



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

DIRECCIÓN DE POSGRADO MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL

MODALIDAD: PROYECTO DE DESARROLLO

Título:

Evaluación de alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para el control de antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en chocho, en condiciones de laboratorio. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magíster en Sanidad Vegetal

Autora:

Ríos Madril María Ipatia

Tutora:

López Castillo Guadalupe, Mg.

LATACUNGA –ECUADOR

2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “Evaluación de alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para el control de antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en chocho, en condiciones de laboratorio. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021” presentado por Ríos Madril María Ipatia, para optar por el título magister en Sanidad Vegetal.

CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y se considera que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación para la valoración por parte del Tribunal de Lectores que se designe y su exposición y defensa pública.

Latacunga, julio, 17, 2023



.....
Guadalupe de las Mercedes López Castillo, Mg.

CC: 1801902907

APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Titulación: “Evaluación de alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para el control de antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en chocho, en condiciones de laboratorio. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021.”, ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, previo a la obtención del título de Magíster en Sanidad Vegetal; el presente trabajo reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la exposición y defensa.

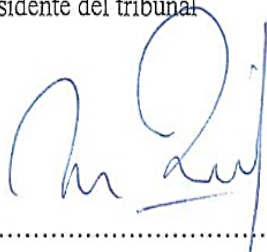
Latacunga, julio, 17, 2023



.....
Giovana Paulina Parra Gallardo, Mg.

C.C. 18022670037

Presidente del tribunal



.....
Marco Antonio Rivera Moreno, Mg

C.C. 0501518955

Lector 2



.....
Eliana Granja Guerra, Mg.

C.C. 17181263301

Lector 3

DEDICATORIA

Dedico este logro a mi madre Livita, quien ahora se encuentra en el cielo. Sé que estaría profundamente orgullosa de mí al verme alcanzar mis objetivos y superar los desafíos. A mi hijita Maves, mi mayor inspiración y motor para seguir adelante en cada paso de mi camino. A mi esposo Diego, mi fiel compañero de viaje, gracias por tu amor incondicional y apoyo que me han permitido culminar con éxito este trabajo. A mis adorables sobrinos, Angelito y Victorita, su luz, amor y ternura han sido mi fuente de fortaleza y alegría constante. A mi padre Wilo y a mi hermana Amparito, su infinito amor, apoyo y ejemplo de perseverancia y constancia han sido fundamentales en mi trayectoria. Juntos, conforman mi sólido pilar de amor y gratitud.

Con amor y agradecimiento,

María Ipatia Ríos Madril

AGRADECIMIENTO

Sin Dios como autor y creador de todo no sería posible lograr los anhelos de mi corazón, por ello doy gracias primero a mi creador y en segunda instancia a mi hermana que siempre ha sido mi mayor apoyo de manera incondicional en cualquier circunstancia de mi vida.

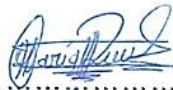
También agradezco a mi guía y ejemplo terrenal que es mi padre por permanecer a mi lado, a Marianita Lisintuña, Mateo Punina y a todos mis amigos y familiares quienes me impulsaron para seguir adelante.

María Ipatia Ríos Madril

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Quien suscribe, declara que asume la autoría de los contenidos y los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación.

Latacunga, julio, 17, 2023



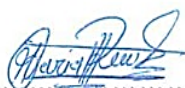
.....
Ing. María Ipatia Ríos Madril

0503110371

RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de autoría intelectual total y/o parcial del presente trabajo de titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Latacunga, julio, 17, 2023



.....
Ing. María Ipatia Ríos Madril
0503110371

AVAL DEL PRESIDENTE

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: “Evaluación de alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para el control de antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en chocho, en condiciones de laboratorio. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021.” contiene las correcciones a las observaciones realizadas por los miembros del tribunal en la predefensa.

Latacunga, julio, 17, 2023



.....
Giovana Paulina Parra Gallardo, Mg.
C.C. 18022670037

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL

Título: “EVALUACIÓN DE ALCALOIDES DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) PARA EL CONTROL DE ANTRACNOSIS (*Colletotrichum sp.*) EN CHOCHO, EN CONDICIONES DE LABORATORIO. SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI 2021.”

Autora: Ríos Madril María Ipatia

Tutora: López Castillo Guadalupe, Mg.

RESUMEN

En el estudio titulado "Evaluación de alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para el control de antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en chocho, en condiciones de laboratorio. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021" se evaluó los alcaloides presentes en *Lupinus mutabilis Sweet*, por su potencial actividad antifúngica contra *Colletotrichum sp.* Estos alcaloides fueron evaluados en condiciones de laboratorio, para lo cual se trabajó con 2 factores de estudio A (tipo de control macerado y líquido residual del chocho hidratado) * B (concentraciones) + 2 testigos (químico y absoluto). Se evaluó concentraciones al 25%, 50%, 75%, y 100%, con un diseño de bloques completamente al azar con 10 tratamientos y tres repeticiones, obteniendo un total de 30 unidades experimentales. Las variables bajo estudio fueron el porcentaje de inhibición micelial, velocidad de crecimiento micelial y el color del micelio. Los resultados obtenidos mostraron que los alcaloides presentes en el chocho exhibieron una actividad antifúngica significativa contra *Colletotrichum sp.* Se demostró una mayor inhibición del crecimiento fúngico, por lo que se determinó que la concentración del 50% del macerado en la quinta toma de datos inhibió un 60.44%; y la concentración al 75% tubo un porcentaje de inhibición del 66.87%; demostrando que los alcaloides del tipo de control macerado del chocho podrían utilizarse para el desarrollo de tratamientos antifúngicos naturales en la agricultura. En este estudio surgió que los alcaloides presentes en chocho tienen un potencial efecto antifúngico contra *Colletotrichum sp.* Estos resultados podrían tener implicaciones importantes para el desarrollo de métodos naturales y sostenibles de control de enfermedades en los cultivos de chocho.

PALABRAS CLAVE: *Lupinus mutabilis Sweet*, *Colletotrichum sp.*, alcaloides, concentraciones, porcentaje de inhibición.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

GRADUATE SCHOOL

MASTER'S DEGREE IN PLANT SANITATION

Title: EVALUATION OF MUG ALKALOIDS (*Lupinus mutabilis Sweet*) FOR THE CONTROL OF ANTHRACNOSE (*Colletotrichum sp.*) IN MUG, IN LABORATORY CONDITIONS. SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI 2021.

**Author: Ríos Madril María Ipatia
Tutor: López Castillo Guadalupe, Mg**

ABSTRACT

The study "Evaluation of lupine alkaloids (*Lupinus mutabilis Sweet*) for the control of anthracnose (*Colletotrichum sp.*) in lupine, in laboratory conditions. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021" evaluated the alkaloids present in *Lupinus mutabilis Sweet*, for their potential antifungal activity against *Colletotrichum sp.* We evaluated the alkaloids under laboratory conditions, we worked with 2 study factors A (type of macerated control and residual liquid from hydrated lupine) * B (concentrations) + 2 controls (chemical and absolute). Concentrations at 25%, 50%, 75%, and 100% were evaluated, with a completely randomized block design with 10 treatments and three repetitions, obtaining a total of 30 experimental units. The variables under study were the percentage of mycelial inhibition, speed of mycelial growth, and the color of the mycelium. The results obtained showed that the alkaloids present in the lupini beans exhibited significant antifungal activity against *Colletotrichum sp.* A greater inhibition of fungal growth was demonstrated, for which it was determined that the concentration of 50% of the macerate in the fifth data collection inhibited 60.44%; and the 75% concentration had an inhibition percentage of 66.87%; demonstrating that the alkaloids of the macerated control type of lupine could be used for the development of natural antifungal treatments in agriculture. According to this study, *Colletotrichum sp.* may be resistant to the antifungal effects of the lupini bean's alkaloids. These findings may have significant ramifications for the creation of organic and environmentally friendly disease management strategies for lupine crops.

KEYWORDS: *Lupinus mutabilis Sweet*, *Colletotrichum sp.*, alkaloids, concentrations, inhibition percentage.

Yo, Tania Elizabeth Alvear Jiménez con cédula de identidad número: 0503231763 MAGÍSTER EN LINGÜÍSTICA APLICADA A LA ENSEÑANZA DEL INGLÉS COMO LENGUA EXTRANJERA con número de registro de la SENESCYT: 1020-2021-2354185.; CERTIFICO haber revisado y aprobado la traducción al idioma inglés del resumen del trabajo de investigación con el título "Evaluación de alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para el control de antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en chocho, en condiciones de laboratorio. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021.", de: Ríos Madril María Ipatia a, aspirante a Magister en Sanidad Vegetal.



Tania Elizabeth Alvear Jiménez

ID. 0503231763

Latacunga, agosto 2023,

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	2
Planteamiento del problema	3
Hipótesis o preguntas de investigación	4
Objetivos de la Investigación	5
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	6
1.1. <i>Lupinus mutabilis Sweet</i>	6
1.1.1. Origen y distribución	6
1.1.2. Importancia económica.....	7
1.1.3. Descripción botánica.....	8
1.1.4. Valor nutricional.....	10
1.1.5. Alcaloides de chocho	10
1.1.6. Composición de los alcaloides del chocho	12
1.1.7. Toxicidad de los alcaloides del chocho	13
1.1.8. Propiedades de los alcaloides	14
1.1.9. Requerimientos del cultivo	15
1.2. <i>Colletotrichum</i>	16
1.2.1. Generalidades del patógeno	16
1.2.2. Hongos del género <i>Colletotrichum</i>	17
1.2.3. Estado anamorfo	18

1.2.4.	Estado telemorfo.....	19
1.2.5.	Taxonomía del género <i>Colletotrichum</i>	19
1.2.6.	Características biológicas del género <i>Colletotrichum</i>	20
1.3.	<i>Colletotrichum sp.</i> agente causal de la antracnosis en chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).....	21
1.3.1.	Características	22
1.3.2.	Taxonomía.....	22
1.3.3.	Signos y Síntomas	23
1.3.4.	Epidemiología	24
1.3.5.	Nutrición del patógeno.....	24
1.3.6.	Fuentes de inóculo del patógeno	25
1.3.7.	Supervivencia	26
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS		28
2.1.	Delimitación de la localidad de estudio	28
2.2.	Datos climáticos de la localidad	28
2.3.	Modalidad o enfoque de la investigación	28
2.4.	Tipo de investigación.....	29
2.5.	Material Genético	29
2.6.	Variables de la investigación.....	29
2.7.	Diseño experimental	30
2.8.	Factores en estudio	30
2.9.	Tratamientos.....	30
2.10.	Análisis estadístico.....	31
2.11.	Materiales y equipos.....	31
2.12.	Insumos y reactivos.....	32

2.13.	Manejo del experimento	32
2.13.1.	Toma de las muestras del hongo fitopatógeno antracnosis (<i>Colletotrichum sp.</i>)	32
2.13.2.	Preparación del medio de cultivo PDA (Agar Dextrosa de Papa)32	
2.13.3.	Preparación y siembra de las muestras de las plantas de chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>) infectadas con antracnosis (<i>Colletotrichum sp.</i>), en medio PDA.	33
2.13.4.	Análisis microscópico del hongo fitopatógeno antracnosis (<i>Colletotrichum sp.</i>)	33
2.13.5.	Obtención del cultivo puro del hongo fitopatógeno antracnosis (<i>Colletotrichum sp.</i>)	33
2.13.6.	Procedimientos Preliminares para la implementación de los tratamientos.....	34
2.13.7.	Obtención de la disolución de esporas del hongo fitopatógeno previo a realizar el conteo de las UFC	35
2.13.8.	Conteo inicial de esporas (UFC) del hongo fitopatógeno antracnosis (<i>Colletotrichum sp.</i>).....	36
2.13.9.	Preparación del macerado chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>) para obtener los alcaloides.	36
2.13.10.	Obtención del líquido residual del chocho hidratado (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>) para obtener los alcaloides.	37
2.13.11.	Evaluación en condiciones de laboratorio del efecto de los alcaloides del chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>) sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno antracnosis (<i>Colletotrichum sp.</i>).....	37
2.13.12.	Recolección de datos y evaluación del efecto antifúngico de los alcaloides de chocho.....	38
2.13.13.	Conteo final de esporas (UFC) del hongo fitopatógeno antracnosis (<i>Colletotrichum sp.</i>)	39

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
1.1. Evaluación del Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)	40
1.2. Análisis Comparativo de Tratamientos Mediante la Prueba de Tukey al 5% en Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)	41
1.3. Evaluación Comparativa de los Tipos de Aplicación de Alcaloides mediante la Prueba de Tukey al 5% Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM).....	44
1.4. Análisis de la Influencia de la Concentración de Alcaloides mediante la Prueba de Tukey al 5%.....	45
1.5. Análisis mediante la Prueba de Tukey al 5% para técnica de aplicación * concentración.....	48
1.6. Análisis de la Velocidad de Crecimiento Micelial (VCM) según ANOVA	51
1.7. Análisis de la Prueba de Tukey al 5% para Tratamientos en relación a la Velocidad de Crecimiento Micelial	52
1.8. Análisis comparativo mediante la prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación.....	53
1.9. Análisis de la prueba de Tukey al 5% para el tipo de concentración	54
1.10. Análisis de la Prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación por concentración.....	55
1.11. Color del micelio.....	56
1.12. Conteo final de esporas	57
CAPITULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
1.1. CONCLUSIONES	58
1.2. RECOMENDACIONES	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía	8
Tabla 2: Datos climáticos de la localidad	28
Tabla 3. Tratamientos	31
Tabla 4. Esquema del análisis de varianza	31
Tabla 5. Análisis de varianza de Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)	40
Tabla 6. Prueba de Tukey al 5% para tratamientos en el porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)	41
Tabla 7. Prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación de alcaloide en el porcentaje de Inhibición Micelial (% IM).....	44
Tabla 8. Prueba de Tukey al 5% para concentración de alcaloide en el porcentaje de Inhibición Micelial (% IM).....	45
Tabla 9. Prueba de Tukey al 5% para técnica de aplicación * concentración.....	48
Tabla 10. Resultados del análisis de varianza para velocidad del crecimiento Micelial (VCM)	51
Tabla 11. Prueba de Tukey al 5% para tratamientos en la velocidad del crecimiento Micelial (VCM)	52
Tabla 12. Prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación de alcaloide en la velocidad del crecimiento Micelial (VCM).	53
Tabla 13. Prueba de Tukey al 5% para concentración en la velocidad del crecimiento Micelial (VCM)	54
Tabla 14. Prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación por concentración	55
Tabla 15. Cantidad de esporas (UFC).....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de Inhibición micelial en tratamientos.....	43
Figura 2. Porcentaje de Inhibición micelial tipo de aplicación de alcaloides	45
Figura 3. Porcentaje de Inhibición micelial en concentración de alcaloide	47
Figura 4. Porcentaje de Inhibición micelial en técnica de aplicación * concentración de alcaloides.	50
Figura 5. Velocidad del crecimiento Micelial (VCM) en tratamientos	53
Figura 6. Velocidad del crecimiento Micelial (VCM) en tipo de aplicación del alcaloide.	54
Figura 7. Velocidad del crecimiento Micelial (VCM) en concentración del alcaloide	55
Figura 8. Velocidad del crecimiento Micelial (VCM) en técnica de aplicación por concentración.....	56

INFORMACIÓN GENERAL:

Título del Proyecto:	“Evaluación de alcaloides de chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>) para el control de antracnosis (<i>Colletotrichum sp.</i>) en chocho, en condiciones de laboratorio. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021”.
Línea de investigación:	Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.
Proyecto de investigación asociado:	Proyecto de investigación granos andinos – vinculación Maestría en Sanidad Vegetal e Instituto de Investigaciones para el Desarrollo (IRD).
Grupo de Investigación:	Granos andinos.

INTRODUCCIÓN

La antracnosis, causada por el patógeno *Colletotrichum sp*, es una de las enfermedades fúngicas más perjudiciales para una amplia variedad de cultivos en todo el mundo (Carvalho et al., 2016). Esta enfermedad causa una disminución significativa en la productividad y calidad de los cultivos, lo que resulta en pérdidas económicas sustanciales para los agricultores (Baroncelli et al., 2017).

El control de esta enfermedad se ha basado principalmente en el uso de fungicidas químicos. Sin embargo, su uso prolongado y excesivo ha generado resistencia en el patógeno y ha causado problemas ambientales y de salud (Jarrín, 2014). "La emergencia de cepas de patógenos resistentes a los fungicidas y las preocupaciones sobre el impacto ambiental y la seguridad humana han motivado la búsqueda de alternativas más sostenibles y amigables con el medio ambiente para el control de enfermedades" (Bernal Alcocer et al., 2017).

