patógeno esto coincide con los estudios para *Fusarium sp.* (Hongo).

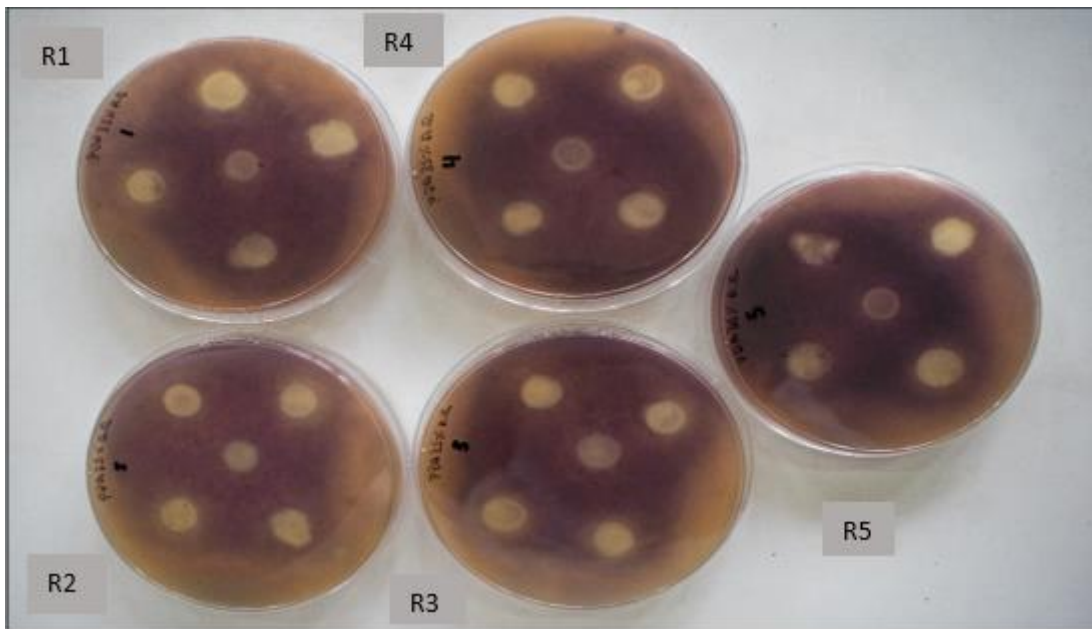


Figura 2-3. Halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120h del extracto acuoso al 35% de resina.

Realizado por: Molina A. 2021

En el (ANEXO A) se detalla el diámetro registrado de los halos de inhibición, la repetición R1 del extracto acuoso de resina al 35% registró el mayor diámetro con una media de 17,5 mm, seguida de la repetición R3 que presentó una media de 16 mm, la repetición R4 y R5 con una media de 15,75 mm y la repetición R2 fue la que presentó la media más baja con una media de 15,5 mm de halo.

3.1.3 Evaluación según los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 25%

En la (Figura 3-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones

del extracto acuoso de resina al 25% de *Dacryodes peruviana* implementadas, se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de color crema y de forma circular, se puede observar que en todas las repeticiones hubo efecto anti-fungico. También se pudo observar una coloración lila que es una característica morfológica del patógeno esto coincide con los estudios para *Fusarium sp.* (Hongo).

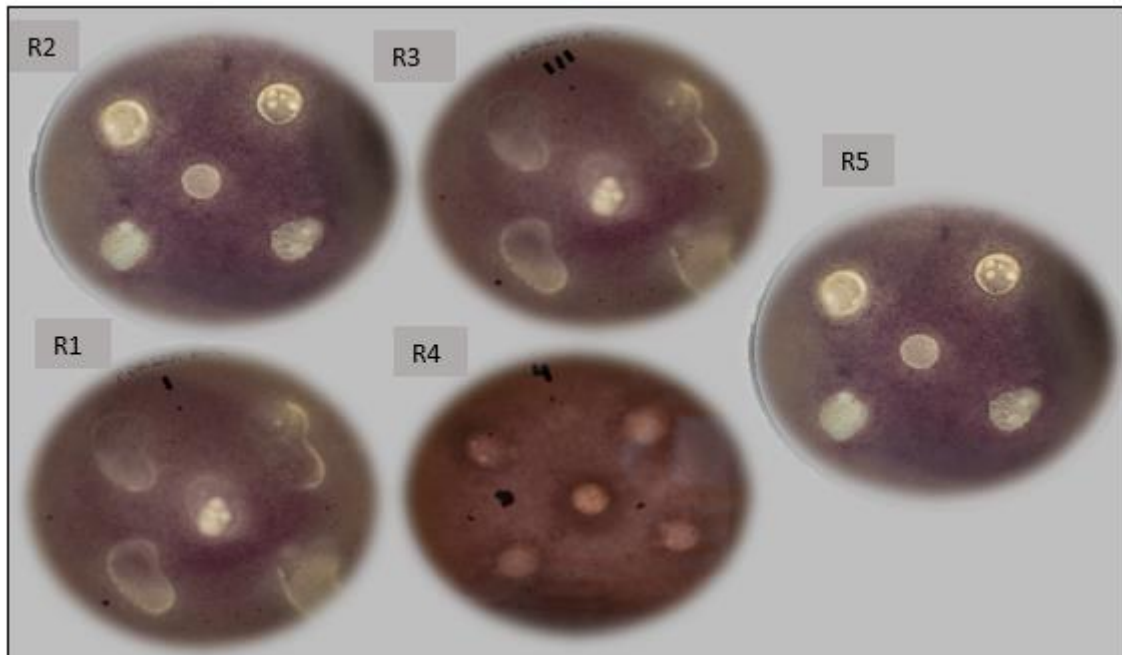


Figura 3-3. Halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120h del extracto acuoso al 35% de resina.
Realizado por: Molina A. 2021

En el (ANEXO A) se detalla el diámetro registrado de los halos de inhibición, la repetición R1 y R2 del extracto acuoso de resina al 25% registró el mayor diámetro con una media de 15,25 mm, seguida de la repetición R3 que presento una media de 15 mm, la repetición R4 con una media de 14,75 mm y la repetición R2 fue la que presento la media más baja con una media de 13,75 mm de halo.

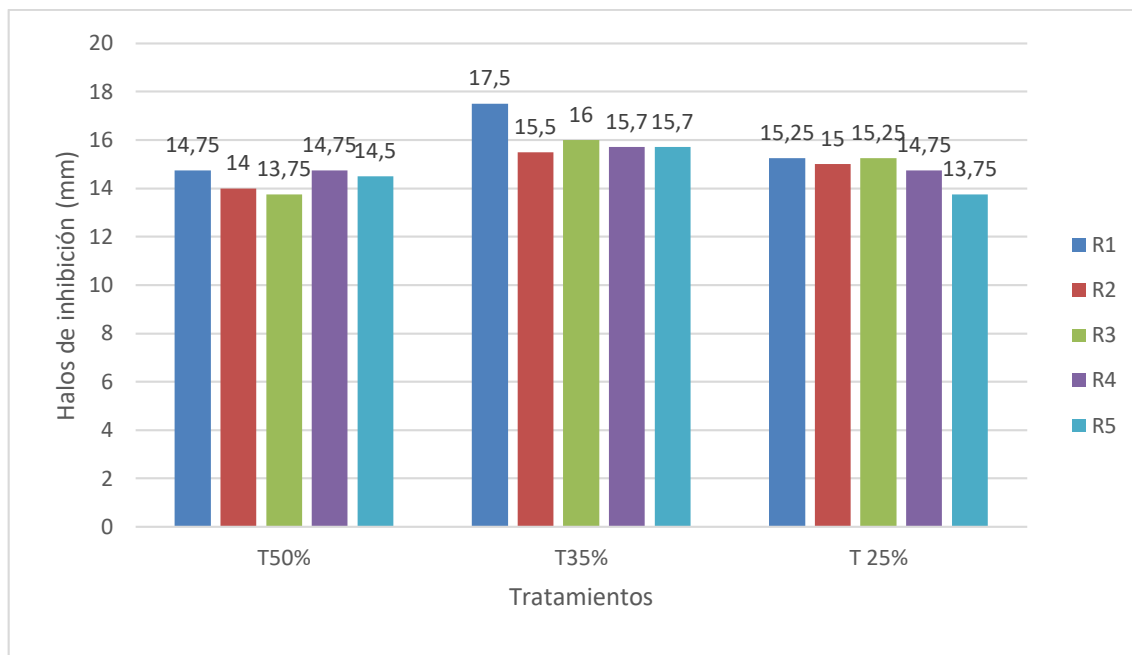


Gráfico 1-3. Comparación de los halos de inhibición con los tres extractos acuoso de resina para *Fusarium sp.*

Realizado por: Molina A. 2021

3.2 Evaluación del proceso de inhibición de *Fusarium sp.* con el extracto acuoso de las hojas de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

3.2.1 Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de las hojas al 50% 35% y 25%

En la (Figura 4-3) los extractos acuosos de las hojas con las concentraciones de 50%, 35% y 25% de *Dacryodes peruviana* implementadas. Cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto acuoso de hojas, del cual se tenía que evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm), se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones no se presenciaron halos de inhibición, al contrario, se pudo notar que hubo aumento del *Fusarium sp.* sobre el tratamiento esto conllevó a una mayor esporulación en la zona que se aplicaron las distintas concentraciones.

Con esto se puede afirmar que en todas las repeticiones no hubo efecto anti-fúngico. Lo único que se pudo observar es la coloración representativa del *Fusarium sp.* que es una característica morfológica del patógeno esto coincide con lo mencionado por (Tapia y Amaro, 2014) para *Fusariumsp* (Hongo).