En este contexto, el uso de metabolitos secundarios de plantas como los alcaloides ha ganado interés en el control de enfermedades de plantas debido a su actividad antimicrobiana. Bernal Alcocer et al., (2017) "Los alcaloides son una clase de metabolitos secundarios de plantas que han demostrado tener una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo propiedades antifúngicas".

Lupinus mutabilis Sweet, conocido comúnmente como chocho, es una leguminosa que se cultiva ampliamente en los Andes. Esta planta es conocida por su alto contenido de alcaloides, que han demostrado poseer propiedades antifúngicas. Berti et al., (2013) "Los alcaloides presentes en esta leguminosa han demostrado una capacidad significativa para inhibir el crecimiento de una variedad de hongos patógenos".

Este estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antifúngica de los alcaloides presentes contra *Colletotrichum. sp.* Berti et al., (2013) "La exploración de los alcaloides como antifúngicos podría proporcionar una alternativa sostenible y eficaz a los fungicidas químicos convencionales". Para alcanzar este objetivo, se propone la evaluación de su eficacia antifúngica en ensayos en condiciones de laboratorio contra *Colletotrichum sp.*

Además de los beneficios ambientales y de salud, el uso de alcaloides como agentes antifúngicos puede proporcionar beneficios económicos. Cadena Solis et al., (2020) "La producción de biofungicidas basados en alcaloides podría ofrecer oportunidades para el desarrollo de nuevas industrias y mejorar la economía rural".

Por lo tanto, este estudio podría proporcionar una base para el desarrollo de nuevos métodos de control de enfermedades de plantas más sostenibles y amigables con el medio ambiente, además, los resultados podrían contribuir al conocimiento científico sobre la interacción entre los alcaloides de *L. mutabilis* y los patógenos de las plantas, proporcionando nuevas perspectivas para la investigación futura en esta área.

Justificación

La antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum sp.*, es una enfermedad devastadora que afecta a una variedad de cultivos en todo el mundo, incluyendo el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) (De la Cruz Ricardez et al., 2017). En Ecuador, la antracnosis se ha identificado como una de las principales enfermedades que afectan al cultivo del chocho, comprometiendo la productividad y el rendimiento de los cultivos (Pinto Tafur et al., 2018).

Dado el impacto económico y agrícola de la antracnosis en el chocho, es fundamental investigar nuevas estrategias de control. Las estrategias actuales se basan principalmente en el uso de fungicidas químicos, que pueden tener consecuencias perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana (Bernal Alcocer et al., 2017). Los alcaloides presentes en el chocho podrían representar una alternativa más sostenible y ecológica para el control de la antracnosis.

Varios estudios han demostrado la eficacia antifúngica de los alcaloides de diversas plantas (Freire & Villacreses, 2011), pero hay pocos estudios que evalúen la eficacia antifúngica de los alcaloides de chocho contra *Colletotrichum sp.* La realización de este estudio es pertinente y necesario para proporcionar alternativas sostenibles y efectivas para el control de la antracnosis en el chocho en Ecuador y en otras regiones donde se cultiva esta planta.

En el contexto latinoamericano, hay un creciente interés en la utilización de métodos de control biológico y natural para el manejo de enfermedades de las plantas (Jarrín, 2014). Este estudio podría contribuir a este creciente cuerpo de investigación y ofrecer una solución específicamente adaptada a los desafíos enfrentados por los agricultores de chocho en Ecuador y en toda América Latina.

Planteamiento del problema

El chocho es una leguminosa ampliamente cultivada en las zonas andinas de América del Sur, particularmente en Ecuador. Esta planta es apreciada por su alto contenido proteico y su adaptabilidad a condiciones de suelo y clima adversas, lo que la convierte en una fuente importante de alimento y una contribución significativa a la seguridad alimentaria de la región.

Este patógeno puede provocar pérdidas muy significativas en el rendimiento del cultivo llegando a causar daños en un porcentaje de hasta el 100%, afectando la calidad y cantidad de los granos producidos (Falconi, 2012). A menudo, la infección se presenta como manchas oscuras en las hojas, tallos y frutos, que pueden llevar a la defoliación y muerte de la planta. Esta situación resulta problemática para los agricultores, que dependen del chocho para su sustento, así como para las comunidades que confían en este cultivo como fuente de alimento.

Actualmente, el control de la antracnosis se realiza principalmente a través del uso de fungicidas químicos. Sin embargo, el uso continuado de estos productos puede llevar a problemas ambientales y de salud, tales como la contaminación del suelo y del agua, la resistencia de los patógenos y riesgos para la salud humana. Además, su costo puede ser prohibitivo para muchos agricultores de pequeña escala, limitando su accesibilidad y uso.

Ante esta situación, surge la necesidad de investigar estrategias de control más sostenibles y accesibles para el manejo de la antracnosis en el chocho. Una posible alternativa es el uso de compuestos bioactivos presentes en la misma planta, como los alcaloides. Estos compuestos son producidos por la planta como mecanismos de defensa natural contra diversos patógenos y plagas, y podrían tener potencial para controlar la antracnosis.

Esta investigación permitió evaluar la eficacia de los alcaloides del chocho como una posible alternativa a los fungicidas químicos en el manejo de la antracnosis. Al mismo tiempo, podría contribuir a la sostenibilidad y resiliencia del cultivo del chocho frente a las enfermedades. También tendría el potencial de beneficiar a los agricultores al proporcionar una estrategia de control más accesible y menos perjudicial para la salud y el medio ambiente.

La pregunta central de esta investigación fue: ¿Los alcaloides presentes en *Lupinus mutabilis Sweet* tienen la capacidad de controlar eficazmente la antracnosis causada por *Colletotrichum sp.* en el cultivo de chocho, y por lo tanto, podrían ser una alternativa sostenible a los fungicidas químicos actuales?.

Hipótesis o preguntas de investigación

Ha: Los alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) tienen un efecto significativo en la reducción o inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.*, en condiciones de laboratorio.

Ho: Los alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) no tienen un efecto significativo en la reducción o inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.* En condiciones de laboratorio.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

- Evaluar los alcaloides presentes en *Lupinus mutabilis Sweet* (chocho) por su potencial actividad antifúngica contra *Colletotrichum sp.* (agente causante de la antracnosis), mediante ensayos en laboratorio. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021.

Objetivos Específicos

- Analizar el tipo de control (macerado e hidratado) que sea eficiente en el control de antracnosis bajo condiciones controladas.
- Determinar la concentración con mayor eficiencia en el control de antracnosis.
- Identificar el mejor tratamiento para el control de antracnosis.

CAPÍTULO I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. Lupinus mutabilis Sweet

1.1.1. Origen y distribución

Lupinus mutabilis Sweet es nativo de los Andes de Perú, Bolivia y Ecuador, donde ha sido cultivado y consumido durante siglos. Según estudios arqueológicos, los restos de chocho han sido encontrados en sitios arqueológicos prehispánicos en estas áreas, lo que indica su importancia como alimento básico en la región desde tiempos ancestrales (Condori et al., 2016).

Esta leguminosa ha sido cultivada en diferentes altitudes, desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a los 4.000 metros sobre el nivel del mar. Su capacidad de adaptación a diversas condiciones climáticas y suelos ha contribuido a su distribución en varias regiones andinas. Además, se ha introducido en otras partes del mundo, como Europa, Estados Unidos y Australia, donde se ha evaluado su potencial como cultivo alternativo (Alves Pereira et al., 2020).

Investigaciones recientes han demostrado el valor nutricional de *Lupinus mutabilis Sweet*. Sus semillas son una excelente fuente de proteínas de alta calidad, con un contenido promedio de proteínas de alrededor del 37%. También son ricas en aminoácidos esenciales, como lisina y metionina, lo que las convierte en un complemento ideal para dietas carentes de proteínas de origen animal (Astudillo et al., 2018).

Además de su valor nutricional, también presenta propiedades medicinales. Estudios han demostrado su potencial como agente hipolipemiante, que puede ayudar a reducir los niveles de colesterol en sangre, y como antioxidante, que puede proteger contra el estrés oxidativo y prevenir enfermedades crónicas (Flores et al., 2019).

1.1.2. Importancia económica

Lupinus mutabilis Sweet; ha sido reconocido como un cultivo de interés económico debido a su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones climáticas y suelos. Es una alternativa valiosa para la diversificación de cultivos y puede proporcionar ingresos adicionales a los agricultores. Según un estudio realizado por (Romero et al., 2017) el cultivo de chocho en los andes centrales de Perú ha demostrado ser rentable y ha brindado oportunidades de desarrollo económico para las comunidades locales.

Las semillas de chocho tienen un alto valor comercial debido a su contenido nutricional y su potencial como ingrediente en la industria alimentaria. Se utilizan en la elaboración de harinas, aceites y productos lácteos a base de plantas. Según una investigación realizada por (Pascual et al., 2019), la demanda de este grano y sus productos derivados está en aumento, tanto a nivel nacional como internacional, lo que crea oportunidades comerciales para los productores.

Además de su uso como alimento humano, también tiene aplicaciones en la alimentación animal. Las semillas se utilizan en la producción de piensos para aves de corral y animales de granja debido a su alto contenido de proteínas y aminoácidos esenciales. Estudios realizados por (Sotelo et al., 2020) han demostrado que el uso del chocho como componente en la alimentación animal puede mejorar el rendimiento y la calidad de los productos de origen animal.

La exportación y sus productos derivados también ha generado oportunidades económicas. Países como Bolivia y Perú han comenzado a comercializar el chocho y sus subproductos en el mercado internacional. Un informe de mercado elaborado por la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura

(FAO, 2018) destaca el potencial de *Lupinus mutabilis Sweet* para la exportación y cómo puede contribuir al desarrollo económico de los países productores.

En Ecuador, el chocho ha sido cultivado y consumido desde tiempos prehispánicos. Sin embargo, en los últimos años, ha ganado reconocimiento por su potencial económico debido a su alto contenido de proteínas y otros nutrientes beneficiosos. Se utiliza en la alimentación humana y animal, y también se ha convertido en un ingrediente popular en la industria de alimentos procesados y productos de panificación (Terán et al., 2017).

La demanda de chocho ha aumentado tanto a nivel nacional como internacional. En Ecuador, se ha observado un crecimiento significativo en la producción y comercialización de esta leguminosa, especialmente en las provincias andinas como Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo. Esto ha generado oportunidades económicas para los agricultores y ha contribuido a la diversificación de los sistemas de producción agrícola (Galarza et al., 2019).

La expansión de la industria de chocho en Ecuador también ha generado empleo y ha contribuido al desarrollo rural en las zonas de producción. Muchos agricultores han encontrado en el cultivo y la comercialización de esta leguminosa una fuente de ingresos sostenible y rentable. Además, se han creado empresas dedicadas a la producción, procesamiento y exportación, generando oportunidades para la cadena de valor agrícola (Terán et al., 2017).

1.1.3. Descripción botánica

Tabla 1. Taxonomía

CLASIFICACIÓN	NOMBRE
Reino	Vegetal
Clase	Papilionacea
Subclase	Dicotyledoneace
Orden	Fabácea
Familia	Leguminosae
Género	Lupinus
Especie	Mutabilis
Nombre científico	<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>
Nombres comunes	Chocho, tahuri, tarwi

Raíz:

La raíz se caracteriza por ser pivotante, profundizadora, con nudos nitrificantes que fijan el nitrógeno atmosférico a la planta y pueden extenderse hasta 3 metros, se caracteriza por su estructura ramificada y abundante. Presenta un sistema de raíces laterales que se extienden en diferentes direcciones y forman una red densa en el suelo. Estas raíces laterales se denominan raíces fibrosas y están compuestas por múltiples raicillas delgadas y finas que exploran el suelo en busca de recursos (Rodríguez et al., 2014).

Tallo:

Es generalmente recto y puede alcanzar alturas que varían entre 30 centímetros y 2 metros, dependiendo de las condiciones de cultivo y el ambiente. Es herbáceo, lo que significa que es suave y no lignificado, lo que facilita su crecimiento y flexibilidad (Astudillo et al., 2015).

Hojas:

Las hojas son alternas, lo que significa que se disponen de manera escalonada en el tallo. Cada hoja está compuesta por múltiples folíolos, que son estructuras pequeñas y planas que se asemejan a hojuelas individuales. Los folíolos son de forma ovalada o lanceolada, con bordes lisos o ligeramente dentados, y presentan una textura suave y pilosa en la superficie (Astudillo et al., 2015).

Flor:

Son hermafroditas y se agrupan en inflorescencias racimosas. Estas flores desempeñan un papel fundamental en la reproducción de la planta, albergando órganos masculinos (estambres) y femeninos (carpelos) que permiten la polinización y la formación de frutos y semillas. Además de su función reproductiva, las flores de *Lupinus mutabilis Sweet* tienen un valor ornamental y atraen a polinizadores beneficiosos.

Grano:

Poseen una forma ovalada y de tamaño relativamente grande en comparación con otros granos leguminosos. Presentan una variedad de colores, que van desde el blanco, amarillo, marrón hasta el negro. Los granos presentan dos cotiledones, que son estructuras de almacenamiento de nutrientes que proporcionan la energía necesaria para el crecimiento de una nueva planta (Astudillo et al., 2018).

1.1.4. Valor nutricional

Contienen una excelente fuente de proteínas vegetales de alta calidad. Estudios han demostrado que el contenido promedio de proteínas en los granos de chocho es de alrededor del 37% (Astudillo et al., 2018). Estas proteínas son consideradas de alta calidad debido a su contenido equilibrado de aminoácidos esenciales, incluyendo lisina y metionina (Astudillo et al., 2018).

Además de las proteínas, los granos de chocho son ricos en otros nutrientes esenciales. Son una fuente de fibra dietética, que es importante para la salud digestiva y la regulación del azúcar en la sangre. También contienen vitaminas del complejo B, como tiamina y niacina, que desempeñan un papel crucial en el metabolismo energético y la función cerebral (Alves Pereira et al., 2020).

En cuanto a los minerales, el chocho es una buena fuente de hierro, calcio y fósforo. El hierro es esencial para la formación de glóbulos rojos y el transporte de oxígeno en el cuerpo, mientras que el calcio y el fósforo son importantes para la salud ósea y dental (Astudillo et al., 2018).

Es importante destacar que el chocho también contiene compuestos bioactivos, como polifenoles y fitoesteroles, que pueden proporcionar beneficios para la salud, incluyendo propiedades antioxidantes y potenciales efectos protectores contra enfermedades crónicas (Flores et al., 2019).

1.1.5. Alcaloides de chocho

Es una planta que contiene varios alcaloides en sus diferentes partes, como las semillas, las hojas y las raíces. Estos alcaloides son compuestos químicos que se

encuentran en muchas plantas y pueden tener propiedades farmacológicas y biológicas diversas.

El chocho ha sido objeto de estudios debido a la presencia de alcaloides en sus diferentes partes. Se han identificado varios alcaloides, entre ellos la lupinina, la esparteína, la 13-hidroxi-esparteína y la lupinidina (Astudillo et al., 2015). Estos compuestos presentan posibles propiedades farmacológicas y biológicas.

Uno de los alcaloides más estudiados es la lupinina, se ha demostrado que tiene propiedades antifúngicas y antibacterianas, lo que la convierte en un compuesto prometedor para la investigación de nuevos agentes antimicrobianos (Zhang et al., 2017). También, se ha observado que la lupinina puede tener efectos inhibidores sobre ciertos tipos de células cancerígenas, lo que sugiere un potencial valor terapéutico en la lucha contra el cáncer (Estévez Braun et al., 2017). Se ha encontrado que este alcaloide tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Estudios han demostrado que puede inhibir la producción de ciertas moléculas inflamatorias y reducir el estrés oxidativo en células y tejidos.

La lupinina es un alcaloide que se ha encontrado en las semillas y otras partes de *Lupinus mutabilis Sweet*. Ha mostrado actividad antimicrobiana en estudios de laboratorio (Zhang et al., 2017) llevaron a cabo un estudio en el cual aislaron y purificaron los alcaloides, incluyendo la lupinina, y evaluaron sus actividades antibacterianas y antifúngicas. Los resultados mostraron que la lupinina exhibió una significativa actividad antibacteriana y antifúngica contra varias cepas microbianas. Además de su actividad antimicrobiana, también ha mostrado un potencial efecto anticancerígeno (Estévez Braun et al., 2017). Realizaron investigaciones sobre los alcaloides y evaluaron su actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer. Encontraron que la lupinina exhibía una actividad inhibidora sobre el crecimiento de células cancerígenas, lo que sugiere un posible valor terapéutico en la lucha contra el cáncer.

La esparteína es otro alcaloide presente en el chocho por lo que han descubierto que la esparteína tiene propiedades cardiotónicas y ha sido utilizada tradicionalmente en la medicina herbal para el tratamiento de condiciones cardiovasculares, como la arritmia (Carvalho et al., 2015).

Es un alcaloide quinolizidínico que se encuentra en varias especies de plantas, incluyendo el género *Lupinus*. En *Lupinus mutabilis Sweet*, la esparteína ha sido identificada en diferentes partes de la planta, como las semillas y las hojas (Astudillo et al., 2015).

La esparteína ha sido ampliamente estudiada debido a sus propiedades farmacológicas y su potencial aplicación en el campo de la medicina. Se ha descubierto que la esparteína tiene propiedades cardiotónicas, lo que significa que puede afectar la actividad del corazón. Por esta razón, ha sido utilizada tradicionalmente en la medicina herbal para el tratamiento de afecciones cardiovasculares, como la arritmia (Carvalho et al., 2015). Este alcaloide ha sido estudiado por sus propiedades cardiotónicas y su potencial aplicación en el tratamiento de afecciones cardiovasculares. Además, se han investigado sus posibles efectos anticonvulsivantes, neuroprotectores, antiinflamatorios y analgésicos. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender completamente el potencial terapéutico de la esparteína.

Es importante destacar que, si bien algunos alcaloides han mostrado propiedades biológicas prometedoras en estudios de laboratorio, se requieren más investigaciones para comprender completamente su mecanismo de acción y evaluar su seguridad y eficacia en aplicaciones terapéuticas.

Es importante destacar que la presencia y concentración de alcaloides en *Lupinus mutabilis Sweet* pueden variar dependiendo de factores genéticos, ambientales y de manejo agronómico. Algunas variedades de chocho pueden tener niveles más altos de alcaloides, mientras que otras variedades pueden tener concentraciones más bajas. Por lo tanto, es necesario realizar estudios específicos para determinar los perfiles de alcaloides en las diferentes variedades de chocho y evaluar su impacto en la seguridad alimentaria y la salud humana (Alves Pereira et al., 2020).

1.1.6. Composición de los alcaloides del chocho

Los alcaloides presentes en el chocho pertenecen principalmente al grupo de los alcaloides pirrolizidínicos. Estos compuestos son conocidos por su potencial toxicidad y se han encontrado en varias especies de plantas, incluyendo el chocho.

Los alcaloides pirrolizidínicos son producidos por las plantas como una forma de defensa contra herbívoros y patógenos (Mulder et al., 2018).

La composición específica de los alcaloides pirrolizidínicos en el chocho puede variar dependiendo de factores genéticos, ambientales y de manejo agronómico. Algunos de los alcaloides identificados en el chocho incluyen la senecionina, la senecionina N-óxido, la retrorsina y la retrorsina N-óxido (Boppré et al., 2020).

Los alcaloides pirrolizidínicos presentes en el chocho han sido objeto de preocupación debido a su potencial hepatotóxico. Estos compuestos pueden ser metabolizados en el hígado y dar lugar a metabolitos altamente reactivos que pueden causar daño celular y hepático. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los efectos tóxicos de los alcaloides pirrolizidínicos dependen de la dosis y la exposición prolongada (Mulder et al., 2018).

La identificación y cuantificación de los alcaloides del chocho, es de gran importancia, ya que la toxicidad y el sabor amargo del grano dependen de tipo y proporción de estos componentes. De los alcaloides identificados, la lupanina es el mayor constituyente, pues alcanza el 2,5 % en el grano crudo y el 11,5 % en el extracto. El segundo en importancia es la esparteína y corresponde al 0,32 % en el grano crudo y 2,5 % en el extracto purificado. Otros compuestos como la 3-B-hidroxilupanina y 13-hidroxilupanina y tetrahidrorombifolina, se encuentran en menor cantidad. Este último alcaloide desaparece durante la purificación y concentración del extracto.

1.1.7. Toxicidad de los alcaloides del chocho

Es importante tener en cuenta que la evaluación en laboratorio de los alcaloides de chocho para el control de enfermedades en plantas no implica automáticamente su uso seguro y eficaz en condiciones de campo o su consumo humano directo. Se requiere una evaluación adicional, incluyendo estudios de toxicidad, fitotoxicidad y pruebas en campo, antes de considerar su aplicación práctica en el control de enfermedades de plantas.

Es necesario destacar que, aunque los alcaloides de chocho pueden mostrar actividad contra ciertos patógenos, su uso potencial como agente de control

biológico debe ser cuidadosamente evaluado para minimizar los riesgos asociados con su toxicidad. Además, se requiere más investigación para comprender mejor la eficacia y seguridad de los alcaloides de chocho en el control de enfermedades en plantas (Mulder et al., 2018).

Mediante ensayos de germinación realizados en semilleros y bajo invernadero, se determinó que las soluciones acuosas de alcaloides quinolizidínicos a concentraciones de 1,3; 2,3 y 3,3 %, utilizadas como agua de riego, no afectan la capacidad ni el poder de germinación de las semillas de haba fréjol, cebada y maíz sin embargo el tamaño de las plantas disminuye en función de la concentración de alcaloides.

1.1.8. Propiedades de los alcaloides

Los alcaloides son compuestos orgánicos nitrogenados que se encuentran en diversas plantas y pueden tener propiedades farmacológicas, tóxicas o biológicas. En el caso de la evaluación de los alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para el control de la antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en chocho, es relevante explorar las propiedades de los alcaloides que podrían influir en su actividad contra el patógeno, las propiedades de los alcaloides y su relación con la evaluación en condiciones de laboratorio para el control de la antracnosis en chocho.

Los alcaloides son conocidos por su amplia variedad de propiedades biológicas, como actividad antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena y antiinflamatoria. Estas propiedades pueden estar asociadas con su capacidad para interactuar con diferentes sistemas biológicos, como enzimas, receptores celulares o procesos metabólicos específicos (Cordell, 2013).

En el contexto de la evaluación de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis en chocho, es posible que los alcaloides presentes en esta planta muestren actividad antifúngica contra el patógeno *Colletotrichum sp.* Algunos estudios han demostrado que ciertos alcaloides pueden interferir con el crecimiento y desarrollo de hongos patógenos, inhibiendo su reproducción o dañando sus estructuras celulares (Zhao et al., 2019).

Además de su actividad antifúngica, algunos alcaloides también pueden tener propiedades antioxidantes, lo que podría contribuir a la protección de las plantas contra el estrés oxidativo inducido por la infección de patógenos. Los antioxidantes pueden ayudar a neutralizar los radicales libres y reducir los daños oxidativos en las células (Vieira et al., 2020).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que las propiedades de los alcaloides pueden variar dependiendo de su estructura química, concentración y otros factores. La evaluación in vitro de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis en chocho es una etapa inicial y se requiere una evaluación adicional, incluyendo pruebas en condiciones de campo, para determinar su eficacia y aplicabilidad práctica.

1.1.9. Requerimientos del cultivo

Los requerimientos del cultivo de *Lupinus mutabilis Sweet*, son factores importantes que pueden influir en el crecimiento, desarrollo y producción de la planta. Estos requerimientos pueden tener relación directa con la evaluación de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis en chocho.

Condiciones climáticas: esta planta se adapta a una amplia gama de condiciones climáticas, pero prefiere climas templados a frescos. La temperatura óptima para su crecimiento se encuentra entre los 15°C y 25°C. Sin embargo, temperaturas más altas pueden afectar el rendimiento y la calidad de los granos (Cadena Solis et al., 2020). Es importante considerar las condiciones climáticas adecuadas durante el cultivo de chocho para obtener plantas saludables y resistentes a enfermedades.

Suelo: el chocho se desarrolla mejor en suelos bien drenados y ricos en materia orgánica. Un pH ligeramente ácido a neutro (entre 6 y 7) es óptimo para el crecimiento y desarrollo de la planta. El exceso de humedad y la salinidad pueden ser perjudiciales para el cultivo (Astudillo et al., 2015). Es recomendable realizar análisis de suelo y ajustar las condiciones según las necesidades específicas del chocho.

Agua: requiere un suministro adecuado de agua durante su crecimiento, especialmente durante las etapas de floración y formación de vainas. El riego

regular y adecuado es esencial para obtener buenos rendimientos y evitar estrés hídrico que pueda debilitar la planta y aumentar su susceptibilidad a enfermedades (Astudillo et al., 2015).

Nutrición: el chocho tiene requerimientos nutricionales específicos para un crecimiento saludable. Los nutrientes esenciales, como nitrógeno, fósforo, potasio y micronutrientes, deben estar disponibles en cantidades adecuadas en el suelo. El suministro equilibrado de nutrientes es fundamental para el desarrollo de la planta y la producción de granos de calidad (Astudillo et al., 2015).

1.2. Colletotrichum

1.2.1. Generalidades del patógeno

El patógeno *Colletotrichum sp.* es el agente causal de la antracnosis, una enfermedad que puede afectar al chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) y otras plantas. Para comprender mejor la relación entre la evaluación de los alcaloides de chocho y el control de la antracnosis, es importante conocer algunas generalidades sobre este patógeno.

Colletotrichum sp. es un hongo fitopatógeno que causa la enfermedad conocida como antracnosis en diversas especies vegetales, incluyendo el chocho. Este patógeno puede infectar varias partes de la planta, como hojas, tallos y vainas, y se caracteriza por la formación de lesiones necróticas y la producción de estructuras reproductivas llamadas acérvulos (Ortega, L. M et al., 2020).

La antracnosis causada por *Colletotrichum sp.* puede tener un impacto significativo en la producción de chocho al afectar la calidad y el rendimiento de los granos. Esta enfermedad se propaga principalmente a través de esporas producidas en los acérvulos, que pueden dispersarse por el viento, el agua o los insectos, y pueden infectar nuevas plantas (Carvalho et al., 2016).

El control de la antracnosis en chocho y otras plantas es un desafío importante. Se han utilizado diferentes enfoques para su manejo, incluyendo prácticas culturales, control químico y el desarrollo de estrategias de control biológico. En este contexto, la evaluación de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis en chocho

in vitro puede representar una alternativa prometedora para combatir esta enfermedad.

1.2.2. Hongos del género *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* está compuesto por un grupo diverso de hongos fitopatógenos que causan enfermedades en una amplia variedad de plantas, incluyendo el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). Estos hongos tienen una relación directa con la evaluación de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis en chocho.

Los hongos del género *Colletotrichum* pertenecen a la familia Glomerellaceae y son conocidos por su capacidad para causar enfermedades en plantas, incluyendo la antracnosis. Estos hongos son patógenos necrotróficos, lo que significa que infectan y degradan los tejidos vegetales vivos y muertos (Baroncelli et al., 2017).

Dentro del género *Colletotrichum*, varias especies pueden causar antracnosis en el chocho. Una de las especies más comunes asociadas con esta enfermedad es *Colletotrichum sp.* Este hongo puede infectar diferentes partes de la planta, como hojas, tallos y vainas, y provoca la formación de lesiones necróticas características de la antracnosis (Ortega, L. M et al., 2020).

La evaluación de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis causada por *Colletotrichum sp* en laboratorio implica estudiar la interacción entre los compuestos presentes en el chocho y el hongo patógeno. Se busca determinar si los alcaloides tienen efectos inhibidores sobre el crecimiento y desarrollo del hongo, lo que podría proporcionar una estrategia para controlar la enfermedad.

Es importante mencionar que existen otras especies de *Colletotrichum* que también pueden causar antracnosis en el chocho, como *Colletotrichum truncatum*. Estas especies pueden tener diferencias en cuanto a su patogenicidad y respuesta a los compuestos bioactivos presentes en el chocho. Por lo tanto, es necesario realizar estudios específicos para evaluar la actividad de los alcaloides de chocho contra diferentes especies de *Colletotrichum* que afectan al cultivo.

Los hongos del género *Colletotrichum* son responsables de causar antracnosis en el chocho y otras plantas. Específicamente, *Colletotrichum acutatum* es uno de los

principales agentes causantes de la antracnosis en el chocho. La evaluación de los alcaloides de chocho in vitro implica estudiar la interacción entre los alcaloides y el hongo patógeno, con el objetivo de encontrar estrategias de control de la enfermedad. Sin embargo, es importante considerar la diversidad de especies de *Colletotrichum* y su respuesta a los compuestos bioactivos presentes en el chocho.

1.2.3. Estado anamorfo

El estado anamorfo, también conocido como forma asexual, se refiere a la etapa reproductiva de los hongos en la que se producen esporas asexuales.

Colletotrichum sp., el hongo responsable de la antracnosis en el chocho tiene un ciclo de vida complejo que incluye tanto un estado anamorfo como un estado teleomorfo. El estado anamorfo se conoce como *Glomerella cingulata*. Durante esta etapa, el hongo produce conidios, que son esporas asexuales, para su dispersión y reproducción (Baroncelli et al., 2017).

Los conidios son producidos en estructuras especializadas llamadas acérvulos, que se forman en las lesiones necróticas causadas por el hongo en las plantas. Estas esporas asexuales son liberadas y pueden ser dispersadas por el viento, el agua o a través de vectores biológicos, como insectos o animales (Ortega, L. M et al., 2020).

La evaluación de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis en chocho in vitro implica estudiar el efecto de estos compuestos sobre el desarrollo y reproducción del estado anamorfo de *Colletotrichum sp.* Se busca determinar si los alcaloides tienen alguna actividad inhibidora sobre la producción de conidios y la formación de acérvulos, lo que podría contribuir al control de la enfermedad.

Es importante tener en cuenta que el estado anamorfo de *Colletotrichum sp.* es solo una parte del ciclo de vida completo del hongo. El estado anamorfo de *Colletotrichum sp.*, conocido como *Glomerella cingulata*, es responsable de la producción de conidios y la formación de acérvulos, que son estructuras fundamentales en la reproducción y dispersión del hongo.

1.2.4. Estado teleomorfo

El estado teleomorfo, también conocido como forma sexual, es una etapa reproductiva en el ciclo de vida de los hongos que implica la formación de estructuras sexuales y la producción de esporas sexuales. En el caso de la evaluación de los alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para el control de la antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en chocho in vitro, es relevante comprender el estado teleomorfo de este patógeno.

El estado teleomorfo de *Colletotrichum sp.* el hongo responsable de la antracnosis en el chocho se conoce como *Glomerella cingulata*. Durante esta etapa, el hongo forma estructuras sexuales, como ascos y ascósporas, que son esporas sexuales (Baroncelli et al., 2017).

El estado teleomorfo es una parte importante del ciclo de vida completo de *Colletotrichum sp.* La formación de estructuras sexuales permite la recombinación genética y la producción de esporas sexuales, que pueden desempeñar un papel en la dispersión y la supervivencia del hongo en el ambiente. Sin embargo, en el contexto de la evaluación de los alcaloides de chocho, el enfoque suele ser en el estado anamorfo del hongo debido a su relevancia en la propagación y desarrollo de la antracnosis en chocho (Baroncelli et al., 2017).

1.2.5. Taxonomía del género *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* es un grupo taxonómico de hongos ascomicetos que incluye numerosas especies fitopatógenas, entre ellas, *Colletotrichum sp.* el agente causal de la antracnosis en el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). La taxonomía del género *Colletotrichum* es fundamental para comprender la diversidad y las características de estos patógenos, lo cual es relevante en la evaluación de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis.

El género *Colletotrichum* pertenece a la familia Glomerellaceae y se encuentra dentro de la clase Sordariomycetes. Este género se caracteriza por ser un grupo de hongos fitopatógenos de amplia distribución geográfica que afecta a una gran variedad de plantas cultivadas y silvestres (Baroncelli et al., 2017) .

La taxonomía se basa en múltiples características, incluyendo la morfología de las estructuras asexuales y sexuales, el hospedante específico y la secuencia de ADN. En los últimos años, los avances en la secuenciación del ADN han permitido una mejor comprensión de la diversidad y la clasificación de las especies de *Colletotrichum* (Damm et al., 2019).

La clasificación de las especies se basa en criterios morfológicos y moleculares. La morfología de las estructuras asexuales, como los conidios y los acérvulos, junto con las características de las estructuras sexuales, como los ascos y las ascósporas, se utilizan para la identificación y clasificación preliminar de las especies. Sin embargo, debido a la variabilidad morfológica y la dificultad de distinguir algunas especies, se requiere el análisis de secuencias de ADN para una identificación precisa y confiable (Damm et al., 2019).

1.2.6. Características biológicas del género *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum*, al que pertenece el patógeno *Colletotrichum sp*, presenta una serie de características biológicas que son relevantes para la evaluación de los alcaloides de chocho en el control de la antracnosis en chocho.

El género *Colletotrichum* es un grupo de hongos ascomicetos que se encuentra dentro de la clase Sordariomycetes y la familia Glomerellaceae. Estos hongos fitopatógenos tienen una amplia distribución geográfica y causan enfermedades conocidas como antracnosis en diversos cultivos, incluyendo el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) (Baroncelli et al., 2017).