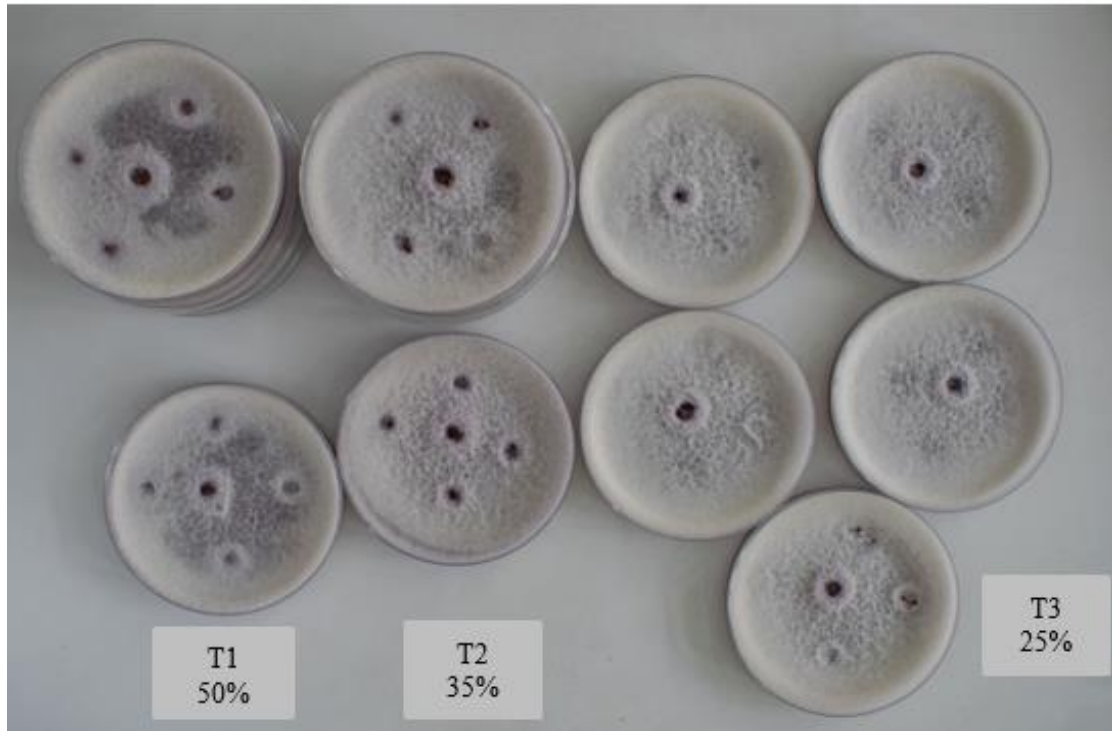


Figura 4-3. Representación de los resultados obtenidos en el estudio con el extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25% que no presento efecto anti-fúngico ante *Fusarium sp.*

Realizado por: Molina A. 2021

3.3 Evaluación del proceso de inhibición de *Fusarium sp.* con el extracto alcohólico de la resina de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

3.3.1 Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 50%

En la (Figura 5-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto alcohólico de resina al 50% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto alcohólico de resina, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de color crema y de forma circular, en la repetición R1 y R5 los halos de inhibición no son tan pronunciados, en cambio en R2, R3 Y R4 se pudo notar con mayor claridad los halos de inhibición. También se pudo observar una coloración lila que es una característica morfológica del patógeno esto coincide con lo reportado por (Duarte, Echeverría y Martínez, 2016) para *Fusarium sp.* (Hongo).

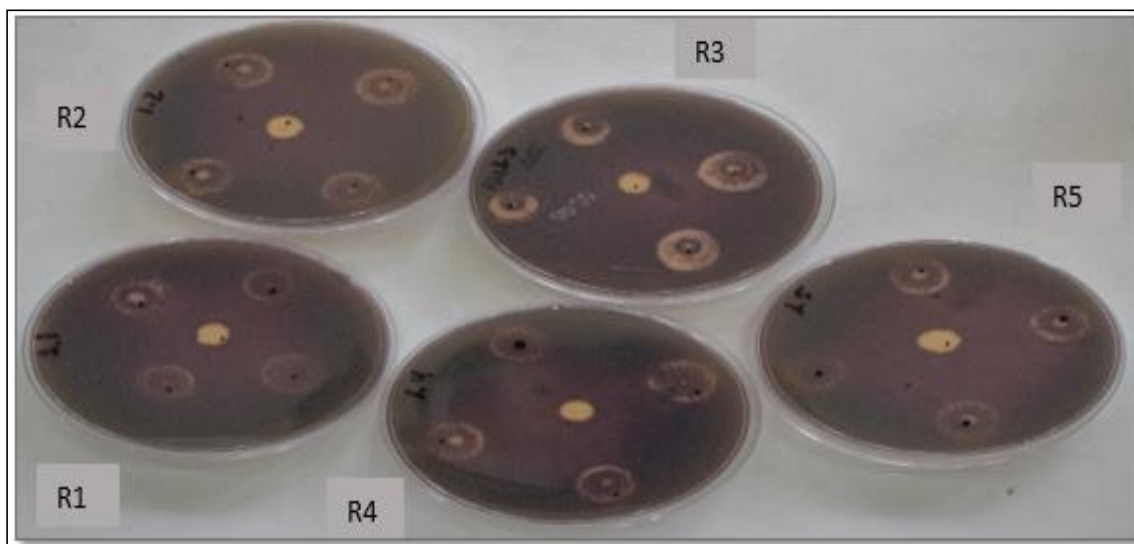


Figura 5-3. Halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120h del extracto alcohólico al 50% de resina.

Realizado por:(Molina A. 2021)

En el (ANEXO C) se detalla el diámetro registrado para los halos de inhibición, en la repetición R1 del extracto alcohólico de resina al 50% registró los mayores diámetros en las sub-muestras con una media de 17,25 mm, seguida de la repetición R3 que presento una media de 16,75 mm, las repeticiones R4 y R5 presentaron una misma media de 15,5 mm y la repetición R2 fue la que presento la media más baja con 15 mm de halo.

3.3.2 Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 35%

En la (Figura 6-3) se pudo observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto alcohólico de resina al 35% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub-muestras que contiene 25 µL del extracto alcohólico de resina, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición transparentes, en la repetición R1 se pudo tomar dos valores de las cuatro sub-muestras ya que las otras dos no tuvieron efecto alguna contra el hongo, en R2 y R3 se obtuvieron los mismo resultado antes mencionados, en cambio en, R4 y R5 se tomó tres valores de las cuatro sub-muestras ya que solo una no tuvo efecto alguno contra el hongo. También se pudo observar una coloración lila en menor proporción que es característica del *Fusarium sp.* (Hongo), también se observó que este tratamiento freno la esporulación del hongo.

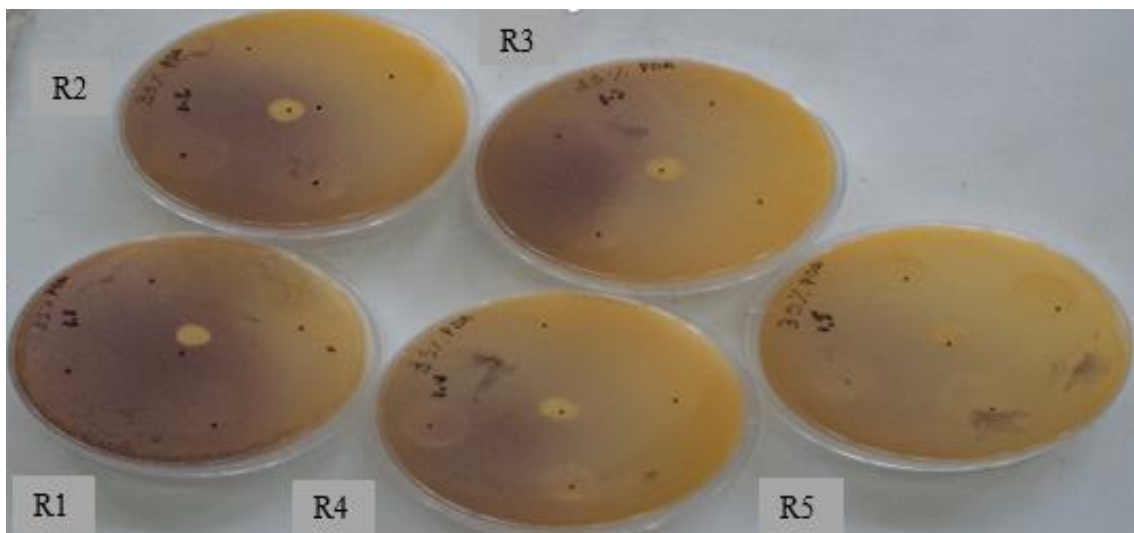


Figura 6-3. Halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120h del extracto alcohólico al 35% de resina.

Realizado por: (Molina A. 2021)

En el (ANEXO C) se detalla el diámetro registrado para los halos de inhibición del extracto al 35%, en la repetición R4 se registró los mayores diámetros en las sub-muestras con una media de 15 mm, seguida de la repetición R5 que presentó una media de 12,75 mm, las repeticiones R2 presentó una media de 11 mm, R1 presentaron una media de 10,25 mm y la repetición R3 fue la que presentó la media más baja con 8,25 mm.

3.3.3 Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 25%

En la (Figura 7-3) se pudo observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto alcohólico de resina al 25% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub-muestras que contiene 25 µL del extracto alcohólico de resina, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se observó lo siguiente: en tres repeticiones se presenciaron halos de inhibición transparentes, mientras que en las otras dos no hubo efecto inhibitor en las repeticiones R1 y R3 no se pudo tomar valores de las cuatro sub-muestras ya que no tuvieron efecto alguna contra el hongo, en R2 y R3 se obtuvieron los mismo resultado antes mencionados, en cambio en, R2, R4 y R5 se pudo evaluar ya que presentaron efecto alguno contra el hongo. También se pudo observar una coloración lila que es característica del *Fusarium sp.* (Hongo).

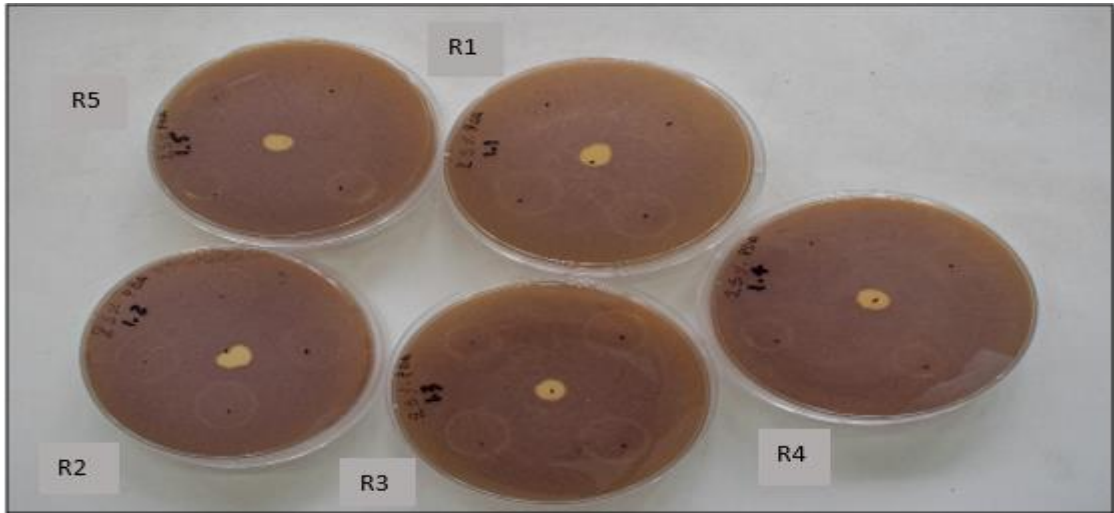


Figura 7-3. Halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120h del extracto alcohólico al 25% de resina.

Realizado por: (Molina A. 2021)

En el tabla (ANEXO C) se detalla el diámetro registrado para los halos de inhibición del extracto al 25%, en la repetición R2 del extracto se registró el mayor diámetro con una media de 17,75 mm, seguida de la repetición R4 que presento una media de 17,25 mm, las repeticiones R1 y R3 no presentaron ningún valor, R5 fue la que presento la media más baja con 13,25 mm.

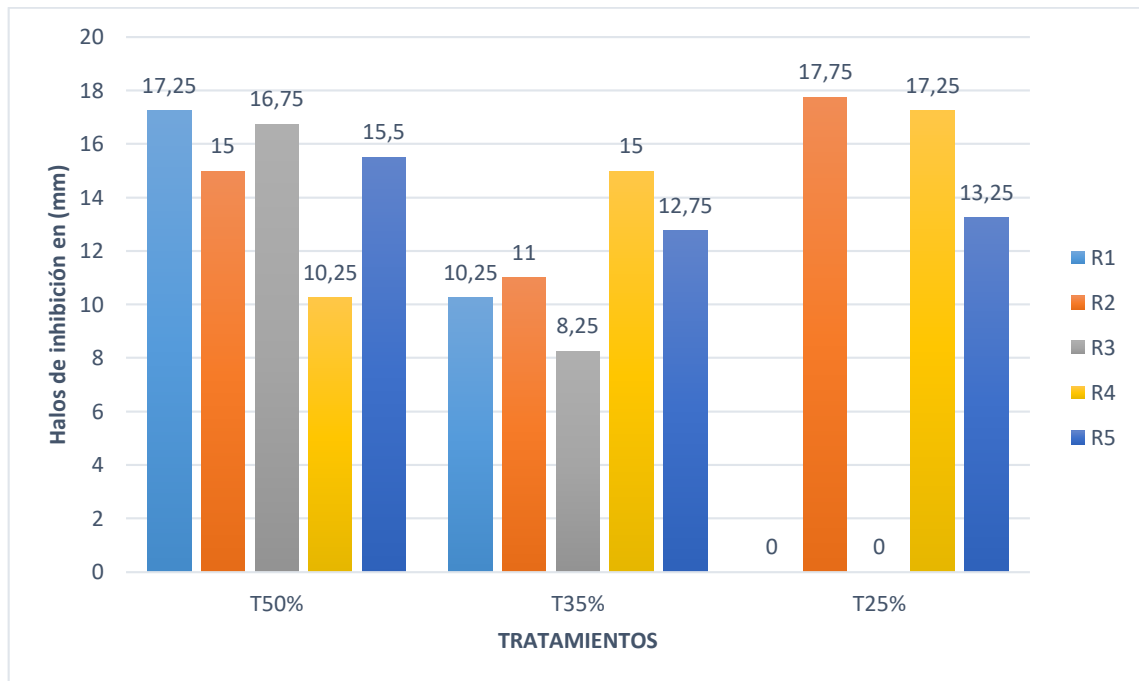


Gráfico 2-3. Comparación de los halos de inhibición con los tres extractos alcohólicos de resina para *Fusarium sp.*

Realizado por: Molina A. 2021

3.4 Evaluación del proceso de inhibición de *Fusarium sp.* con el extracto alcohólico de las hojas de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

3.4.1 Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 50%-

En la (Figura 8-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto alcohólico de hoja al 50% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto alcohólico de hojas, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de forma circular, se puede observar que en todas las repeticiones hubo efecto anti-fungico. También se pudo observar una coloración lila que es una característica morfológica del patógeno para *Fusarium sp.* (Hongo).

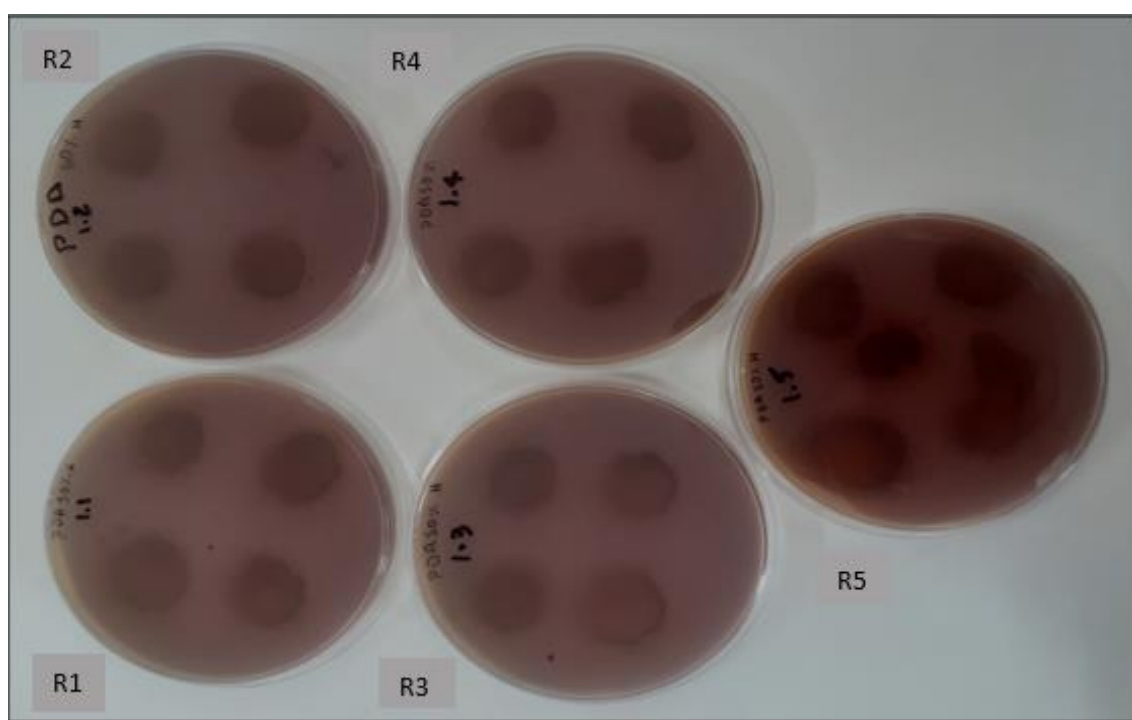


Figura 8-3. Halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120h del extracto alcohólico al 50% de hojas

Realizado por: (Molina A. 2021)

En el (ANEXO E) se detalla el diámetro registrado para los halos de inhibición del extracto al 50%, en la repetición R3 del extracto se registró el mayor diámetro con una media de 24,25 mm, seguida de la repetición R5 que presento una media de 23,75 mm, las repeticiones R2 con una media de 23,25 y R4 con una media de 22.5 y finalmente R5 fue la que presento la media más baja con 21 mm de halo inhibidor.

3.4.2 Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 35%

En la (Figura 9-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto alcohólico de hoja al 35% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto alcohólico de hojas, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de forma circular, se pudo observar que en todas las repeticiones hubo efecto anti-fungico. También se observó una coloración lila que es una característica morfológica del patógeno para *Fusarium sp.* (Hongo).

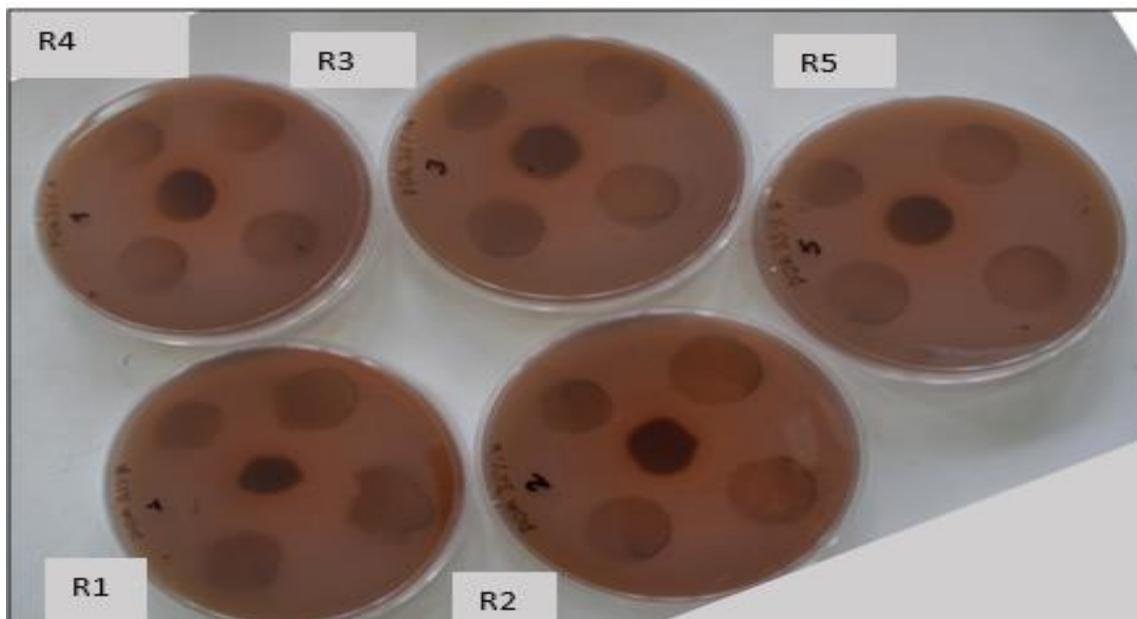


Figura 9-3. Halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120h del extracto alcohólico al 35% de hojas

Realizado por: Molina A. 2021

En el (ANEXO C) se detalla el diámetro registrado para los halos de inhibición del extracto al 35%, en la repetición R2 del extracto se registró el mayor diámetro con una media de 24 mm, seguida de la repetición R5 que presento una media de 22,5 mm, las repeticiones R3 y R4 con una media de 22,25 y finalmente R1 fue la que presento la media más baja con 21,5 mm de halo inhibidor.

3.4.3 Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 25%

En la (Figura 10-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5

repeticiones del extracto alcohólico de hoja al 25% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 µL del extracto alcohólico de hojas, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de forma circular, se puede observar que en todas las repeticiones hubo efecto anti-fungico. También se observó una coloración lila que es una característica morfológica del patógeno para *Fusarium sp.* (Hongo).