Una de las características más distintivas es su ciclo de vida complejo, que involucra estados anamorfos y teleomorfos. El estado anamorfo se caracteriza por la producción de estructuras asexuales, como conidios, que son esporas de reproducción asexual. Estas esporas son importantes para la dispersión del hongo y la infección de nuevas plantas. Por otro lado, el estado teleomorfo se caracteriza por la producción de estructuras sexuales, como ascos y ascósporas, que son esporas de reproducción sexual (Baroncelli et al., 2017).

El género *Colletotrichum* presenta una alta variabilidad genética y morfológica, lo que ha llevado a la identificación de numerosas especies y grupos de especies dentro

del género. La identificación precisa de las especies de *Colletotrichum* se basa en características morfológicas, biológicas y moleculares, como la forma y el tamaño de las estructuras asexuales y sexuales, la producción de enzimas y la secuencia de ADN (Damm et al., 2019).

El género *Colletotrichum* se caracteriza por presentar un ciclo de vida complejo con estados anamorfos y teleomorfos. Estos hongos fitopatógenos tienen una alta variabilidad genética y morfológica, lo que ha llevado a la identificación de numerosas especies.

1.3. *Colletotrichum sp.* agente causal de la antracnosis en chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet).

Colletotrichum sp. es el agente causal de la antracnosis en el chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Esta enfermedad fúngica puede afectar gravemente el cultivo de chocho, causando pérdidas significativas en términos de calidad y rendimiento de los granos. Es un hongo fitopatógeno perteneciente al género *Colletotrichum*, familia Glomerellaceae. Este hongo es conocido por su capacidad para infectar una amplia gama de hospedantes, incluyendo el chocho. Causa la antracnosis, una enfermedad caracterizada por la formación de lesiones necróticas en diversas partes de la planta, como hojas, tallos y vainas (Ortega, L. M et al., 2020).

La antracnosis causada por *Colletotrichum sp.* en el chocho puede tener un impacto negativo en la calidad y rendimiento de los granos, afectando la producción agrícola. El hongo puede propagarse a través de esporas producidas en estructuras especializadas llamadas acérvulos, que se forman en las lesiones necróticas. Estas esporas pueden ser dispersadas por el viento, el agua o a través de vectores biológicos, como insectos (Carvalho et al., 2016).

La evaluación de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis causada por *Colletotrichum sp.* en chocho en condiciones de laboratorio implica estudiar los efectos de estos compuestos sobre el hongo. Se busca determinar si los alcaloides tienen actividad inhibidora sobre el crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum sp.*, lo que podría proporcionar una estrategia eficaz para el control de la enfermedad.

1.3.1. Características

Colletotrichum sp. es una especie que se caracteriza por su amplia gama de hospedantes y su capacidad para infectar diversas partes de la planta, incluyendo hojas, tallos y vainas; forma lesiones necróticas en los tejidos vegetales, lo que resulta en la pérdida de calidad y rendimiento del cultivo (Carvalho et al., 2016).

Las características morfológicas incluyen la formación de acérvulos, que son estructuras especializadas que contienen conidios, esporas asexuales del hongo. Estos acérvulos se forman en las lesiones necróticas y permiten la dispersión de las esporas, que pueden ser transportadas por el viento, el agua o vectores biológicos (Ortega, L. M et al., 2020).

La identificación precisa de *Colletotrichum sp.* se basa en técnicas moleculares, como el análisis de secuencias de ADN. Estos enfoques permiten diferenciar de otras especies estrechamente relacionadas y proporcionar información sobre la diversidad genética y la epidemiología del hongo (Baroncelli et al., 2017).

La evaluación de los alcaloides de chocho para el control de la antracnosis causada por *Colletotrichum sp.* en chocho en laboratorio implica estudiar los efectos de estos compuestos sobre el crecimiento y desarrollo del hongo. Se busca determinar si los alcaloides tienen actividad inhibidora, lo que podría proporcionar una estrategia efectiva para el control de la enfermedad. Es importante destacar que puede mostrar variabilidad en su virulencia y resistencia a diferentes compuestos. Por lo tanto, la evaluación de los alcaloides de chocho como potenciales agentes de control debe considerar esta variabilidad y tener en cuenta las condiciones específicas del cultivo y del patógeno.

El, *Colletotrichum sp.* es el agente causal de la antracnosis en el chocho y presenta características morfológicas específicas, como la formación de acérvulos y la producción de conidios.

1.3.2. Taxonomía

Pertenece al género *Colletotrichum*, que se encuentra dentro de la clase Sordariomycetes y la familia Glomerellaceae. Este género comprende un grupo

diverso de hongos fitopatógenos que afectan a una amplia gama de plantas cultivadas y silvestres (Baroncelli et al., 2017).

La taxonomía de *Colletotrichum sp.* se basa en la combinación de características morfológicas, fisiológicas, moleculares y patogénicas. La morfología de las estructuras asexuales, como los conidios y las estructuras sexuales, como los ascos, se utiliza para la identificación preliminar de la especie. Sin embargo, debido a la variabilidad morfológica y a la dificultad de distinguir algunas especies estrechamente relacionadas, el análisis molecular basado en la secuenciación del ADN se ha convertido en un enfoque clave para la identificación precisa de *Colletotrichum sp.* y otras especies del género (Damm et al., 2019).

El análisis de secuencias de ADN de regiones específicas, como el espaciador interno transrito (ITS) y la subunidad grande del ARNr (LSU), ha permitido una clasificación más precisa y la identificación de grupos genéticos dentro de la especie. Esta información molecular es valiosa para el estudio de la diversidad genética, la filogenia y la epidemiología de *Colletotrichum sp.* (Baroncelli et al., 2017).

1.3.3. Signos y Síntomas

La antracnosis causada por *Colletotrichum sp.* en el chocho se manifiesta mediante una serie de signos y síntomas que afectan diferentes partes de la planta. Estos signos y síntomas pueden variar según el estadio de desarrollo de la enfermedad y las condiciones ambientales.

Uno de los signos característicos de la antracnosis es la formación de lesiones necróticas en las hojas, tallos y vainas del chocho. Estas lesiones suelen presentar bordes oscuros y hundidos, rodeados de una zona de tejido decolorado o clorótico. A medida que la enfermedad avanza, las lesiones pueden expandirse y coalescer, provocando la muerte de tejidos y, en casos severos, la defoliación de la planta (Ortega, L. M et al., 2020).

Además de las lesiones necróticas, otros síntomas observados en plantas afectadas por la antracnosis incluyen la presencia de exudados gomosos en las lesiones, la

formación de esporulación en estructuras especializadas llamadas acérvulos, y la aparición de manchas en los granos de chocho.

Es importante destacar que los signos y síntomas de la antracnosis pueden ser influenciados por factores ambientales, como la humedad y la temperatura. Por lo tanto, la evaluación de los alcaloides de chocho debe considerar estas variables para determinar su efectividad en diferentes condiciones de crecimiento.

1.3.4. Epidemiología

Implica el estudio de los factores que influyen en la aparición, la propagación y la severidad de la enfermedad. Estos factores incluyen la presencia del patógeno, las condiciones ambientales favorables para la infección, la disponibilidad de hospedantes susceptibles y la interacción entre estos componentes.

Colletotrichum sp. puede sobrevivir en restos de plantas infectadas, semillas o incluso en otras especies vegetales hospedantes. Los conidios producidos por el hongo pueden ser dispersados por el viento, el agua o a través de vectores biológicos, como insectos o herramientas agrícolas contaminadas. Estos conidios pueden germinar y colonizar tejidos vegetales susceptibles, dando lugar a la infección (Carvalho et al., 2016).

La infección por *Colletotrichum sp.* se ve favorecida por condiciones ambientales óptimas, como alta humedad y temperaturas moderadas. Estas condiciones promueven la germinación de los conidios y el crecimiento del hongo en los tejidos vegetales. Además, las heridas en las plantas causadas por factores abióticos o bióticos, como insectos o enfermedades previas, pueden facilitar la entrada del patógeno (Carvalho et al., 2016).

1.3.5. Nutrición del patógeno

Colletotrichum sp. obtiene los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo a partir de los tejidos vegetales infectados. Este patógeno es capaz de degradar una amplia variedad de componentes presentes en las células vegetales, como carbohidratos, lípidos y proteínas. La capacidad de utilizar diferentes fuentes

de nutrientes es una característica importante que contribuye a la adaptabilidad y supervivencia. (Baroncelli et al., 2017).

La nutrición del patógeno está estrechamente relacionada con su virulencia, ya que la disponibilidad de nutrientes influye en la capacidad de *Colletotrichum sp.* para producir enzimas degradativas y toxinas que contribuyen a la infección y colonización de los tejidos vegetales. Además, la nutrición adecuada también es crucial para el crecimiento óptimo del hongo y la producción de estructuras reproductivas, como los conidios y las estructuras sexuales (Damm et al., 2019).

Es importante destacar que la nutrición de *Colletotrichum sp.* puede ser influenciada por varios factores, como la composición nutricional del tejido vegetal hospedante, las condiciones ambientales y las interacciones con otros organismos en el ecosistema. Por lo tanto, es necesario considerar estos factores al evaluar la efectividad de los alcaloides de chocho como agentes de control de la antracnosis.

1.3.6. Fuentes de inóculo del patógeno

Las principales fuentes de inóculo de *Colletotrichum sp.* en el chocho son los restos de plantas infectadas y los residuos de cultivos anteriores. Los restos de plantas infectadas pueden contener estructuras de resistencia del patógeno, como esclerocios, conidios o estructuras sexuales, que pueden sobrevivir en el suelo o adheridas a la superficie de las semillas (Carvalho et al., 2016).

La presencia de hospedantes alternativos también puede contribuir a la propagación de *Colletotrichum sp.* Este hongo puede infectar y sobrevivir en otras especies vegetales, como malezas o cultivos relacionados. Estas plantas pueden actuar como reservorios de inóculo y contribuir a la persistencia y dispersión del patógeno en el campo (Baroncelli et al., 2017).

Además, *Colletotrichum sp.* también puede ser transmitido por diferentes medios, como el agua de riego, el viento, los insectos o herramientas agrícolas contaminadas. Estos vectores pueden transportar los conidios del hongo y diseminarlos en el campo, facilitando la propagación de la enfermedad (Ortega, L. M et al., 2020).

Se busca determinar si los alcaloides pueden afectar la germinación de los conidios, la colonización de los tejidos vegetales o la producción de estructuras de resistencia del hongo, lo que podría reducir la disponibilidad de inóculo y la incidencia de la enfermedad. Es importante destacar que las fuentes de inóculo pueden variar según las condiciones agroecológicas y las prácticas de manejo del cultivo. Por lo tanto, es necesario considerar estos factores al evaluar la efectividad de los alcaloides de chocho como agentes de control de la antracnosis.

1.3.7. Supervivencia

La supervivencia de este hongo fitopatógeno en el chocho puede ocurrir de diferentes maneras, lo cual influye en la persistencia del patógeno y su capacidad para causar infecciones en temporadas futuras. Algunas de las formas de supervivencia más comunes incluyen:

Restos de plantas infectadas: los restos de plantas infectadas por *Colletotrichum sp.* pueden actuar como fuente de inóculo para la siguiente temporada de cultivo. Los residuos de plantas infectadas pueden contener estructuras de resistencia del patógeno, como conidios, esclerocios o estructuras sexuales, que pueden sobrevivir en el suelo o adheridas a las semillas (Carvalho et al., 2016).

Semillas infectadas: las semillas pueden ser una fuente importante de inóculo de *Colletotrichum sp.* Los conidios del patógeno pueden adherirse a la superficie de las semillas y sobrevivir en su interior. Cuando las semillas germinan, el patógeno puede infectar las plántulas y propagarse en el cultivo (Amil Ruiz et al., 2021).

Hospedantes alternativos: puede infectar y sobrevivir en otras especies vegetales además del chocho. Estas plantas actúan como hospedantes alternativos y pueden contribuir a la persistencia del patógeno en el ambiente. La presencia de hospedantes alternativos amplía el rango de plantas susceptibles y facilita la propagación de la enfermedad (Baroncelli et al., 2017).

Es importante considerar que la supervivencia de *Colletotrichum sp.* puede variar según las condiciones agroecológicas y las prácticas de manejo del cultivo. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta estos factores al evaluar la efectividad de los alcaloides de chocho como agentes de control de la antracnosis. Su supervivencia

se produce a través de restos de plantas infectadas, semillas infectadas y hospedantes alternativos.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Delimitación de la localidad de estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi, ubicada en el sector Salache, en Latacunga, en la Provincia de Cotopaxi, Ecuador.

2.2. Datos climáticos de la localidad

Tabla 2: Datos climáticos de la localidad

Condiciones climatológicas	Salache, Latacunga, Cotopaxi.
Temperatura:	14.2 °C.
Altitud:	2750 a 2822 m.s.n.m.
Precipitación:	
Humedad:	76,6 % al año.
Latitud:	00°59'47,68" N
Longitud:	78°37'19,16" E

Fuente: Jaguaco Cumbajín Ligia Carolina

2.3. Modalidad o enfoque de la investigación

La modalidad o enfoque de esta investigación se orienta bajo el método cuantitativo, caracterizado por la utilización de datos que se evaluó en el análisis estadístico para abordar hipótesis que se planteó; lo que permitió relacionar entre las variables.

2.4. Tipo de investigación

El tipo de investigación que se llevó a cabo en este estudio fue experimental. Esta modalidad de investigación es comúnmente utilizada cuando hay poco conocimiento previo sobre el tema de estudio y se busca comprender mejor el fenómeno de interés, aportar nuevas ideas, y desarrollar hipótesis que puedan ser probadas en futuras investigaciones (Reyes Suárez et al., 2018).

En este caso particular, se realizó un estudio exploratorio para investigar el potencial uso de los alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) como agentes antifúngicos contra la antracnosis (*Colletotrichum sp.*). Aunque existen algunas investigaciones sobre los alcaloides de chocho y sus propiedades bioactivas, aún se sabe poco acerca de su actividad antifúngica y, específicamente, de su efectividad contra *Colletotrichum sp.* (González Teruel & Barrios, 2017).

2.5. Material Genético

El material genético utilizado en esta investigación proviene de dos fuentes principales: las semillas de chocho de la variedad INIAP - 45O ANDINO (*Lupinus mutabilis Sweet*) y la cepa del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum sp.*), recolectada en una localidad de la provincia de Cotopaxi.

2.6. Variables de la investigación

Las variables de la investigación fueron los aspectos o características del estudio que se registraron: Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM), el Color del Micelio (CM) y la Velocidad de Crecimiento Micelial (VCM) (Triola, 2016). A continuación, se detalla cada una de estas variables implica.

- **Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM):** esta variable representa la eficacia de los alcaloides de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para inhibir el crecimiento del hongo *Colletotrichum sp.* Se mide como un porcentaje, siendo el 100% una inhibición total del crecimiento micelial, y el 0% ninguna inhibición. Esta variable es crucial para determinar si los alcaloides del chocho pueden ser efectivos como antifúngicos contra la antracnosis.

- **Color del Micelio (CM):** esta variable se refiere al color del hongo durante su crecimiento. En algunas especies de hongos, el color del micelio puede cambiar en respuesta a ciertos factores, como el estrés o la presencia de sustancias químicas. En este estudio, se podría observar si el tratamiento con alcaloides de chocho provoca algún cambio en el color del micelio de *Colletotrichum sp.* lo que podría indicar una respuesta al tratamiento.
- **Velocidad de Crecimiento Micelial (VCM):** esta variable se refiere a la rapidez con la que el hongo se extiende en el medio de cultivo. Es una medida directa de la tasa de crecimiento del hongo. Al igual que el % IM, la VCM puede ser una indicación de la efectividad de los alcaloides de chocho como agentes antifúngicos. Si la VCM disminuye en presencia de los alcaloides, esto podría indicar que los compuestos están limitando el crecimiento del hongo.

2.7. Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial A*B+2 con 10 tratamientos y tres repeticiones, con un total de 30 unidades experimentales.