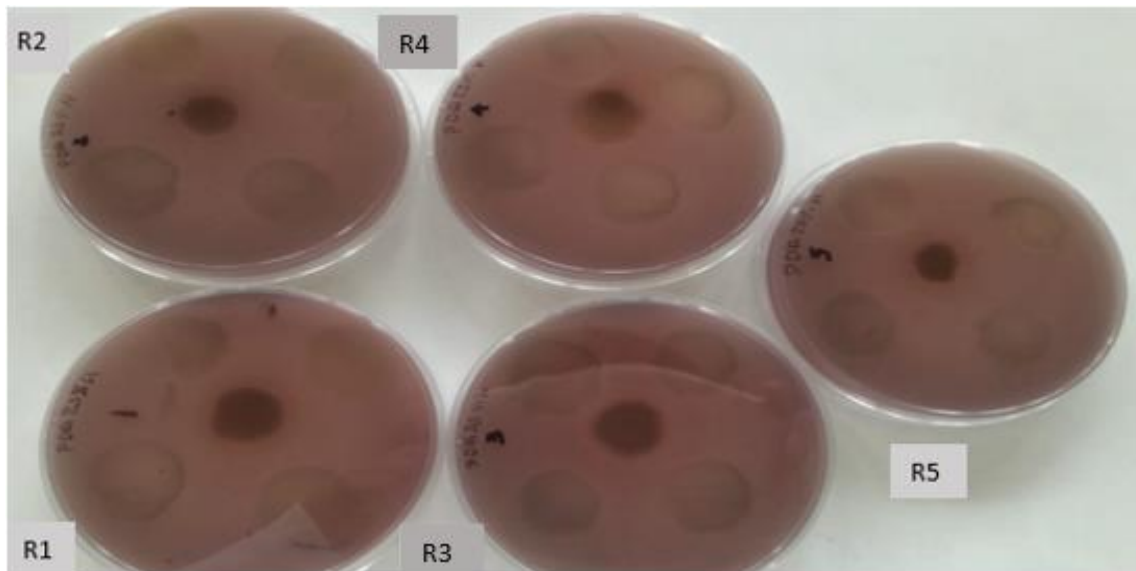


Figura 10-3. Halos de inhibición de *Fusarium sp.* a las 120h del extracto alcohólico al 25% de hojas

Realizado por: Molina A. 2021

En el (ANEXO E) se detalla el diámetro registrado para los halos de inhibición del extracto al 25%, en la repetición R2 del extracto se registró el mayor diámetro con una media de 23,5 mm, seguida de la repetición R5 que presentó una media de 22,75 mm, la repetición R1 presentó una media de 13,25 en R4 con una media de 12,5 y finalmente R3 fue la que presentó la media más baja con 12,25 mm de halo inhibitor.

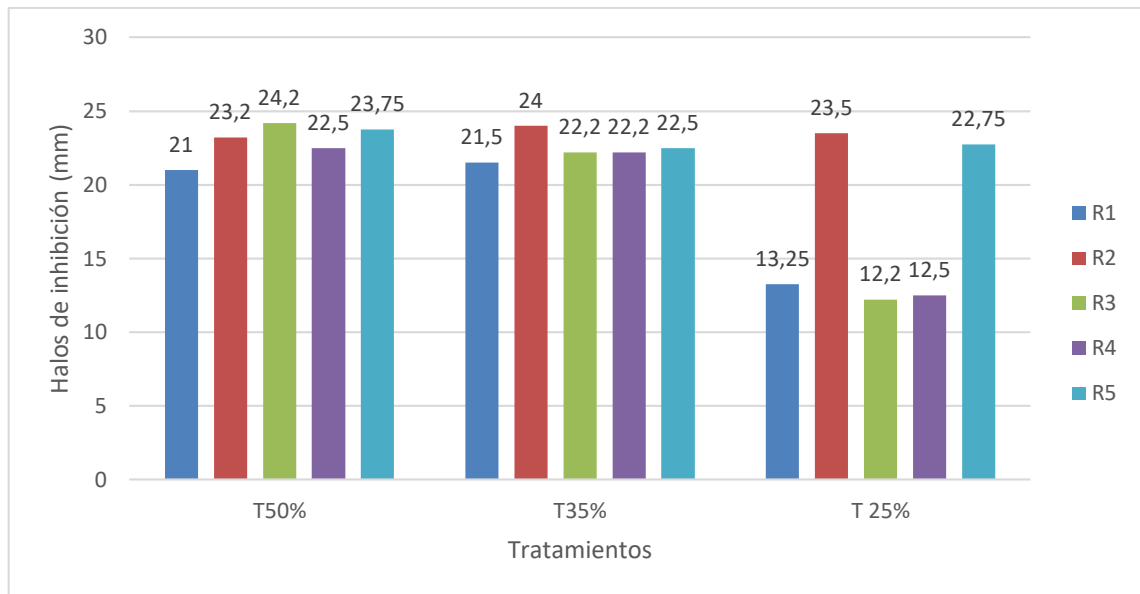


Gráfico 3-3. Comparación de los halos de inhibición con los tres extractos alcohólicos de resina para *Fusarium sp*

Realizado por: Molina A. 2021

3.5 Evaluación del proceso de inhibición de *Ralstonia solanacearum* con el extracto acuoso de las hojas de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

3.5.1 Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de hojas al 50% 35% y 25%

En la (Figura 11-3) los extractos acuosos de las hojas con las concentraciones de 50%, 35% y 25% de *Dacryodes peruviana* implementadas. Cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto acuoso de hojas, del cual se tenía que evaluar cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm), se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones no se presenciaron halos de inhibición, al contrario, se pudo notar que hubo un libre crecimiento de *Ralstonia solanacearum* sobre los tratamientos.

Con esto se puede afirmar que en todas las repeticiones no hubo efecto anti-bacterial. Lo único que se pudo observar es la coloración representativa del *Ralstonia solanacearum* que es una característica típica de la bacteria esto coincide con el estudio realizado por (Torres, Díaz y Casas, 2013).

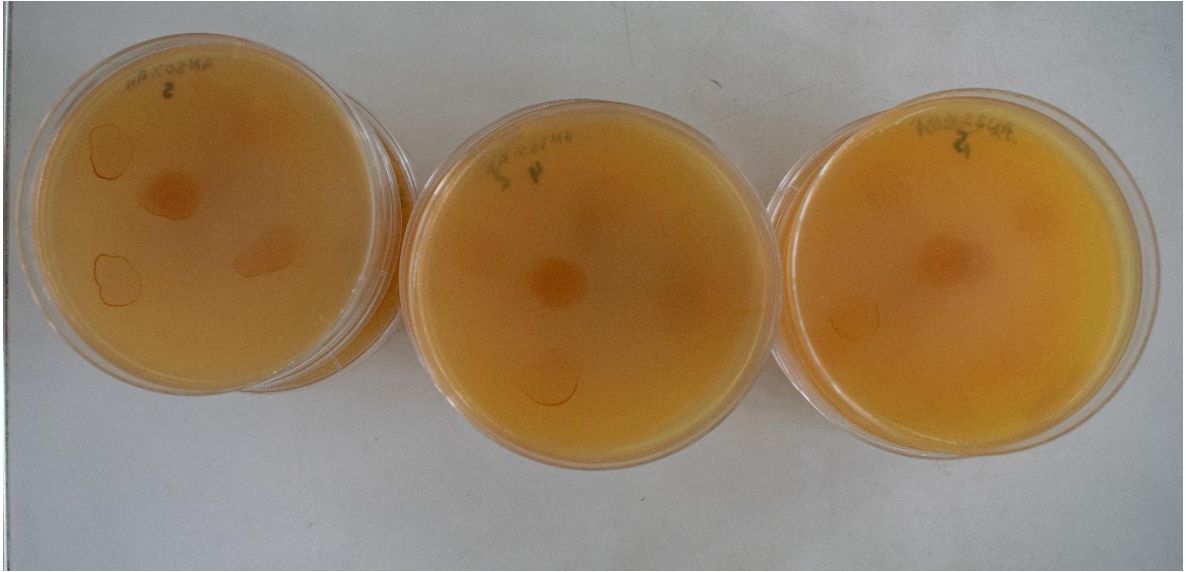


Figura 11-3. Representación de los resultados obtenidos en el estudio con el extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25% que no presento efecto anti-bacterial ante *Ralstonia solanacearum*

Realizado por: Molina A. 2021

3.6 Evaluación del proceso de inhibición de *Ralstonia solanacearum*. con el extracto alcohólico de las resina de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

3.6.1 Evaluación de los diámetros de los halos de inhibición a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 50% 35% y 25%

Este caso es similar al estudio anterior que no presento ningún efecto anti-bacterial contra *Ralstonia solanacearum*. La bacteria creció libremente en el medio de cultivo como se puede observar en la (figura 39-3) el estudio estaba conformado de tres tipos de extractos de 50%, 35% y 25% respectiva mente cada uno conto de cinco repeticiones y cada repetición estaba constituido de la misma manera antes ya descrita en los otros procesos. como se pudo observar en cada uno de los tratamientos no ayudo a combatir *Ralstonia solanacearum* al contrario este prolifero el crecimiento de las mismas.

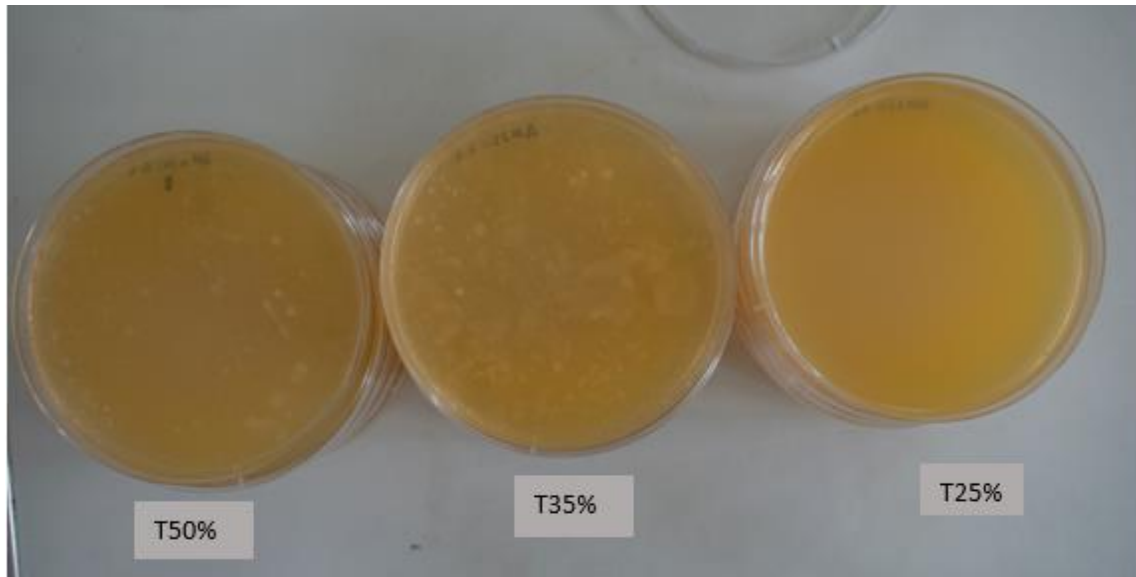


Figura 12-3. Representación de los resultados obtenidos en el estudio con el extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25% que no presento efecto anti-bacterial ante *Ralstonia solanacearum*

Realizado por: Molina A. 2021

3.7 Evaluación del proceso de inhibición de *Ralstonia solanacearum* con el extracto alcohólico de las hojas de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

3.7.1 Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 50%

En la (Figura 13-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto alcohólico de las hojas al 50% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto alcohólico de las hojas, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de color rojizo y de forma circular un poco irregular, se puede observar que en todas las repeticiones hubo efecto anti-bacterial. También se pudo notar que las bacterias formaron colonias de aspecto mucoso una característica morfológica de las bacterias esto coincide con el estudio hecho por (Torres, Díaz y Casas,2013).

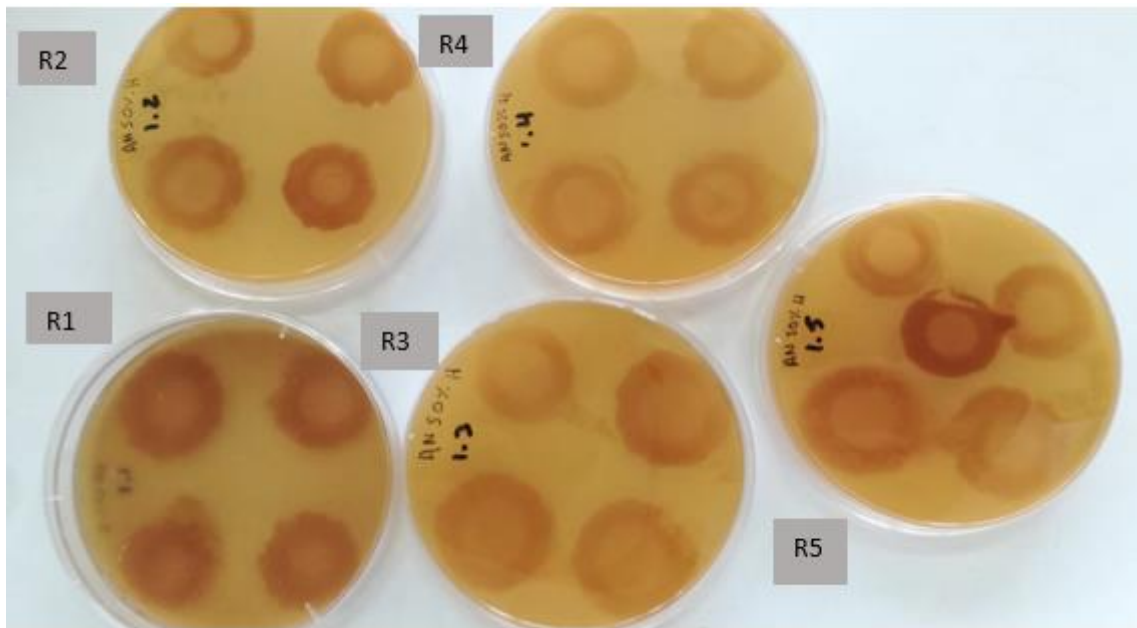


Figura 13-3. Halos de inhibición de *Ralstonia solanacearum* a las 120h del extracto alcohólico al 50% de hojas

Realizado por: Molina A. 2021

En el (ANEXO G) se detalla el diámetro registrado para los halos de inhibición del extracto al 50%, en la repetición R3 del extracto se registró el mayor diámetro con una media de 33,75 mm, seguida de la repetición R1 que presentó una media de 32,5 mm, la repetición R5 presentó una media de 31 en R4 con una media de 30,5 y finalmente R2 fue la que presentó la media más baja con 29,25 mm de halo inhibidor.

3.7.2 Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 35%

En la (Figura 14-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto alcohólico de las hojas al 35% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto alcohólico de las hojas, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de color rojizo y de forma circular irregular, se puede observar que en todas las repeticiones hubo efecto anti-bacterial. También se pudo notar que las bacterias formaron colonias de aspecto mucoso una característica morfológica de las bacterias esto coincide con el estudio hecho por (Torres, Díaz y Casas, 2013).



Figura 14-3. Halos de inhibición de *Ralstonia solanacearum* a las 120h del extracto alcohólico al 35% de hojas

Realizado por: Molina A. 2021

En el (ANEXO G) se detalla el diámetro registrado para los halos de inhibición del extracto al 35%, en la repetición R1 del extracto se registró el mayor diámetro con una media de 37,25 mm, seguida de la repetición R2 que presentó una media de 36,75 mm, las repeticiones R3 y R4 presentaron una media de 34,75 y finalmente R5 fue la que presentó la media más baja con 33,75 mm de halo inhibidor.

3.7.3 Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 25%

En la (Figura 15-3) se puede observar los halos de inhibición que se generaron en las 5 repeticiones del extracto alcohólico de las hojas al 25% de *Dacryodes peruviana* implementadas, cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto alcohólico de las hojas, del cual se evaluó cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm) se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones se presenciaron halos de inhibición de color rojizo y de forma circular irregular, se puede observar que en todas las repeticiones hubo efecto anti-bacterial. También se pudo notar que las bacterias formaron colonias de aspecto mucosidad una característica morfológica de las bacterias esto coincide con el estudio hecho por (Torres, Díaz y Casas, 2013).

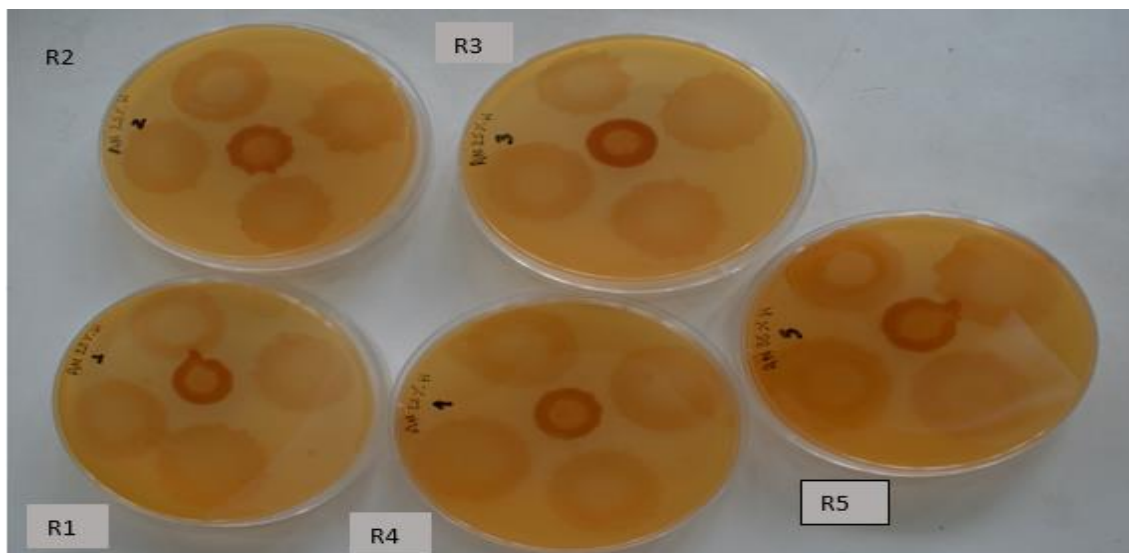


Figura 15-3. Halos de inhibición de *Ralstonia solanacearum* a las 120h del extracto alcohólico al 25% de hojas

Realizado por: Molina A. 2021

En el (ANEXO G) se detalla el diámetro registrado para los halos de inhibición del extracto al 25%, en la repetición R1 y R5 del extracto se registró los mayores diámetros con una media de 30 mm cada una, seguida de la repetición R2 que presentó una media de 29 mm, la repetición R3 presentó una media de 27,25 y finalmente R4 fue la que presentó la media más baja con 25,75 mm de halo inhibidor.

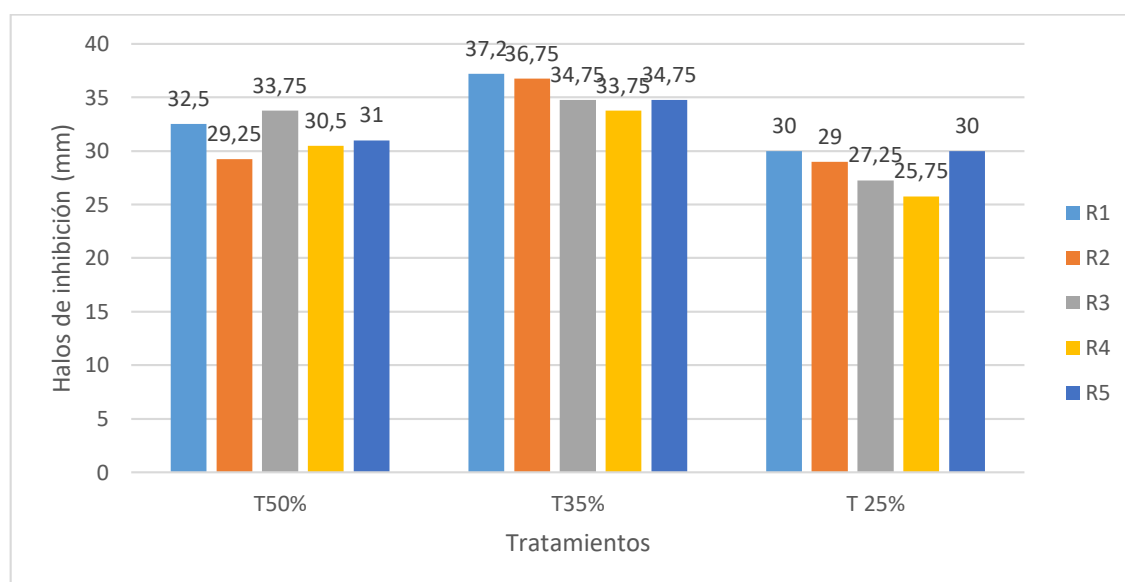


Gráfico 4-3. Comparación de los halos de inhibición con los tres extractos alcohólicos de hojas para *Ralstonia solanacearum*

Realizado por: Molina A. 2021

3.8 Evaluación del proceso de inhibición de *Ralstonia solanacearum* con el extracto alcohólico de resina de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

3.8.1 Evaluación de los diámetros de cada halo de inhibición a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 50%, 35% y 25%

En la (Figura 16-3) los extractos alcohólicos de resina con las concentraciones de 50%, 35% y 25% de *Dacryodes peruviana* implementadas. Cada tratamiento consta de cuatro sub muestras que contiene 25 μ L del extracto alcohólico de resina, del cual se tenía que evaluar cada uno los halos de inhibición en milímetros (mm), se pudo observar lo siguiente: en las cinco repeticiones no se presenciaron halos de inhibición, al contrario, se pudo notar que hubo un libre crecimiento de *Ralstonia solanacearum* sobre los tratamientos.

Con esto se puede afirmar que en todas las repeticiones no hubo efecto anti-bacterial. Lo único que se pudo observar es la coloración representativa del *Ralstonia solanacearum* que es una característica típica de la bacteria esto coincide con el estudio realizado por (Torres, Díaz y Casas, 2013).



Figura 16-3. Representación de los resultados obtenidos en el estudio con el extracto alcohólico de resina al 50%, 35% y 25% que no presento efecto anti-bacterial ante *Ralstonia solanacearum*
Realizado por: Molina A. 2021

3.9 Análisis estadístico del proceso de inhibición de *Fusarium sp.* (Hongo) con los extractos acuoso y alcohólico de resina y hojas de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

H₀: p > 0.05

Los extractos de *Dacryodes peruviana* no presentan propiedades fúngicas o bactericidas para la

aplicación en fitopatología.

Hi: $p \leq 0.05$.