2.8. Factores en estudio

- **Factor A: tipos de control**
C1: Macerado
C2: Líquido residual del chocho hidratado
- **Factor B: Concentraciones**
c1: 25%
c2: 50%
c3: 75%
c4: 100%
- **T1: químico**
- **T2: testigo absoluto**

2.9. Tratamientos

La interacción entre los factores en estudio arroja los siguientes tratamientos:

Tabla 3. Tratamientos

Tratamientos	Simbología	Descripción
T1	C1c1	Macerado al 25%
T2	C1c2	Macerado al 50%
T3	C1c3	Macerado 75%
T4	C1c4	Macerado 100%
T5	C2c5	Líquido residual del chocho hidratado al 25%
T6	C2c6	Líquido residual del chocho hidratado al 50%
T7	C2c7	Líquido residual del chocho hidratado al 75%
T8	C2c8	Líquido residual del chocho hidratado al 100%
T9	Tq	Testigo químico
T10	Ta	Testigo absoluto

Fuente: la investigadora

2.10. Análisis estadístico

Tabla 4. Esquema del análisis de varianza

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Total	29
Tratamientos	9
Tipo de aplicación (A)	1
Concentración (C)	3
Tipo de aplicación*Concentración (Ax C)	3
Testigos vs resto de tratamientos	1
Testigo1 vs Testigo2	1
Error	20

Fuente: la investigadora

2.11. Materiales y equipos

El desarrollo de esta investigación requiere una variedad de materiales y equipos que permiten la manipulación y el estudio de los organismos y compuestos implicados de manera segura y eficiente. A continuación, se detalla la lista de los materiales y equipos utilizados: registros, computador, cámara fotográfica, tubos de ensayo, espátula, mascarilla, mechero de Bunsen, autoclave, aza de platino y

mangos bacteriológicos, pinzas, cinta parafilm, cajas Petri, porta objetos y cubre objetos, algodón, matraces, pipetas y probetas, porta tubos, guantes y mandil, puntas de micropipeta, atomizadores, balanza analítica, fundas herméticas, hornilla eléctrica, papel aluminio, agitador magnético, cámara de flujo laminar, papel filtro, vasos de precipitación.

2.12. Insumos y reactivos

Para llevar a cabo la investigación propuesta, se requieren varios insumos y reactivos que permiten la ejecución correcta de cada paso experimental. Los insumos y reactivos para utilizar en la investigación incluyeron: semillas de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), cepa del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum sp.*), agua destilada, medio de cultivo agar, solventes orgánicos, etanol, soluciones nutritivas y tubos de ensayo y placas Petri.

2.13. Manejo del experimento

2.13.1. Toma de las muestras del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum sp.*)

La recolección de las muestras del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum sp.*) se llevó a cabo en un área agrícola ubicada en la provincia de Cotopaxi, en la cual se identificó una población de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) que presentaba signos visibles de la enfermedad de la antracnosis.

Se cortaron partes infectadas de la planta y se almacenaron en bolsas de plástico herméticas para su transporte al laboratorio.

2.13.2. Preparación del medio de cultivo PDA (Agar Dextrosa de Papa)

Se pesó 39 gramos del polvo del medio PDA y se disolvieron en 1000 ml de agua destilada. Esta cantidad se eligió de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante del medio. A continuación, se esterilizó en la autoclave a una temperatura de 121°C y una presión de 1 atmósfera durante 35 minutos.

Tras la esterilización, el medio de cultivo se dejó enfriar a una temperatura que todavía permita su manipulación para ser vertido en las placas Petri.

2.13.3. Preparación y siembra de las muestras de las plantas de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) infectadas con antracnosis (*Colletotrichum* sp.), en medio PDA.

Las muestras de las plantas recolectadas se cortaron en pequeños trozos de 3 a 4 mm². Estos trozos de plantas se esterilizaron mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 4% seguida de etanol (C₂H₅OH) al 75%.

Después de la desinfección de las muestras se enjuagaron en agua destilada dejando reposar durante 5 minutos aproximadamente y se colocaron en las placas de Petri preparadas anteriormente con medio PDA, ubicando 5 muestras por placa. Las placas se sellaron con cinta parafilm para prevenir la contaminación y se rotularon con la fecha y un código correspondiente.

Todo este proceso se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar para proporcionar un entorno de trabajo estéril (Delgado, 2009).

2.13.4. Análisis microscópico del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum* sp.)

Se colocó un pequeño fragmento del micelio del hongo en un portaobjetos microbiológico. Esta muestra representa una sección del cuerpo del hongo, permitiendo la observación de las estructuras individuales que componen el organismo.

Para facilitar la visualización, se añadió una gota de azul de metileno a la muestra del hongo antes de colocar el cubreobjetos.

Una vez preparada la muestra, se procedió a su observación bajo el microscopio. El objetivo de este paso fue identificar y caracterizar las estructuras específicas del hongo, particularmente los conidios y conidióforos.

2.13.5. Obtención del cultivo puro del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum* sp.)

Para realizar este procedimiento, primero se tomó un fragmento de 5mm de radio de agar con micelio desarrollado de las cajas Petri que se habían sembrado al inicio

del ensayo. Esta muestra se seleccionó cuidadosamente utilizando una punta de micropipeta y con la ayuda de un aza esterilizada, se ubicó el fragmento de agar con micelio en el centro de una nueva caja Petri que contenía un medio de cultivo fresco PDA (agar dextrosa de papa).

Este proceso de transferencia se realizó en la cámara de flujo laminar, manteniendo encendido el mechero de bunsen ayudando a mantener el área de trabajo libre de contaminación.

Una vez realizada la transferencia, las cajas Petri se sellaron con cinta parafilm para evitar la contaminación y se rotularon con la fecha y un código correspondiente para llevar un registro preciso del experimento (Ríos, 2010).

2.13.6. Procedimientos Preliminares para la implementación de los tratamientos

Antes de la configuración del experimento principal, se realizó un estudio preliminar para determinar el método más adecuado para la aplicación de los alcaloides derivados del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). Este ensayo implicó la inoculación del hongo patógeno en cajas de Petri que contenían medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa (PDA).

Se aplicaron varias estrategias de aplicación de los alcaloides:

1. Aplicación Directa: Se inoculó directamente 1 cm³ de alcaloide en las cajas Petri que contenían el micelio del hongo.
2. Aplicación Periférica: En otro conjunto de cajas, se aplicó la misma dosis de alcaloides alrededor del fragmento de micelio del hongo.
3. Adición Post-Esterilización: En un tercer conjunto de cajas, el alcaloide se incorporó directamente en el medio PDA después de su esterilización en la autoclave y antes de su solidificación y posterior colocación en las cajas Petri.
4. Adición Pre-Esterilización: Finalmente, en un cuarto conjunto, el alcaloide se añadió directamente al medio PDA antes de la esterilización en la autoclave.

Los resultados preliminares indicaron que el método más eficaz fue la aplicación directa de los alcaloides sobre el fragmento de micelio inoculado en las cajas Petri.

Por lo tanto, se decidió utilizar esta técnica para los ensayos posteriores del estudio principal.

Estos hallazgos preliminares proporcionaron una guía valiosa para la implementación de los tratamientos en el experimento principal, maximizando así la eficacia de los alcaloides en la inhibición del crecimiento del hongo patógeno.

2.13.7. Obtención de la disolución de esporas del hongo fitopatógeno previo a realizar el conteo de las UFC

Antes de iniciar el ensayo, fue esencial estandarizar la carga inicial de esporas (unidades formadoras de colonias, UFC) para mantener la uniformidad en todo el experimento. Para lograr esto, se realizó un conteo de esporas a partir de diez cajas de cultivo puro.

En una cámara de flujo laminar, se lavó cada caja de cultivo que contenía el hongo patógeno inoculado. Para ello, se utilizó agua destilada y con un asa de siembra se realizó un raspado suave, evitando perturbar el agar. Esto resultó en un total de 60 ml de disolución esporal, que se consideró la concentración 100% de la muestra madre.

Para obtener un conteo de esporas preciso y facilitar la visualización en la cámara de Neubauer, se prepararon diluciones a partir de la muestra madre. Para cada una de las diluciones, se agregaron 9 ml de agua destilada a tres tubos de ensayo diferentes.

1. Para el tubo 1, se añadió 1 ml de la muestra madre, logrando una dilución 1:10 o a la -1.
2. Para el tubo 2, se añadió 1 ml de la disolución obtenida del tubo 1, generando una dilución 1:100 o a la -2.
3. Finalmente, para el tubo 3, se añadió 1 ml de la disolución del tubo 2, resultando en una dilución 1:1000 o a la -3.

La disolución a la -3 fue la que se utilizó para el conteo de esporas, ya que esta concentración facilitó la visualización y el conteo de las esporas en la cámara de Neubauer. Este procedimiento aseguró una concentración uniforme de esporas al inicio del experimento.

2.13.8. Conteo inicial de esporas (UFC) del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum sp.*)

El conteo de esporas se realizó con el objetivo de tener un valor referencial similar para la inoculación del agente fitopatógeno en cada unidad experimental al inicio del ensayo, la muestra para el conteo de esporas se obtuvo de la dilución 10^{-3} de la suspensión original de esporas del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum sp.*). La dilución 10^{-3} fue seleccionada porque presenta una menor concentración de esporas, lo que facilita la visualización y conteo de estas.

Para realizar el conteo, se tomó un volumen de 60 microlitros de la dilución de esporas con una micropipeta. Este volumen se seleccionó para asegurar que la muestra sea representativa de la dilución total.

Una vez depositada la muestra en la cámara de Neubauer, se procedió a observarla al microscopio. La observación se realizó en varias regiones de la retícula para asegurar que el conteo fuera representativo de toda la muestra.

Tras la observación y el conteo de esporas, se obtuvo un valor de $7,48 \times 10^8$ esporas. Este valor representa la concentración de esporas en la dilución 10^{-3} , y es el valor con el que se inoculó cada una de las cajas de Petri que se utilizaron en el ensayo.

2.13.9. Preparación del macerado chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) para obtener los alcaloides.

Se pesó 100 g de chocho previamente triturado en un molino tradicional obteniendo trozos no muy pequeños con la finalidad de que no se pulverice el grano con la finalidad de poder desinfecta con etanol al 75% evitando cualquier tipo de contaminación y para quitar el exceso de este se sumergió en agua aproximadamente 5 minutos, a continuación se trituró por completo de manera manual en un mortero hasta lograr una consistencia lo más homogénea posible y se agregó 100 ml de agua destilada, obteniendo así el macerado de chocho (Pullopaxi, 2018). Este macerado se consideró como la concentración del 100%.

Para obtener concentraciones subsecuentes del macerado de chocho, se emplearon las siguientes proporciones:

1. Para la concentración del 25%, se mezclaron 25 ml del macerado con 75 ml de agua destilada.
2. Para la concentración del 50%, se combinaron 50 ml del macerado con 50 ml de agua destilada.
3. Para la concentración del 75%, se unieron 75 ml del macerado con 25 ml de agua destilada.
4. Para la concentración del 100%, se utilizó el macerado original sin diluir.

Finalmente se dejó reposar 24 horas para extraer los alcaloides.

2.13.10. Obtención del líquido residual del chocho hidratado (*Lupinus mutabilis Sweet*) para obtener los alcaloides.

Consistió en la selección y pesaje de 100 gramos de semillas secas de chocho y a continuación se desinfectó con etanol al 4% y para quitar el exceso del mismo se dejó en reposo en agua destilada 5 minutos aproximadamente previo a su hidratación, para ello se utilizó 100 ml de agua destilada y se añadió los 100 gramos de semillas enteras, colocando en un recipiente adecuado y se dejó reposar durante 24 horas para extraer los alcaloides, previo a la aplicación en los tratamientos. de esa manera se obtuvo el líquido residual del chocho hidratado adquiriendo el 100% de la concentración.

Para obtener las concentraciones respectivas mencionadas anteriormente se empleó el mismo proceso del macerado.

2.13.11. Evaluación en condiciones de laboratorio del efecto de los alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum sp.*)

El primer paso en esta evaluación fue la inoculación en las placas de Petri el hongo fitopatógeno utilizando una punta de micropipeta se tomó un fragmento de agar con micelio de 5 mm de diámetro tomados de los cultivos monospóricos en desarrollo y con la ayuda de una aza se inoculó en el centro de las placas de Petri con PDA. (Delgado, 2009).

Tras la inoculación, se aplicaron las diferentes concentraciones 1cm cúbico del macerado y del líquido residual del chocho hidratado sobre el micelio del hongo fitopatógeno. Se evaluaron cuatro concentraciones diferentes tanto con el macerado y el líquido residual del chocho hidratado: 25%, 50%, 75% y 100%. Adicionalmente, se incluyó un testigo químico (una sustancia antifúngica comercial) aplicado según la dosis recomendada por el fabricante, y un testigo absoluto, donde solo se inoculó el hongo y no se aplicó ningún tratamiento.

Una vez aplicados los tratamientos, las placas de Petri se incubaron a una temperatura de 25°C. Esta temperatura fue elegida dado que se ha demostrado que es ideal para el crecimiento de *Colletotrichum sp.* (Mata, 2018).

2.13.12. Recolección de datos y evaluación del efecto antifúngico de los alcaloides de chocho

La evaluación de la eficacia de los alcaloides del chocho contra el hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum sp.*) implicó la recopilación de diversos datos relacionados con el crecimiento y las características del micelio. Este análisis en profundidad permitió una comprensión completa de cómo los alcaloides influyen en el hongo.

- **Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM):** este parámetro proporciona una medición cuantitativa del grado en que los alcaloides inhiben el crecimiento del micelio de *Colletotrichum sp.* Los datos de crecimiento micelial se recopilaban cada 24 horas hasta que el micelio del hongo se desarrolló completamente en las cajas de Petri del testigo absoluto. Para ello, se marcó la caja de Petri en cruz, proporcionando cuatro valores de crecimiento diarios. Los datos se midieron y registraron en milímetros y se aplicó la siguiente fórmula tomando en cuenta que es el inverso del crecimiento, y se calculó de la siguiente manera: % de inhibición = 100 - % de crecimiento del hongo (Arce et al. 2019).
- **Color del Micelio (CM):** esta evaluación se llevó a cabo a través de la observación directa en las cajas de Petri, registrando si existe algún cambio

en el color del micelio cada 24 horas hasta que el micelio del hongo se desarrolló completamente en las cajas del testigo absoluto.

- **Velocidad de Crecimiento Micelial (VM):** finalmente, se valoró la velocidad a la que el micelio se expandió a través del medio de cultivo. Esta métrica se calculó al finalizar la toma de los datos del crecimiento micelial del fitopatógeno. Para ello se manejó la siguiente fórmula:

$$VC = \frac{Df - Di}{Tf - Ti}$$

Donde: VC= velocidad de crecimiento (mm día-1); Df= diámetro final de crecimiento (mm); Di= diámetro inicial de crecimiento (mm); Ti= tiempo inicial de crecimiento (días); Tf= tiempo final de crecimiento (días) (Larios et al. 2019).

2.13.13. Conteo final de esporas (UFC) del hongo fitopatógeno antracnosis (*Colletotrichum sp.*)

Al concluir la recolección de datos experimentales, se llevó a cabo un conteo final de las esporas de *Colletotrichum sp.* en las placas de Petri correspondientes a cada uno de los tratamientos. El propósito de este paso era cuantificar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes al final del experimento.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1. Evaluación del Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)

Tabla 5. Análisis de varianza de Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)

F.V.	gl	TOMA 1			TOMA 2			TOMA 3			TOMA 4			TOMA 5		
		F	p-valor	sig.	F	p-valor	sig.	F	p-valor	sig.	F	p-valor	sig.	F	p-valor	sig.
Tratamientos	9	37,37	0,0001	**	529,96	0,0001	**	1314,8	0,0001	**	552,2	0,0001	**	301,5	0,0001	**
Tipo de aplicación (A)	1	41,02	0,0001	**	2645,5	0,0001	**	5108,6	0,0001	**	2036,2	0,0001	**	424,1	0,0001	**
Concentración (C)	3	41,02	0,0001	**	275,6	0,0001	**	638,6	0,0001	**	250,2	0,0001	**	142,1	0,0001	**
Tipo de aplicación*Concentración (Ax C)	3	41,02	0,0001	**	110,2	0,0001	**	638,6	0,0001	**	250,2	0,0001	**	142,1	0,0001	**
Testigos vs resto de tratamientos	1	8,2	0,0096	**	283,32	0,0001	**	356,1	0,0001	**	142,3	0,0001	**	389,3	0,0001	**
Testigo1 vs Testigo2	1	41,01	0,0001	**	685,18	0,0001	**	2537,58	0,0001	**	1289,0	0,0001	**	1046,9	0,0001	**
Error	20															
Total	29															
CV %		5,02			6,82			6,13			9,17			10,16		

Fuente: La investigadora

De acuerdo al análisis de varianza ANOVA utilizado en este estudio para porcentaje de Inhibición Micelial, en las cinco tomas realizadas se determinó que hubo diferencia altamente significativa para tratamientos, el Factor A (Tipo de aplicación), el Factor C (Concentración) y en las interacciones A x C (Tipo de aplicación*Concentración). Al detectar una diferencia altamente significativa para tratamientos se realizó el cálculo de comparaciones ortogonales, donde se observa diferencia altamente significativa. Los coeficientes de variación fueron de 5,02 % en la primera toma, 6,82% en la segunda toma, 6,13 % en la tercera, 9,17% en la cuarta y 10,16 % en la quinta toma.

Por lo tanto, se concluye que sí son efectivos los tratamientos frente a los testigos ya que los factores y su interacción demostraron diferencias altamente significativas.

1.2. Análisis Comparativo de Tratamientos Mediante la Prueba de Tukey al 5% en Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)

Tabla 6. Prueba de Tukey al 5% para tratamientos en el porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)

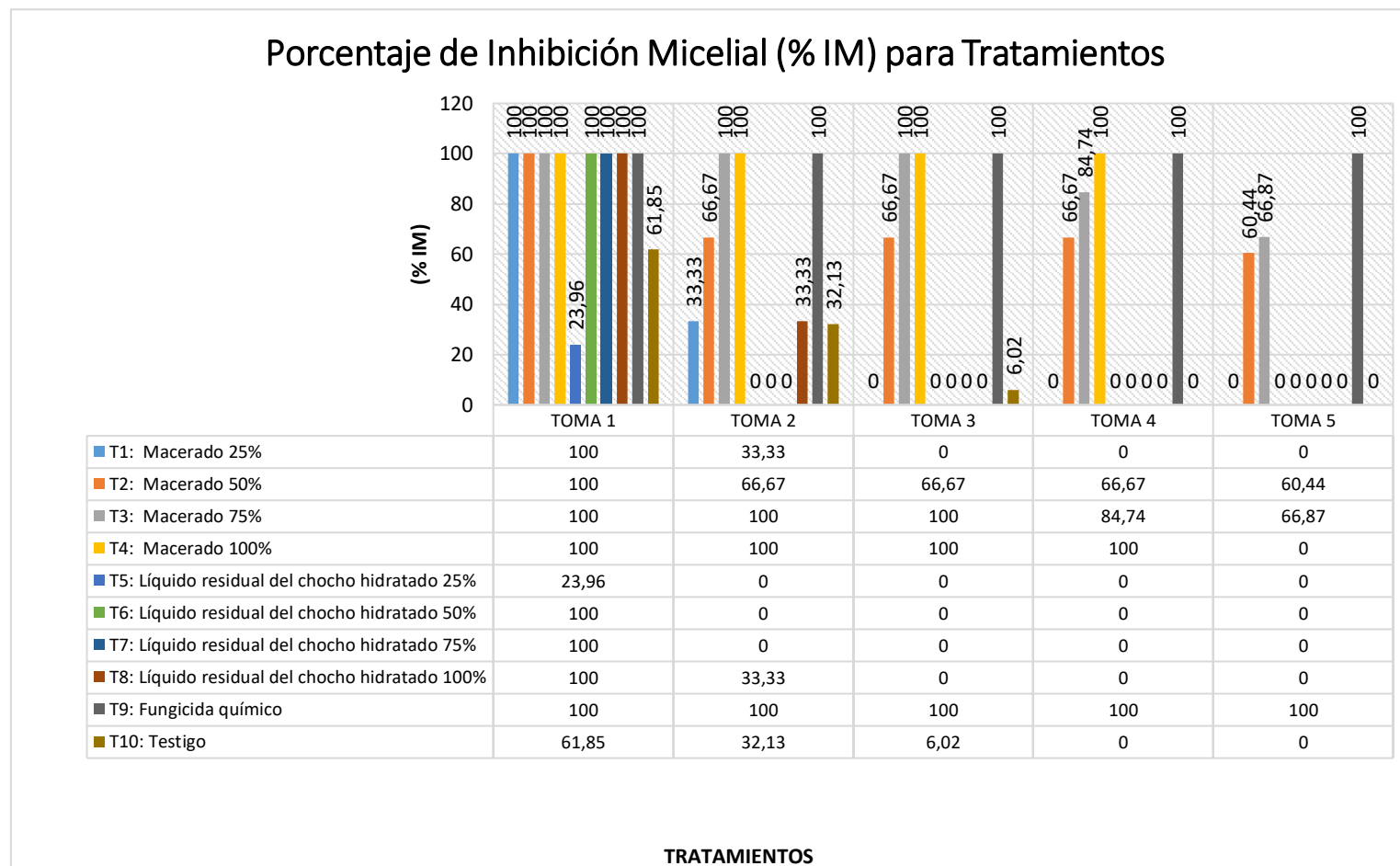
TOMA 1			TOMA 2			TOMA 3			TOMA 4			TOMA 5		
Tratamientos	Medias	Rangos	Tratamientos	Medias	Rangos	Tratamientos	Medias	Rangos	Tratamientos	Medias	Rangos	Tratamientos	Medias	Rangos
T4	100	A	T4	100	A	T4	100	A	T4	100	A	T9	100	A
T9	100	A	T9	100	A	T9	100	A	T9	100	A	T3	66,87	B
T3	100	A	T3	100	A	T3	100	A	T3	84,74	B	T2	60,44	B
T8	100	A	T2	66,67	B	T2	66,67	B	T2	66,67	C	T1	0	C
T1	100	A	T8	33,33	C	T10	6,02	C	T6	0	D	T4	0	C
T2	100	A	T1	33,33	C	T8	0	C	T5	0	D	T8	0	C
T6	100	A	T10	32,13	C	T7	0	C	T1	0	D	T7	0	C
T7	100	A	T5	0	D	T6	0	C	T8	0	D	T5	0	C
T10	61,85	B	T6	0	D	T5	0	C	T7	0	D	T6	0	C
T5	23,69	C	T7	0	D	T1	0	C	T10	0	D	T10	0	C

Fuente: La investigadora

En el análisis de varianza (ADEVA) se detectó diferencias significativas en tratamientos y al efectuar la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) se encontró que existe diferencias significativas entre los tratamientos en la primera, segunda, tercera y cuarta toma el T4 (Alcaloides macerado al 100%) se ubica en el primer lugar con mayor inhibición micelial con valores de 100 % y en segundo lugar se encuentra el T9 (Fungicida químico: Testigo) con 100 % de inhibición.

Mientras que en la quinta toma se encuentra ejerciendo mayor inhibición el T9 (Fungicida químico: Testigo) con 100 %, seguido del T3 (Alcaloides macerado al 75%) con 66,87 %, y en tercer lugar el T2 (Alcaloides macerado al 50 %) con 60,44%. Los demás tratamientos incluido el testigo absoluto presentaron 0% de efecto inhibitorio. (Figura 1). Estos datos se corroboran con Zhang, Yang, Liu, & Gu, (2017) quien afirma la presencia de alcaloides en el chocho y que uno no de los alcaloides más estudiados en *Lupinus mutabilis sweet* es la lupinina, presentando propiedades antifúngicas y antibacterianas, lo que la convierte en un compuesto prometedor para la investigación de nuevos agentes antimicrobianos. Berti et al., (2013) señala que "los alcaloides presentes en *L. mutabilis* han demostrado una capacidad significativa para inhibir el crecimiento de una variedad de hongos patógenos".

Figura 1. Porcentaje de Inhibición micelial en tratamientos



Fuente: La investigadora

1.3. Evaluación Comparativa de los Tipos de Aplicación de Alcaloides mediante la Prueba de Tukey al 5% Porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)

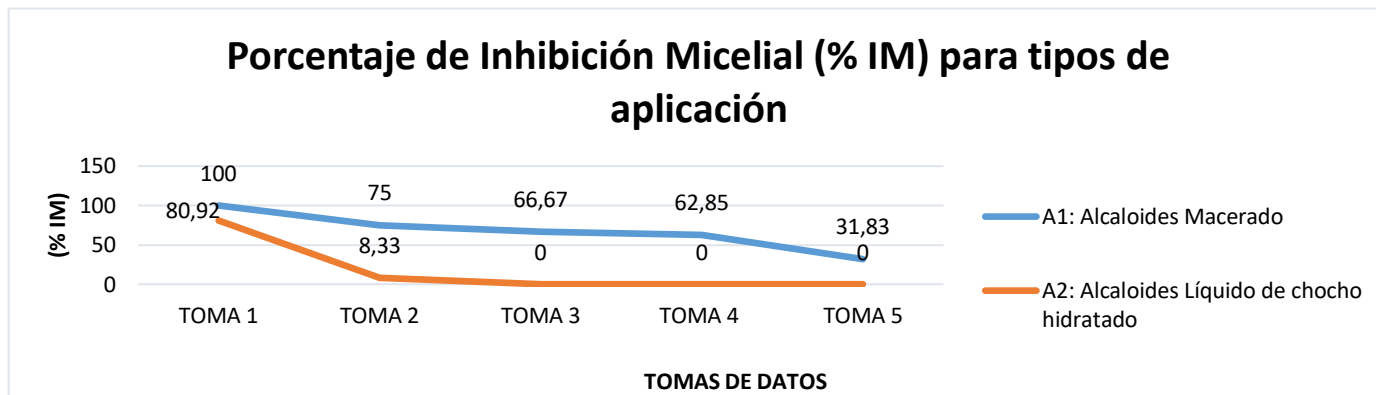
Tabla 7. Prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación de alcaloide en el porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)

1	TOMA		TOMA 2		TOMA 3		TOMA 4		TOMA 5	
	Media	Rangos	Media	Rangos	Media	Rangos	Media	Rangos	Media	Rangos
Tipo de control										
A1: Alcaloides macerado	100	A	75	A	66,67	A	62,85	A	31,83	A
A2: Alcaloides líquido residual del chocho hidratado	80,92	B	8,33	B	0	B	0	B	0	B

Fuente: La investigadora

A partir de la prueba de Tukey, en la primera, segunda, tercera y cuarta toma se encontró que los tipos de aplicación del alcaloide se comportaron de diferente manera. El alcaloide macerado (A1) presentó mejor inhibición con valores de 100; 75; 66,67; 62,85 y 31,83 % y se ubicó en el rango A, mientras que el Alcaloide hidratado (A2) no fue efectivo en la inhibición micelial con valores de 80,92; 8,33 y 0 % correspondientemente y se ubicó en el rango B. Gutiérrez et. al (2016) señala que al probar el líquido residual del chocho en larvas no tuvo efecto en su mortalidad, solo redujo la alimentación; demostrando que los alcaloides del líquido residual no tienen mayor efecto insecticida lo cual permite comparar con este trabajo que también tuvo poco efecto fúngico inhibitorio.

Figura 2. Porcentaje de Inhibición micelial tipo de aplicación de alcaloides



Fuente: La investigadora

1.4. Análisis de la Influencia de la Concentración de Alcaloides mediante la Prueba de Tukey al 5%

Tabla 8. Prueba de Tukey al 5% para concentración de alcaloide en el porcentaje de Inhibición Micelial (% IM)

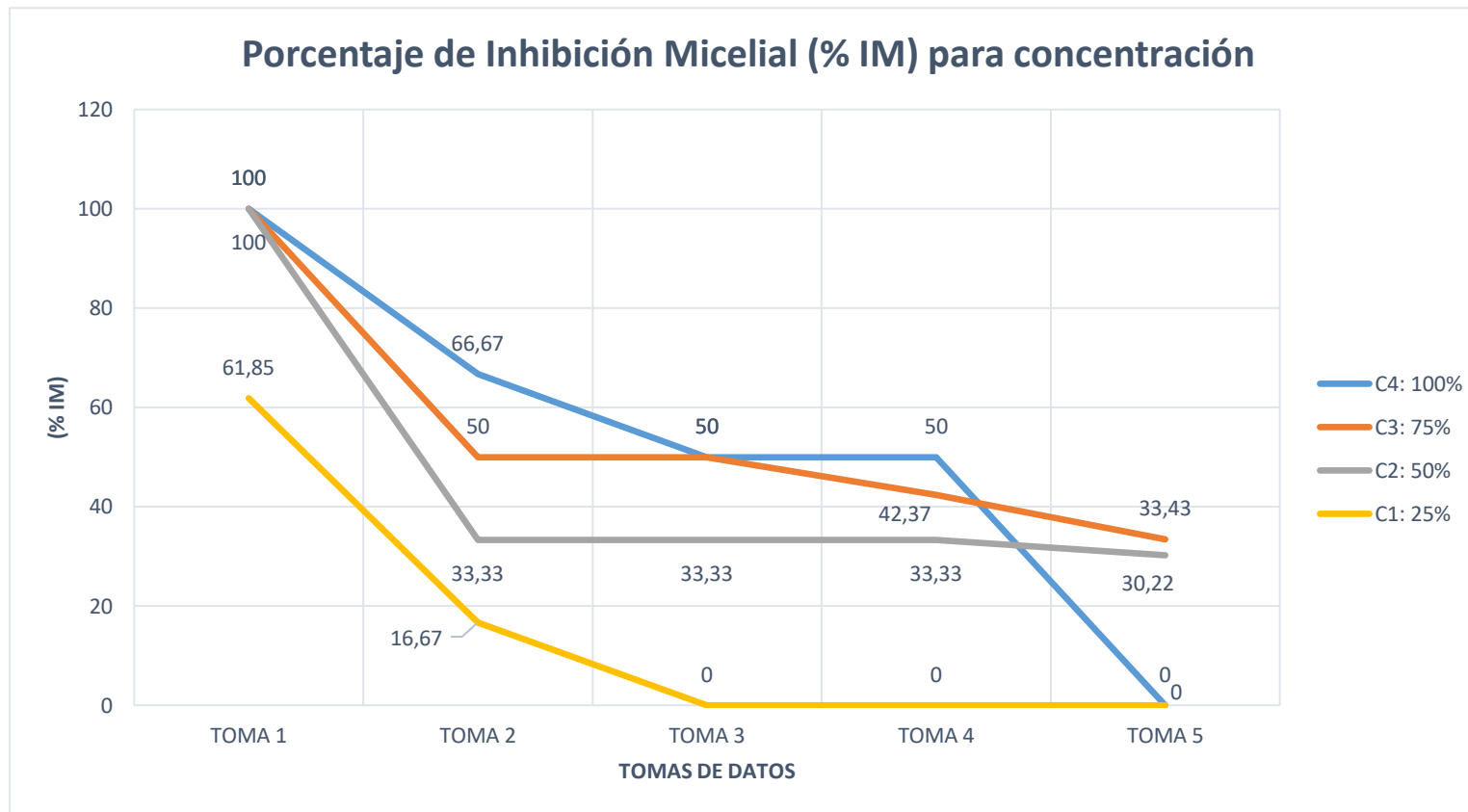
TOMA 1			TOMA 2			TOMA 3			TOMA 4			TOMA 5		
Concet.	Med.	Rang.	Concent	Med.	Rang.	Concent.	Med.	Rang.	Concent.	Med.	Rang.	Concent.	Med.	Rang.
C4: 100%	100	A	C4: 100%	66,67	A	C4: 100%	50	A	C4: 100%	50	A	C3: 75%	33,43	A
C3: 75%	100	A	C3: 75%	50	B	C3: 75%	50	A	C3: 75%	42,37	B	C2: 50%	30,22	A
C2: 50%	100	A	C2: 50%	33,33	C	C2: 50%	33,33	B	C2: 50%	33,33	C	C1: 25%	0	B
C1: 25%	61,85	B	C1: 25%	16,67	D	C1: 25%	0	C	C1: 25%	0	D	C4: 100%	0	B

Fuente: La investigadora

Según la prueba de Tukey para concentración se encontró que la concentración del alcaloide se comportó de diferente manera. En la primera, segunda, tercera y cuarta toma la concentración C4 (100%) fue la que obtuvo mayor inhibición con valores de 100; 66,67 y 50 % correspondientemente y se ubicó en el rango A.

Mientras que en la quinta toma se encuentra ejerciendo mayor inhibición la concentración C3 (75 %) con 33,43 %, seguido del C2 (50 %) con 30,22 % ubicándose en el rango A, y las demás concentraciones presentaron 0% de efecto inhibitorio. (Figura 3). Con lo que se puede explicar que con dosis alta y baja se presenta menor inhibición y a dosis intermedias la inhibición micelial es mejor. Rivelino (2022) señala que la concentración del 30 % de alcaloides tiene un mejor efecto biocida después de 48 horas de su aplicación en comparación con concentraciones más bajas; (Tapia, 2015) ratifica que los alcaloides pueden contribuir favorablemente a la agricultura.