Los extractos de *Dacryodes peruviana* presentan propiedades fúngicas o bactericidas para la aplicación en fitopatología.

Con la ayuda de un análisis de varianza para cada una de las horas de evaluación de los cultivos de *Ralstonia solanacearum* y *Fusarium* sp. a nivel de laboratorio, con el propósito de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos generados por la aplicación de los distintos tratamientos conformados por los extractos acuoso y alcohólico de *Dacryodes peruviana* A distintas concentraciones en los cultivos antes mencionados.

3.9.1 Análisis estadístico del efecto anti-fúngico a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 50%, 35% y 25%

En el análisis de varianza para los diámetros de los halos de inhibición en (mm) a las 120 horas se encontraron diferencias significativas para las medias en los tres tratamientos, con un coeficiente de variación de CV= 4,26% se detalla en el (ANEXO A).

El p- Valor obtenido es menor a 0.05 ($p= 0,0028$), por lo que se acepta la hipótesis alternante ya que existen diferencias significativas entre los halos de inhibición que se generaron por la aplicación de los tratamientos implementados en el estudio. Ya que el extracto acuoso de *Dacryodes peruviana* presento efecto anti-fúngico para *Fusarium* sp.

Tabla 1-3: Prueba de Tukey al 5% para los de inhibición en (mm) a las 120 h

| TRATAMIENTO | Medias | n | E.E. | Grupos |
|-------------|--------|---|------|--------|
| T50% | 14,35 | 5 | 0,29 | A |
| T25% | 14,8 | 5 | 0,29 | A |
| T35% | 16,1 | 5 | 0,29 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Realizado por: Molina A. 2021

Luego de realizar la prueba de Tukey al 5% se observan dos grupos A y B. En el A encontramos T50% con un halo de inhibición promedio de 14,35 mm y T25% con un halo de inhibición de 14,8 mm. En el rango B encontramos a T35% con un halo de inhibición de 16,1 mm. T50% y T35% son estadísticamente diferentes. El mayor halo lo presento (T50% tabla 1-3).

3.9.2 *Análisis estadístico del efecto anti-fúngico a las 120 horas del extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25%*

El extracto no presentó efecto anti-fúngico por lo que se rechaza la hipótesis alternante y se acepta la hipótesis nula ya que no existen diferencias significativas entre los halos de inhibición que se generaron por la aplicación de los tratamientos implementados en el estudio del extracto acuoso de hojas.

3.9.3 *Análisis estadístico del efecto anti-fúngico a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 50%, 35% y 25%*

En el análisis de varianza para los diámetros de los halos de inhibición en (mm) a las 120 horas se encontraron diferencias significativas para las medias en los tres tratamientos, con un coeficiente de variación de CV= 12,31% se detalla en el (ANEXO D).

El p- Valor obtenido es menor a 0.05 ($p= 0,0075$), por lo que se acepta la hipótesis alternante ya que existen diferencias significativas entre los halos de inhibición que se generaron por la aplicación de los tratamientos implementados en el estudio. Ya que el extracto alcohólico de *Dacryodes peruviana* presento efecto anti-fúngico para *Fusarium sp.*

Tabla 2-3: Prueba de Tukey al 5% para los de inhibición en (mm) a las 120 h

| TRATAMIENTO | Medias | n | E.E. | Grupos |
|-------------|--------|---|------|--------|
| T35% | 11,90 | 5 | 0,80 | A |
| T50% | 16,00 | 5 | 0,80 | B |
| T25% | 16,08 | 5 | 1,03 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Realizado por: Molina A. 2021

Luego de realizar la prueba de Tukey al 5% clasifico a las medias en dos grupos A y B. Esto nos quiere decir que estadísticamente son similares T50% y T25% ya que se encuentran en un mismo grupo B. T35% es estadísticamente diferente a T25% y 50% ya que están en grupos diferentes. En el grupo A se encontró el tratamiento al 35% con un halo de inhibición de 11,90 mm y en el grupo B se encontró al tratamiento al T50% con un halo de inhibición de 16,00 mm y T25% con un halo de inhibición de 16,08 mm. El mejor tratamiento fue el de (T25% tabla 2-3).

3.9.4 Análisis estadístico del efecto anti-fúngico a las 120 horas del extracto alcohólico de hoja al 50%, 35% y 25%

En el análisis de varianza para los diámetros de los halos de inhibición en (mm) a las 120 horas se encontraron diferencias significativas para las medias en los tres tratamientos, con un coeficiente de variación de CV= 16,56% se detalla en el (ANEXO F).

El p- Valor obtenido es menor a 0.05 ($p= 0,028$), por lo que se acepta la hipótesis alternante ya que existen diferencias significativas entre los halos de inhibición que se generaron por la aplicación de los tratamientos implementados en el estudio. Ya que el extracto alcohólico de hojas de *Dacryodes peruviana* presento efecto anti-fúngico para *Fusarium sp.*

Tabla 3-3: Prueba de Tukey al 5% para los de inhibición en (mm) a las 120 h

| TRATAMIENTO | Medias | n | E.E. | Grupos | |
|-------------|--------|---|------|--------|---|
| T 25% | 16,85 | 5 | 1,54 | A | |
| T35% | 22,5 | 5 | 1,54 | A | B |
| T50% | 22,95 | 5 | 1,54 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Realizado por: Molina A. 2021

Luego de realizar la prueba de Tukey se observa dos grupos. En el A encontramos T25% con un halo de inhibición promedio de 16,86 y T35% con un halo de inhibición promedio de 22,5. En el rango B encontramos a T35% y T50% con un halo de inhibición promedio de 22,95. T25% y T50% son estadísticamente diferentes. El mayor halo lo presentó (T50% tabla 3-3).

3.10 Análisis estadístico del proceso de inhibición de *Ralstonia solanacearum* (Bacteria) con los extractos acuoso y alcohólico de resina y hojas de *Dacryodes peruviana* a distintas concentraciones.

3.10.1 Análisis estadístico del efecto anti-bacterial a las 120 horas del extracto alcohólico de hojas al 50%, 35% y 25%

En el análisis de varianza para los diámetros de los halos de inhibición en (mm) a las 120 horas se encontraron diferencias significativas para las medias en los tres tratamientos, con un coeficiente de variación de CV= 5,38% se detalla en la tabla (ANEXO G).

El p- Valor obtenido es menor a 0.05 ($p= 0,0001$), por lo que se acepta la hipótesis alternante ya que existen diferencias significativas entre los halos de inhibición que se generaron por la aplicación de los tratamientos implementados en el estudio. Ya que el extracto alcohólico de hojas de *Dacryodes peruviana* presento efecto anti-bacterial para *Ralstonia solanacearum*.

Tabla 4-3: Prueba de Tukey al 5% para los de inhibición en (mm) a las 120 h

| TRATAMIENTO | Medias | n | E.E. | Grupos | | |
|-------------|--------|---|------|--------|---|---|
| T 25% | 28,4 | 5 | 0,76 | A | | |
| T50% | 31,4 | 5 | 0,76 | | B | |
| T35% | 35,45 | 5 | 0,76 | | | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Realizado por: Molina A. 2021

Después de haber realizado la prueba de Tukey al 5% se formaron tres grupos A, B y C. T25% T50% y T35% son estadísticamente diferentes. ya que cada uno se encuentra en un grupo diferente. En el A encontramos a T25% con un halo de inhibición de 28,4 mm. En el B se encuentra T50% con un halo de inhibición de 31,4 mm y en el C encontramos a T35% con un halo de inhibición de 35,45 mm. El mayor halo lo presentó (T35% Tabla 4-3).

3.10.2 Análisis estadístico del efecto anti-bacterial a las 120 horas del extracto alcohólico de resina al 50%, 35% y 25%

El extracto no presentó efecto anti-fúngico por lo que se rechaza la hipótesis alternante y se acepta la hipótesis nula ya que no existen diferencias significativas entre los halos de inhibición que se generaron por la aplicación de los tratamientos implementados en el estudio del extracto alcohólico de resina.

3.10.3 Análisis estadístico del efecto anti-bacterial a las 120 horas del extracto acuoso de hojas al 50%, 35% y 25%

El extracto no presentó efecto anti-fúngico por lo que se rechaza la hipótesis alternante y se acepta la hipótesis nula ya que no existen diferencias significativas entre los halos de inhibición que se generaron por la aplicación de los tratamientos implementados en el estudio del extracto acuoso de hoja.

3.10.4 Análisis estadístico del efecto anti-bacterial a las 120 horas del extracto acuoso de resina al 50%, 35% y 25%

El extracto no presentó efecto anti-fúngico por lo que se rechaza la hipótesis alternante y se acepta la hipótesis nula ya que no existen diferencias significativas entre los halos de inhibición que se generaron por la aplicación de los tratamientos implementados en el estudio del extracto acuoso de resina.

3.11 Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de resina y hojas de *Dacryodes peruviana* para el control anti-fúngico de *Fusarium sp* y anti-bacterial de *Ralstonia solanacearum*.

Tabla 5-3: Comparación del extracto alcohólico entre la resina y hojas del tamizaje fitoquímico realizado

| Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico | | | |
|--|--------|-------------------------------|-------------------------|
| | RESINA | HOJA | METABOLITOS |
| Ensayo de Catequinas | - | + | Catequinas |
| Ensayo de Resinas | + | - | Resinas |
| Ensayo de Fehling | + | - | Az. Reductores |
| Ensayo de baljet | +++ | ++ | lactonas |
| Ensayo de Libermann | + | + | Triterpenos- Esteroides |
| Ensayo de Cl ₃ Fe | - | tanino tipopirogalotánicos | Fenoles y Taninos |
| Ensayo de Espuma | + | + | Saponinas |
| Ensayo de Ninhidrina | - | - | Aminoácidos |
| Ensayo de Bontrager | - | + | Quininas |
| Ensayo de Shinoda | - | - | Flavonoides |
| Ensayo de Antocianidina | - | + | Antocianinos |
| Ensayo de Dragendorff | + | ++ | Alcaloides |
| Ensayo de Mayer | - | + | Alcaloides |
| Ensayo de Wagner | + | + | Alcaloides |

Realizado por: Molina A. 2021

En la tabla (5-3) se puede presenciar los datos de cada uno de los ensayos realizados el cual nos presentó el siguiente dato que mayores metabolitos secundarios presentó el extracto alcohólico de hojas de *Dacryodes peruviana* con un total de 10 metabolitos y el extracto alcohólico de resina un total de 7 metabolitos.

En el extracto acuoso de la resina del Copal los ensayos positivos fueron: Resina, Fehling, Baljet,

Libermann, Espuma, Dragendorff y Wagner lo cual evidencia la presencia de Resina, Az. Reductores, Lactonas, Triterpenos-Esteroides, Saponinas, Alcaloides.

Mientras que los ensayos negativos del extracto acuoso de resina fueron: Catequinas, Cl₃Fe, Ninhidrina, Bontrager, Shinoda, Antocianidina y Mayer.

En el extracto acuoso de las hojas del Copal los ensayos positivos fueron: Catequinas, Baljet, Libermann, Cl₃Fe, Espuma, Bontrager, Antocianidina, Dragendorff, Mayer y Wagner lo cual evidencia la presencia de Catequinas, Lactonas, Triterpenos- Esteroides, Tanino tipo pirogalotánicos, Saponinas, Quininas, Antocianinos, Alcaloides.

Mientras que los ensayos negativos del extracto acuoso de resina fueron: Resinas, Fehling, Ninhidrina, Shinoda

3.12 Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de resina y hojas de *Dacryodes peruviana* para el control anti-fúngico de *Fusarium sp* y anti-bacterial de *Ralstonia solanacearum*.

Tabla 6-3: Comparación del extracto acuoso entre la resina y hojas del tamizaje fitoquímico realizado

| Tamizaje fitoquímico para el extracto acuoso | | | |
|--|--------|------|--------------------|
| | RESINA | HOJA | METABOLITOS |
| Ensayo de Fehling | + | + | Az. Reductores |
| Ensayo de Cl ₃ Fe | + | - | Fenoles y Taninos |
| Ensayo de Espuma | - | + | Saponinas |
| Ensayo de Shinoda | - | + | Flavonoides |
| Ensayo de Dragendorff | + | + | Alcaloides |
| Ensayo de Mayer | - | - | Alcaloides |
| Ensayo de Wagner | - | + | Alcaloides |
| Ensayo Mucílagos | + | + | Mucílagos |
| Ensayo de Principios amargos | + | - | Principios amargos |

Realizado por: Molina A. 2021

En la tabla (6-3) se puede presenciar los datos de cada uno de los ensayos realizados el cual nos presentó el siguiente dato que mayores metabolitos secundarios presentó el extracto acuoso de hojas de *Dacryodes peruviana* con un total de 6 metabolitos y el extracto acuoso de resina un total de 5 metabolitos.

En el extracto acuoso de la resina del Copal los ensayos positivos fueron: Fehling, Cl₃Fe, Dragendorff, Mucílago y Principios amargos lo cual evidencia la presencia de Az. Reductores Fenoles y Taninos, Alcaloides, Mucílagos y Principios amargos.

Mientras que los ensayos negativos del extracto acuoso de resina fueron: Espuma, Shinoda, Mayer y Wagner.

En el extracto acuoso de las hojas los ensayos positivos fueron: Fehling, Espuma, Shinoda, Dragendorff, Wagner y Mucílagos lo cual evidencia la presencia de de Az. Reductores, Saoninas, Flavonoides, Alcaloides, Mucílagos

Mientras que los ensayos negativos del extracto acuoso de resina fueron: Cl₃Fe, Mayer y Principios amargos.

DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad anti-fúngica y anti-bacterial de un extracto alcohólico y acuoso de hojas y resina de *Dacryodes peruviana* como controlador biológico para *Fusarium sp.* y *Ralstonia solanacearum*. En esta investigación se describe el efecto de inhibición que tuvo el extracto alcohólico y acuoso de hojas y resina de *Dacryodes peruviana* frente *Fusarium sp.* y *Ralstonia solanacearum*.

Se conoce que *Dacryodes peruviana* ha sido estudiada para estos fines, pero la familia Burseraceae tiene estudios. Así que podremos comparar con varias investigaciones de Burseraceae.

Como se puede apreciar en la figura 31-3 el efecto antibacteriano de los estudios dependen de las propiedades del extracto evaluado en este caso el extracto acuoso de hojas, los resultados de inhibición es prácticamente nula para las tres concentraciones tal y como menciona (Herrera y García, 2006) en el cual nos menciona que hay disoluciones en las que existe inhibición y diluciones en las que es prácticamente nula. Por lo que se puede decir que en este caso se descarta la hipótesis alternante y se acepta la hipótesis nula.

Según Herrera y García,(2006) también nos manifiesta que los demás extractos presentan efecto inhibitor como es el caso de los extractos acuosos y oleico con diferentes concentraciones. Como se pudo constatar en este estudio ya que el extracto acuoso de resina con sus tres concentraciones que son: 50%, 35% y 25% presentaron actividad anti-fúngica con halos que inhiben el crecimiento de *Fusarium sp* (hongo).

La evaluación de los extractos etanólicos en las concentraciones de las hojas y corteza para el control y manejo de diversos microorganismos presentaron mayor actividad frente *Fusarium oxysporum* que para *Ralstonia solanacearum* (Camargo, 2000). Se puede afirmar lo manifestado por Camargo que los extractos alcohólicos de hojas y resina presentan mayor actividad anti-fúngica contra *Fusarium sp.* Ya que las tres concentraciones que son al 50%, 35% y 25% de hojas y resina presentaron mayor potencial anti-fúngico que anti-bacterial contra *Ralstonia solanacearum* ya que solo funciono el extracto alcohólico de hojas con sus tres concentraciones para inhibir el crecimiento de la bacteria.

Según Pilatuña (2000) nos menciona que la siguiente investigación realizada en Santo Domingo de los Tsachilas de *Dacryodes peruviana* posee metabolitos secundarios en el extracto alcohólico de resina como son: resinas, triterpenos, esteroides, quinonas y alcaloeides. En el extracto acuoso

de resina también nos presentan los siguientes metabolitos secundarios encontrados en *Dacryodes peruviana* y son los siguientes: alcaloides y principios amargos. Sin embargo, en presente estudio realizado se puede afirmar que existen resultados similares en el extracto alcohólico de metabolitos secundarios con la diferencia que en este estudio se obtuvo mayor presencia de metabolitos como son: Azúcares reductores, lactonas y saponinas y en el extracto acuoso de resina se obtuvo mayor número de metabolitos como son: Mucilagos, Azúcares reductores, Fenoles y taninos. Esto pudo pasar por la localización y los entornos ambientales en el que se desarrolle la especie.

Según Cárdenas (2014) nos manifiesta que un extracto tiene propiedades alelopáticas si este irrumpe el crecimiento normal de cualquier microorganismo. De acuerdo a lo mencionado por Cárdenas podemos concluir lo siguiente que nuestros extractos tanto alcohólico como acuoso es considerado también alelopático ya que inhibió el crecimiento tanto del hongo (*Fusarium sp*) y de la misma manera de la bacteria (*Ralstonia solanacearum*).

Una de las características principales de las plantas alelopáticas es que presentan exudación a través de la corteza y por sus raíces. Los extractos vegetales procedentes de plantas alelopáticas tienen efecto fisiológico y bioquímico sobre las bacterias, hongos, insectos y otros animales pudiendo impedir, inhibir u obstruir algún proceso. Esto concuerda con los datos de esta investigación que inhibió el desarrollo normal tanto de *Fusarium sp* y *Ralstonia solanacearum* (Patiño et al., 2011).

Uno de los compuestos activos para las cepas bacterianas son los alcaloides son las sustancias más promisoras para continuar con estudios más específicos de actividad antibacteriana, pues además de presentar una actividad interesante, también inhibe tanto el crecimiento de bacterias grampositivas como el de bacterias gramnegativas lo cual indica que son sustancias que presentan actividad antibacteriana de amplio espectro esto según el estudio realizado por (Patiño et al., 2011). En esta investigación se pudo presenciar alcaloides resultado del tamizaje fotoquímico de los extractos ayudándonos a combatir a la bacteria en este caso a *Ralstonia solanacearum* concordando con lo mencionado en este trabajo.

CONCLUSIONES

- La identificación dendrológica de la especie en estudio, se llevó acabo en el herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo que nos ha permitido obtener la información requerida para el estudio del orden, familia, género y especie a las que pertenece. Además de poder buscar información similar con diversos estudios basándonos en la misma familia, género o especie.
- El extracto acuoso de resina de *D. peruviana* posee potencial anti-fúngico en todas las concentraciones esto se debe a que presentaron halos de inhibición el mejor tratamiento fue la concentración al 35% que presento una media de 16,1 mm para *Fusarium sp.*
- El extracto acuoso de hojas en ninguna de las concentraciones mostro poder de inhibición de crecimiento al contrario promovió el desarrollo de *Fusarium sp.*
- El extracto alcohólico de resina de *D. peruviana* posee potencial anti-fúngico en todas las concentraciones esto se debe a que presentaron halos de inhibición el mejor tratamiento para el extracto alcohólico de resina fue la concentración al 25% que presento una media de 16,08 mm.
- El extracto alcohólico de hojas de *D. peruviana* posee potencial anti-fúngico en todas las concentraciones esto se debe a que presentaron halos de inhibición el mejor tratamiento para el extracto de hojas fue la concentración al 50% que presento una media de 22,95 mm dándonos como resultado que posee mayor efecto anti-fúngico el extracto alcohólico de hoja siendo el mejor en todo el estudio para *Fusarium sp*
- El extracto acuoso de hojas en ninguna de las concentraciones mostro poder anti-bacteriano frente al crecimiento de *R. solanacearum.*
- El extracto acuoso de resina en ninguna de las concentraciones mostro poder anti-bacteriano frente al crecimiento de *R. solanacearum.*
- El extracto alcohólico de hojas de *D. peruviana* posee potencial anti-bacteriano en todas las concentraciones esto se debe a que presentaron halos de inhibición la mejor concentración fue la del 35% con una media de 35,45 mm para *R. solanacearum.*
- El extracto alcohólico de resina en ninguna de las concentraciones mostro poder anti-bacteriano.

RECOMENDACIONES

- Trabajar con concentraciones más altas para el extracto acuoso de hojas de *Dacryodes peruviana* a ver si se logra contrarrestar a *Fusarium sp.*
- Continuar con las investigaciones de los extractos alcohólicos de resina y hojas de *Dacryodes peruviana* para los demás hongos causantes del Damping- off no solo con *Fusarium sp* ya que se obtuvo buenos resultados con los dos.
- Con respecto al extracto acuso de resina y hoja de *Dacryodes peruviana* buscar nuevas alternativas que ayuden a contrarrestar a *Ralstonia solanacearum*.
- Continuar con la fase de pruebas para determinar la dosificación correcta y cada que tiempo se volvería aplicar el producto para contrarrestar a *Ralstonia solanacearum*.
- Realizar la investigación con más intervalos de tiempo ya que solo se pudo realizar lecturas a las 120 horas debido a la crisis sanitaria
- Buscar un nuevo disolvente que no sea alcohol y agua para el extracto alcohólico de resina que no intervenga con el desarrollo de *Fusarium sp* y *Ralstonia solanacearum*.
- Buscar nuevas investigaciones con *Dacryodes peruviana* ya que posee varios metabolitos secundarios que no solo son beneficiosos para el campo forestal si no también puede ser practico para los diversos campos en la salud e industria cosmética. Dando un nuevo valor agregado a los recursos forestales no maderables.

GLOSARIO

Bacteria: Las bacterias son organismos unicelulares que pertenecen al grupo de los procariontes a pesar de su sencilla organización celular, presenta una gran diversidad de formas, las bacterias miden entre 0.5 y 5 μ de longitud son tan pequeñas que es imposible verlas a simple vista (Sánchez et al., 2017).