Figura 3. Porcentaje de Inhibición micelial en concentración de alcaloide



Fuente: La investigadora

1.5. Análisis mediante la Prueba de Tukey al 5% para técnica de aplicación * concentración

*Tabla 9. Prueba de Tukey al 5% para técnica de aplicación * concentración*

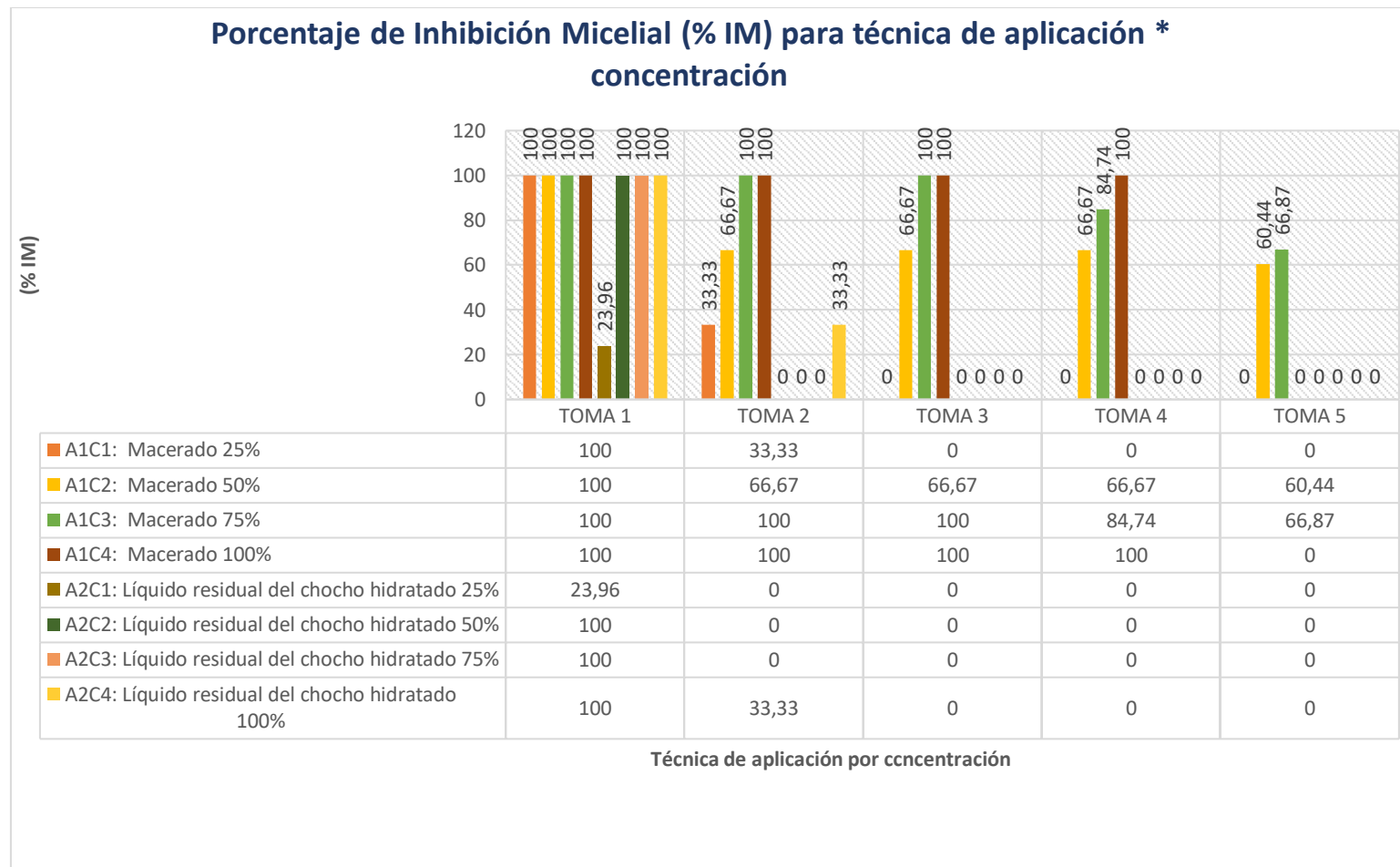
TOMA 1			TOMA			TOMA 3			TOMA 4			TOMA 5		
AXC	Med.	Rang.	AXC	Med.	Rang.	AXC	Med.	Rang.	AXC	Med.	Rang.	AXC	Med.	Rang.
T4: A1C4	100	A	T4: A1C4	100	A	T4: A1C4	100	A	T4: A1C4	100	A	T3: A1C3	66,87	A
T3: A1C3	100	A	T3: A1C3	100	A	T3: A1C3	100	A	T3: A1C3	84,74	B	T2: A1C2	60,44	A
T8: A2C4	100	A	T2: A1C2	66,67	B	T2: A1C2	66,67	B	T2: A1C2	66,67	C	T1:A1C1	0	B
T1: A1C1	100	A	T8: A2C4	33,33	C	T8: A2C4	0	C	T6: A2C2	0	D	T4: A1C4	0	B
T2: A1C2	100	A	T1: A1C1	33,33	C	T7: A2C3	0	C	T5: A2C1	0	D	T8: A2C4	0	B
T6: A2C2	100	A	T5: A2C1	0	D	T6: A2C2	0	C	T1: A1C1	0	D	T7: A2C3	0	B
T7: A2C3	100	A	T6: A2C2	0	D	T5: A2C1	0	C	T8: A2C4	0	D	T5: A2C1	0	B
T5: A2C1	23,69	B	T7: A2C3	0	D	T1: A1C1	0	C	T7: A2C3	0	D	T6: A2C2	0	B

Fuente: la investigadora

Según el análisis de varianza (ADEVA) se detectó diferencias significativas para las interacciones. En la primera, segunda, tercera y cuarta toma A1C4 (Alcaloides macerado al 100%) se ubica en el primer lugar con mayor inhibición micelial con valores de 100 % Ubicándose en el rango A, el resto de las interacciones presento menor efecto inhibitorio y se ubicando en rango inferiores.

En la quinta toma se encuentra ejerciendo mayor inhibición A1C3 (Alcaloides macerado al 75%) con 66,87 %, seguido de A1C2 (Alcaloides macerado al 50 %) con 60,44% ubicándose en el rango A. Las demás interacciones presentaron 0% de efecto inhibitorio y se ubicaron en el rango B.

Figura 4. Porcentaje de Inhibición micelial en técnica de aplicación * concentración de alcaloides.



Fuente: la investigadora

1.6. Análisis de la Velocidad de Crecimiento Micelial (VCM) según ANOVA

De acuerdo al análisis de varianza ANOVA utilizado en este estudio para la velocidad del crecimiento micelial, se determinó que hubo diferencia altamente significativa para tratamientos, el Factor A (Tipo de aplicación), el Factor C (Concentración) y en las interacciones A x C (Tipo de aplicación*Concentración), debido a que se presentó significancia para tratamientos se realizó dos comparaciones ortogonales los cuales presentan diferencia altamente significativa, lo que manifiesta que los tratamientos frente a los testigos, se comportan de distinta manera y el testigo 1 (Fungicida químico) presenta superioridad frente al testigo 2 (testigo absoluto). El coeficiente de variación de 5,11 %.

Tabla 10. Resultados del análisis de varianza para velocidad del crecimiento Micelial (VCM)

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamientos	9	643,22	71,47	149,2	0,000	*
				3	1	*
Tipo de aplicación (A)	1	15,24	15,24	31,75	0,000	*
					1	*
Concentración (C)	3	83,96	27,99	58,31	0,000	*
					1	*
Tipo de aplicación*Concentración (AxC)	3	311,64	103,8	216,4	0,000	*
			8	2	1	*
Testigos vs resto de tratamientos	1	142,73	142,7	298,0	0,000	*
			3	3	1	*
Testigo1 vs Testigo2	1	89,65	89,65	187,1	0,000	*
				9	1	*
Error	20	9,58	0,48			
Total	29	652,8				
CV %	5,11					

Fuente: La investigadora

1.7. Análisis de la Prueba de Tukey al 5% para Tratamientos en relación a la Velocidad de Crecimiento Micelial

Tabla 11. Prueba de Tukey al 5% para tratamientos en la velocidad del crecimiento Micelial (VCM)

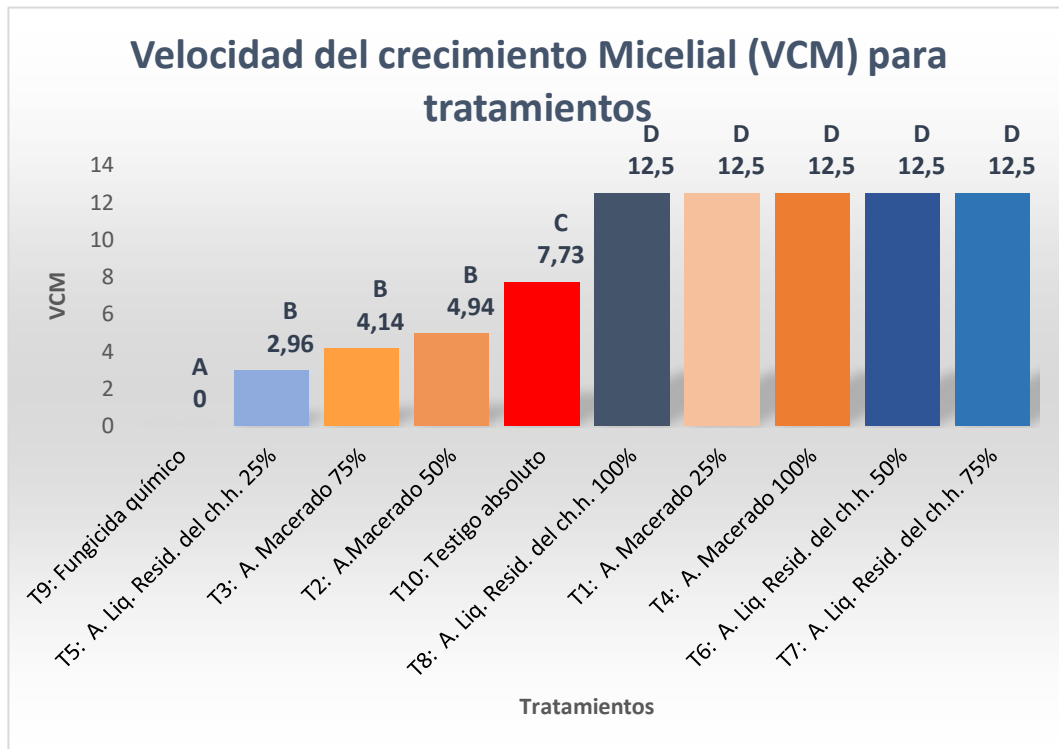
Tratamientos	Medias	Rangos
T9: Fungicida químico	0	A
T5: A. Líquido residual del chocho hidratado 25%	2,96	B
T3: A. Macerado 75%	4,14	B
T2: A. Macerado 50%	4,94	B
T10: Testigo absoluto	7,73	C
T8: A. Líquido residual del chocho hidratado 100%	12,5	D
T1: A. Macerado 25%	12,5	D
T4: A. Macerado 100%	12,5	D
T6: A. Líquido residual del chocho hidratado 50%	12,5	D
T7: A. Líquido residual del chocho hidratado 75%	12,5	D

Fuente: La investigadora

Según la prueba de Tukey se encontró que todos los tratamientos se comportaron de diferente manera. Sin embargo, el que mostro menor velocidad del crecimiento Micelial fue el T9 (Fungicida químico) con un valor de 0 seguido de T5 (Alcaloide macerado al 25%) correspondiente a valores de 2,96 el resto de tratamientos incluido el testigo absoluto presentaron mayor velocidad de crecimiento micelial. (Carvalho et al., 2016).

La antracnosis causada por *Colletotrichum sp.* puede tener un impacto significativo en la producción de chocho al afectar la calidad y el rendimiento de los granos. Esta enfermedad se propaga principalmente a través de esporas que pueden dispersarse por el viento, el agua o los insectos, y pueden infectar nuevas plantas (Carvalho et al., 2016).

Figura 5. Velocidad del crecimiento Micelial (VCM) en tratamientos



Fuente: La investigadora

1.8. Análisis comparativo mediante la prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación

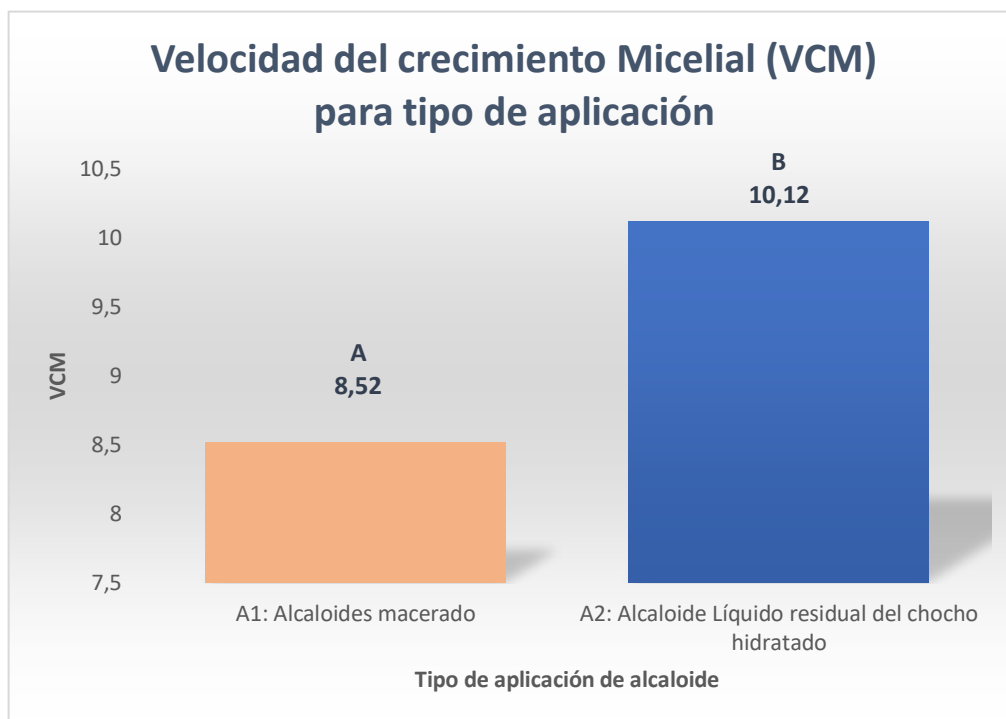
Tabla 12. Prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación de alcaloide en la velocidad del crecimiento Micelial (VCM).

Tipo de control	Media	Rangos
A1: Alcaloides macerado	8,52	A
A2: Alcaloides L. residual del chocho hidratado	10,12	B

Fuente: La investigadora

A partir de la prueba de Tukey se determinó que el tipo de aplicación de alcaloide mostró diferencia. Mostrando menor velocidad del crecimiento Micelial el alcaloide macerado (A1) con un valor de 8,52 ubicándose en el rango A, seguido de alcaloide del líquido de chocho hidratado con 10,12 que presento mayor velocidad de crecimiento micelial el cual se ubicó en el rango B.

Figura 6. Velocidad del crecimiento Micelial (VCM) en tipo de aplicación del alcaloide.



Fuente: La investigadora

1.9. Análisis de la prueba de Tukey al 5% para el tipo de concentración

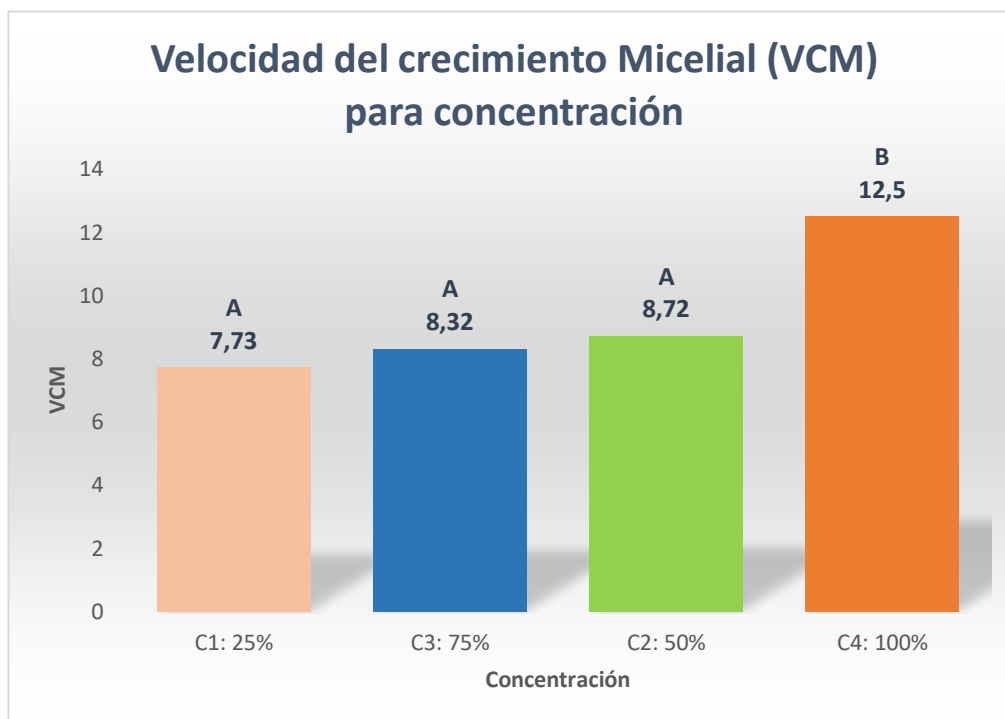
Tabla 13. Prueba de Tukey al 5% para concentración en la velocidad del crecimiento Micelial (VCM)

Concentraciones	Medias	Rangos
C1: 25%	7,73	A
C3: 75%	8,32	A
C2: 50%	8,72	A
C4: 100%	12,5	B

Fuente: La investigadora

Según la prueba de Tukey se encontró que todas las concentraciones actuaron de diferente manera. Sin embargo, el que mostro menor velocidad del crecimiento micelial fue C1 (25%) con un valor de 7,73 ubicándose en el rango A, seguido de C3 (75 %) con 8,32, en tercer lugar, se presenta C2 (50%) con 8,72 y en último lugar C4 (100%) con 12,5 de velocidad de crecimiento micelial.