Bactericida: Es una sustancia que tiene la capacidad de matar bacterias, microorganismos unicelulares u otros organismos (Gil et al., 2012).

Fungicida: Para el control de varias enfermedades fungosas del suelo que afectan a varios cultivos (García et al., 2006).

Hongo: Son microorganismos eucarióticos más complejos que los procariontes son unicelulares y pluricelulares, algunos hongos son patógenos y pueden causar enfermedades (Sánchez et al., 2017).

Extracto: Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos u orgánicos, obtenible por procesos físicos, químicos o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo tecnológico (Pardo, 2002).

BIBLIOGRAFÍA

ÁLVAREZ, B., BIOSCA, E. & LÓPEZ, M., . On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. 2010 . S.l.:

ÁLVAREZ, D. Facultad de ciencias agropecuarias y recursos naturales. *caracterización morfológica e identificación de zonas potenciales de conservación de copal (Dacryodes peruviana) en los siete transectos del proyecto banco de germoplasma*. [En línea] 2017. [Citado el: 14 de 04 de 2020.] Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4204/1/UTC-TC-000103.pdf>.

AMAGUAÑA, F & CHURUCHUMBI, E. Estandarización fitoquímica del extracto de caléndula. *ingeniería en biotecnología de los recursos naturales*. [En línea] Universidad Politécnica Salesiana, 2018. [Citado el: 22 de 05 de 2020.] Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16149/1/UPS-QT13324.pdf>.

ARBELÁEZ, GERMÁN. *Algunos aspectos de los hongos del genero Fusarium y de la especie Fusarium oxysporum*. 2000. Vol. 17. pp 25-78.

BBL NUTRIENT AGAR. Procedimiento de control de calidad. [en línea]. 2006 [Consulta: 26 enero 2021]. Disponible en: [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007481\(08\)\(0706\)_ES.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007481(08)(0706)_ES.pdf).

BRAVO, E. La biodiversidad en el Ecuador. [en línea]. 2014. Quito-Ecuador: [Consulta: 8 diciembre 2020]. Disponible en: [https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/La Biodiversidad.pdf](https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/LaBiodiversidad.pdf).

CAMARGO, J. Programa nacional de ciencias basicas informe tecnico final proyecto. [en línea]. 2000 [Consulta: 4 marzo 2021]. Disponible en: https://www.javeriana.edu.co/gifuj/BURSERACEAE_F.pdf.

CÁRDENAS, C. Las plantas alelopáticas. *cárdenas, c., 2014. las plantas alelopáticas. [en línea]. 2014. [Consulta: 4 marzo 2021]. Disponible en: www.repositorio.espe.edu.ec.* [en línea]. [Consulta: 4 marzo 2021]. Disponible en: www.repositorio.espe.edu.ec.

CHAMPOISEAU, P.G., JONES, J.B. & ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 Causes Tropical Losses and Temperate Anxieties . *Plant Health Progress* [en línea], vol. 10, no. 1, pp. 35. 2009. [Consulta: 25 enero 2021]. ISSN 1535-1025. DOI 10.1094/php-2009-0313-01-rv. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHP-2009-0313-01-RV>.

CHANDRASHEKARA, K.N. & PRASANNAKUMAR, M.K. New host plants for *Ralstonia solanacearum* from India. *Plant Pathology* [en línea], vol. 59, no. 6, pp. 1164-1164. 2010. [Consulta: 22 enero 2021]. ISSN 00320862. DOI 10.1111/j.1365-3059.2010.02358.x. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3059.2010.02358.x>.

CHAVARRO MESA, EDUARDO & DÍAZ, ANGEL. *Chavarro Mesa, EEstablecimiento de un sistema diagnóstico para la detección de Ralstonia solanacearum y diferenciación genética utilizando marcadores moleculares RAPD.* 2006.

DUARTE, L., ECHEVERRÍA, H. & MARTÍNEZ, C. Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *SCIELO* [en línea], vol. 31, no. 2016, pp. 176-181. 2016. [Consulta: 24 febrero 2021]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v31n3/rpv04316.pdf>.

ENRIQUEZ, M. UCE. *Elaboración y evaluación de un medio de cultivo sólido a partir de quinua, Chenopodium quinoa, Para la producción del hongo Lentinus spp.* [En línea] 2016. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8014/1/T-UCE-0017-0038-2016.pdf>.

ESTACIÓN AGROMETEOROLÓGICA - Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. [en línea], 2019. [Consulta: 1 febrero 2021]. Disponible en: <https://www.esPOCH.edu.ec/index.php/estación-meteorológica.html#anuarios>.

ESTRELLA, J. et.al. Biodiversidad y recursos genéticos. *Una guía para su uso y acceso en el ECUADOR.* [En línea] 2005. [Citado el: 22 de 04de 2020.] <https://www.portalces.org/sites/default/files/migrated/docs/Biodiversidadyrecursosgeneticos1.pdf>.

GARCÍA, R. et.al. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad* [en línea], vol. 10, no. 2, 2006. pp. 8-25. [Consulta: 5 marzo 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116102005.pdf>.

GARCÍA, S. et.al. Aprobado: junio. *Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia* [en línea].2016. S.l.: [Consulta: 3 diciembre 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n8/1405-3195-agro-51-08-895-en.pdf>.

GIL, M. et.al. Salus Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. *Salus*, vol. 16, no. 3. 2012. pp 10-35.

GLOBAL CATALOGUE OF MICROORGANISMS. *Fusarium* - Global Catalogue of

Microorganisms. [en línea].2018. [Consulta: 18 enero 2021]. Disponible en: http://gcm.wfcc.info/speciesPage.jsp?strain_name=Fusarium.

Herbario Virtual |. [en línea], [sin fecha]. [Consulta: 22 enero 2021]. Disponible en: http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=7477.

HERNÁNDEZ, L. et.al. *Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades*. 2007.

HERRERA, F. & GARCÍA, R. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomill sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. *BISTUA* [en línea], vol. 4, 2006. pp. 13-19. [Consulta: 8 marzo 2021]. ISSN 0120-4211. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90340202>.

INAMHI-PDOT. Plan De Desarrollo Y Ordenamiento Territorial Archidona «Territorio para el Buen Vivir». [en línea]. 2019. S.l.: [Consulta: 2 febrero 2021]. Disponible en: www.archidona.gob.ec.

JUSTE, I. Ecología verde. *fungicidas*. [En línea] 2019. [Citado el: 22 de 04 de 2020.] <https://www.ecologiaverde.com/fungicidas-caseros-100.html>.

LAM, H. Tropicos |Name - Dacryodes peruviana. [en línea]. 1982. [Consulta: 4 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/name/4700229>.

Miranda, M. *Folleto de Prácticas de Farmacognosia y Productos Naturales*. La Habana-Cuba : UH, 2006.pp 52-55(110).

PATÍÑO, O. et.al. Propiedades antibacterianas in vitro de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae) . *Revista Cubana de Farmacia* [en línea].2011. [Consulta: 4 marzo 2021]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>.

PÉREZ, Á. & VALENCIA, R. Usos de *Dacryodes peruviana*. [en línea].2019. [Consulta: 8 diciembre 2020]. Disponible en: [https://bioweb.bio/floraweb/arbolesyasuni/FichaEspecie/Dacryodes peruviana](https://bioweb.bio/floraweb/arbolesyasuni/FichaEspecie/Dacryodes%20peruviana).

PILATUÑA, L. *Elaboración de una forma farmacéutica con efecto cicatrizante a partir del extracto del copal planta nativa del centro cultural uni-shu de la comuna chiguilpe de santo domingo de los TSÁCHILAS.* ” [en línea]. 2000 S.l.: s.n. [Consulta: 4 marzo 2021]. Disponible en: <http://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/4784/1/PIUABQF010-2016.pdf>.

RAMÓ, V & RODAS, F. El control orgánico de plagas y enfermedades de los cultivos y la fertilización natural del suelo. *naturaleza cultura internacional*. [En línea] 2007. [Citado el: 00 de

04 de 2020.]

REMACHE, F. *Evaluación del efecto de microorganismos antagonistas en el control de la marchitez bacteriana (Ralstonia solanacearum e. f. smith), presente en plantaciones de eucalipto tropical (Eucalyptus urograndis) en la hacienda los ángeles, cantón buena fe, provincia de los ríos* [en línea]. S.l.2018. : Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. [Consulta: 25 enero 2021]. Disponible en: <http://dspace.esepoch.edu.ec/bitstream/123456789/8492/1/33T0179.pdf>.

ROBLES, J. *Aislamiento de principios biológicamente activos presente en especies colombianas de la familia Burseraceae* [en línea]. 2000. S.l.: s.n. [Consulta: 8 diciembre 2020]. Disponible en: https://www.javeriana.edu.co/gifuj/BURSERACEAE_F.pdf.

SADER, Moko del plátano Ralstonia solanacearum raza 2 Smith. [en línea]. S.l.2017: [Consulta: 25 enero 2021]. Disponible en: <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas tecnicas/Ficha Técnica de Moko del platano.pdf>.

SÁNCHEZ, A. et.al. 2017. microbios o microorganismos. *CIENCIA* [en línea], vol. 68, pp. 1-8.2017 [Consulta: 5 marzo 2021]. Disponible en: http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/QueSonMicrobios.pdf.

SANCHEZ A. et.al. Diversity and distribution of Ralstonia solanacearum strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathology* [en línea], vol. 57, no. 2, 2008. pp. 320-331. [Consulta: 25 enero 2021]. ISSN 0032-0862. DOI 10.1111/j.1365-3059.2007.01769.x. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3059.2007.01769.x>.

SCHWIRTLICH, B. Inicio de semillas - Amortiguación - Creces niña. [en línea]. 2002. [Consulta: 9 diciembre 2020]. Disponible en: <http://yougrowgirl.com/seed-starting-damping-off/>.

TAPIA, C. & AMARO, J. Género Fusarium. *SIELO* [en línea], vol. 1. 2014. [Consulta: 21 enero 2021]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n1/art12.pdf>.

TORRES, C., DÍAZ, J. & CASAS, M. Manejo de Ralstonia Solanacearum raza 2 a través de productos químicos y biológicos. *SCIELO* [en línea], vol. 10, no. 2013, pp. 217-223. 2013. [Consulta: 27 febrero 2021]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/itec/v10n2/v10n2a09.pdf>.

TITUAÑA, G. Facultad de ciencia e ingeniería en alimentos. [En línea] 2013. [Citado el: 06 de 03 de 2021.] <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8563/1/MAI%2005.pdf>.

UICN Y ECOCINECIA. Informe de la UICN para la República del Ecuador OFICINA REGIONAL PARA AMÉRICA DEL SUR. 2015. S.l.:

XU, Y. et.al. Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle system. *International Journal of Food Microbiology* [en línea], vol. 121, no. 3, pp. 262-267. 2008. [Consulta: 26 enero 2021]. ISSN 01681605. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.005. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160507005740>.