Figura 7. Velocidad del crecimiento Micelial (VCM) en concentración del alcaloide



Fuente: La investigadora

1.10. Análisis de la Prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación por concentración

Tabla 14. Prueba de Tukey al 5% para tipo de aplicación por concentración

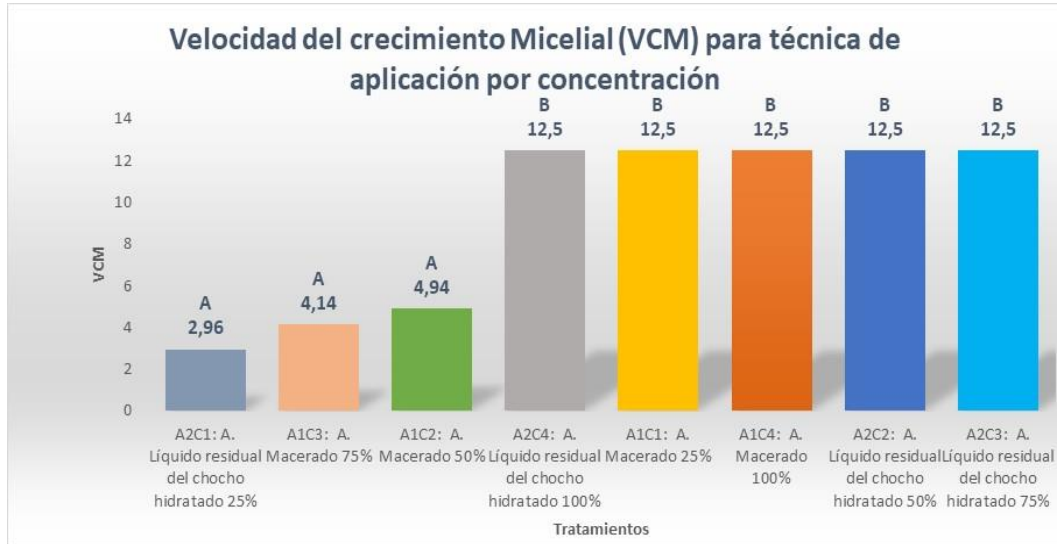
Tratamientos	Medias	Rangos
A2C1: A. Hidratado 25%	2,96	A
A1C3: A. Macerado 75%	4,14	A
A1C2: A. Macerado 50%	4,94	A
A2C4: A. Hidratado 100%	12,5	B
A1C1: A. Macerado 25%	12,5	B
A1C4: A. Macerado 100%	12,5	B
A2C2: A. Hidratado 50%	12,5	B
A2C3: A. Hidratado 75%	12,5	B

Fuente: La investigadora

Según la prueba de Tukey se encontró que todas las interacciones se comportaron de diferente manera. Sin embargo, el que mostro menor velocidad del crecimiento Micelial fue A2C1 (Alcaloide hidratado al 25%) con un valor de 2,96 ubicándose

en el rango A el resto de los tratamientos presentaron mayor velocidad de crecimiento micelial.

Figura 8. Velocidad del crecimiento Micelial (VCM) en técnica de aplicación por concentración.



Fuente: La investigadora

1.11. Color del micelio

No se llevó a cabo un análisis estadístico en esta variable, ya que no se observó variaciones en el color del micelio en ninguno de los tratamientos hasta el día 10 que se desarrolló campo lleno en las cajas petri del testigo absoluto, por lo tanto, se finalizó la toma de datos en el décimo día.

Inicialmente la colonia de *Colletotrichum sp.* es cremosa y de color salmón emitiendo un micelio blanco en los bordes, este hongo fitopatógeno alcanza su desarrollo micelial posterior a los 15 días (Bailey y Jeger, 1992).

1.12. Conteo final de esporas

Tabla 15. Cantidad de esporas (UFC)

Conteo Inicial	Conteo final
7,48	T9: Fungicida químico 0
	T8: Líquido residual del chocho hidratado 100% 1,61
	T10: Testigo absoluto 3,3
	T7: Líquido residual del chocho hidratado 75% 3,44
	T1: Macerado 25% 3,77
	T2: Macerado 50% 3,87
	T4: Macerado 100% 3,92
	T3: Macerado 75% 5,08
	T5: Líquido residual del chocho hidratado 50% 5,32
	T6: Líquido residual del chocho hidratado 50% 8,11

Fuente: La investigadora

CAPITULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.1. CONCLUSIONES

- De acuerdo con los ensayos in vitro realizados, los alcaloides de las 4 concentraciones del macerado de *Lupinus mutabilis Sweet* mostraron potencial en la inhibición de *Colletotrichum sp.* a las 48h de haber tomado los datos en comparación con los alcaloides del hidratado.
- Se determinó que la concentración del 50% del macerado en la quinta toma el porcentaje de inhibición fue de un 60.44%; y la concentración al 75% tubo un porcentaje de inhibición del 66.87%. Este hallazgo respalda el segundo objetivo específico y demuestra que estos compuestos podrían utilizarse para el desarrollo de tratamientos antifúngicos naturales en la agricultura.
- Se identificó al T 2 y 3 como los mejores tratamientos en el control o inhibición para la antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en *Lupinus mutabilis Sweet* hasta la cuarta toma de datos (8 días), posteriormente pierde su poder inhibitorio no así el T 2 y 3.
- A nivel general, la evaluación de los alcaloides presentes en *Lupinus mutabilis Sweet* resaltó su potencial actividad antifúngica contra *Colletotrichum sp.* Estos resultados cumplen con el objetivo general del estudio y destacan el chocho como una fuente viable de compuestos antifúngicos.

1.2. RECOMENDACIONES

- Los resultados de la investigación mostraron que los alcaloides presentes en *Lupinus mutabilis Sweet* (chocho) poseen una potente actividad antifúngica contra *Colletotrichum sp.* Por lo tanto, es recomendable llevar a cabo estudios adicionales que se centren en el mecanismo de acción de estos alcaloides, para entender cómo interfieren con el crecimiento y desarrollo del hongo. Estos estudios podrían dar lugar a optimizaciones en la forma de aplicación de estos alcaloides como agentes antifúngicos.
- Los ensayos in vitro han demostrado la efectividad antifúngica de los alcaloides. Sin embargo, se recomienda llevar a cabo estudios de validación en campo para confirmar su efectividad en condiciones de cultivo reales. Este trabajo permitiría evaluar la practicidad de la aplicación de los alcaloides en el manejo de la antracnosis y otras enfermedades fúngicas en diversos cultivos.
- A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se propone investigar la elaboración de formulaciones de biopesticidas que utilicen los alcaloides de *Lupinus mutabilis Sweet*. Estas formulaciones podrían ser una alternativa ecológica y sostenible a los pesticidas químicos convencionales.
- Se sugiere ampliar el espectro de los ensayos antifúngicos para incluir otros patógenos de importancia agrícola. Esto permitirá conocer la gama de hongos que pueden ser controlados por los alcaloides de chocho y ampliaría su potencial uso en la agricultura.
- Se recomienda realizar un estudio que evalúe la sostenibilidad y la viabilidad económica de la producción y uso de estos alcaloides en el control de enfermedades fúngicas en cultivos. Esto proporcionará una visión más completa de la practicidad de estos compuestos en la agricultura a gran escala.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves Pereira, A., Ferreres, F., & Pereira, D. M. (2020). *Lupinus mutabilis* Sweet a review on its potential as an alternative crop. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 17.
- Amil Ruiz, F., Melgarejo, P., De Cal, A., Jiménez Díaz, R. M., & Castillo, P. (2021). Detection of *Colletotrichum acutatum* as an Endophyte and Seedborne in *Lupinus mutabilis*. *Journal of Fungi*, 7(1), 27.
- Arce Araya, C., Varela Benavides, I., & Torres Portuguez, S. (2019). Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame. *Agronomía Mesoamericana*, 381-393.
- Astudillo, C., Luna, R., & Uga, V. (2015). Estudio de la raíz de *Lupinus mutabilis* Sweet en diferentes alturas y regiones del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 22(2), 155-160.
- Astudillo, C., Luna, R., & Uga, V. (2018). Amino acid profile and protein quality of tarwi (*Lupinus mutabilis*) seeds. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(3), 265-273.
- Bailey, J. y Jeger, M. 1992 *Colletotrichum* biology, Pathology and control. Red Wood Press London, England p 388.
- Baroncelli, R., Zapparata, A., Sarrocco, S., Sukno, S., & Lane, C. (2017). *Colletotrichum*: species complexes, lifestyles, and peculiarities of some sources of genetic variability. *Studies in mycology*, 86, 861-30.
- Bernal Alcocer, A., Zamora Natera, J. F., Virgen Calleros, G., & Nuño Romero, R. (2017). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Lupinus* spp. sobre Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 140-146.
- Berti, P., Villacrés, E., Segovia, G., Mazón, N., & Peralta, E. (2013). *Lupinus mutabilis* Sweet, a traditional Ecuadorian grain: Fatty acid composition, use in the Ecuadorian food system, and potential for reducing malnutrition. *Journal of Agricultural Science*, 2(6), 153-159.

- Boppré, M., Colegate, S., Edgar, J., Fischer, O., Gregory, L., Hötling, S., & Weißflog, I. (2020). Pyrrolizidine Alkaloids: Still a Threat to Health. *Toxins*, 12(12), 772.
- Cadena Solis, M., Pinos Rodriguez, J., & Salazar Valenzuela, D. (2020). Identificación de oportunidades de mercados internacionales para el tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) de la Sierra Centro del Ecuador. *Revista ESPOL*, 41(2), 37-45.
- Carvalho, C., Almeida, P., & Valente, M. (2015). Lupin alkaloids: chemistry, synthesis and biological significance. *Alkaloids: Chemistry and Biology*, 75, 1-42.
- Carvalho, S., Barbosa, M. A. M., & Amorim, E. (2016). Colletotrichum: Species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 67-78.
- Castañeda, M. B., Cabrera, A., & Navarro, Y. (2018). *Procesamiento de datos y análisis estadísticos utilizando SPSS*. EdiPucrs.
- Chen, L., Mulder, P., Lousse, J., Peijnenburg, A., & Rietjens, I. (2017). Metabolism of the pyrrolizidine alkaloids senecionine and senecionine N-oxide in HepG2 cells: the role of cytochrome P450s and flavin-containing monooxygenases. *Toxicology letters*, 269, 59-69.
- Condori, B., Guadalupe, D., & Baca, A. (2016). Caracterización arqueobotánica de *Lupinus mutabilis* Sweet en Huacaraje. *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental*, 39, 23-30.
- Cordell, G. (2013). *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. Elsevier.
- Damm, U., Cannon, P., Woudenberg, J., Johnston, P., Weir, B., Tan, Y., & Crous, P. (2019). The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in mycology*, 92, 1-129.
- De la Cruz Ricardez, D., Lagunes Espinoza, L., Ortiz García, C., & Pablo Pérez, M. (2017). ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA in vitro DEL EXTRACTO ACUOSO Y ALCALOIDEO DE *Lupinus* spp. SOBRE *Moniliophthora roreri*. México D.F., México D.F., México.

- Delgado Fernandez, M., & Rodolfi, M. (2009). Actividad biológica de hongos endófitos presentes en dos plantas medicinales chuquirahua (*Chuquiragua jussieui* JF Gmel) y ñachag (*Bidens andicola* Kunth). *La Granja*, 9(1), 29-49.
- Estévez Braun, A., Ravelo, Á., & Santana, O. (2017). Recent advances in the chemistry of lupin alkaloids. *Natural Product Reports*, 34(9), 973-1014.
- FAO. (2018). *Mercados y oportunidades para los productos de Lupinus mutabilis (tarwi) en Bolivia y Perú*. Informe de mercado.
- Flores, G., Barrientos, H., & Delgado, F. (2019). Valor nutricional y propiedades antioxidantes de semillas de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Revista Peruana de Biología*, 26(3), 305-312.
- Freire, N., & Villacreses, R. (2011). *EVALUACIÓN DEL PROCESAMIENTO ARTESANAL DEL CHOCHO*. Quito. <https://repositorio.usfq.edu.ec/jspui/bitstream/23000/963/1/99493.pdf>
- Galarza, J., Sandoval, F., & Romero, J. (2019). Efecto del manejo agronómico y ubicación espacial en el rendimiento del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en la provincia de Cotopaxi. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(3), 339-352.
- García Gallego, S., Marinas Pardo, L., García Aguirre, L., García Barrantes, P., Álvarez Ramos, P., Peña, F., & de Andrés, R. (2016). Anti-inflammatory and analgesic activity of new substituted derivatives of (R)-(+)-sparteine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(2), 191-201.
- González Teruel, A., & Barrios, M. (2017). *Métodos y técnicas para la investigación del comportamiento informacional: fundamentos y nuevos desarrollos*. ResearchGate.
- Gutiérrez Pulido, H. (2018). *Análisis y diseño de experimentos*. MC GRAW HILL.
- Gutierrez, A., Pacual, G., & Zamora, J. (2016). Evaluación de los factores en el desamargado de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Agroindustrial Science*, 6(1), 145-149.

- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (2014). *INIAP*.
<http://tecnologia.iniap.gob.ec/images/rubros/contenido/chocho/4cultivo.pdf>
- Jaguaco Cumbajín, L. C. (2016). *MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGUA DE RIEGO POR MEDIO DEL BIOCATALIZADOR, PARA EL ABASTECIMIENTO DEL CAMPUS CEYPSA CANTÓN LATACUNGA, PROVINCIA DE COTOPAXI PERIODO 2014-2015*.
- Jarrín Copo, L. X. (2014). *REDUCCIÓN DE LA INFECCIÓN DE ANTRACNOSIS (Colletotrichum acutatum) EN SEMILLA DE CINCO CULTIVARES DE CHOCHO (Lupinus mutabilis) POR EFECTO DEL CALOR SOLAR*. SANGOLQUI. file:///C:/Users/LENOVO/OneDrive/Escritorio/T-ESPE-IASA%20I-001002.pdf
- Jarrín, L. (2014). *Reducción de la infección de antracnosis (Colletotrichum acutatum) en semilla de cinco cultivares de chocho (Lupinus mutabilis) por efecto del calor solar*.
- Jimenez, L. d. (2008). *Incremento del Valor Nutritivo de la Pasta Base*. Quito.
- Larios Palacios, O., Lopez Vazquez, E., & Curiel Rodriguez, A. (2020). Evaluación in vitro de métodos contra Botrytis cinerea. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(3), 593-606.
- López Bautista, E. A., & González Ramírez, B. H. (2016). *Diseño y análisis de experimentos*. Guatemala: Docentes Investigadores.
- Marcia Barquero, N. A. (Junio de 2013). Presencia de Colletotrichum acutatum y Colletotrichum gloeosporioides en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense*, pág. 16.
<https://www.scielo.sa.cr/pdf/ac/v37n1/a02v37n1.pdf>
- Mata, D. A. (2018). Effectiveness of chemical fungicides for in vitro. 10.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2413-32992018000200009&script=sci_arttext&tlng=en

- Mulder, P., Lòpez, P., Castellari, M., & Collinge, D. (2018). Pyrrolizidine alkaloids in food and feed on the European market: levels, toxicity, and occurrence. *RSC Advances*, 8(28), 15415-15432.
- Ortega Silva, E. (2022). Formulación de un insecticida natural a base de concentrado de alcaloides del *Lupinus mutabilis* (tarwi). Callao, Peru.
- Ortega, L. M, L., Castro, E., & Altier, N. (2020). Control de enfermedades en el cultivo de tarwi. *CITE Agropecuario*, 17(1), 34-41.
- Pascual, C., Buitón, G., & Mendoza, V. (2019). Tarwi (*Lupinus mutabilis*): Productos y aplicaciones). *Revista Investigación y Ciencia*, 24(2), 77-85.
- Pinto Tafur, L., Tiaguaro Herrera, C., & Falconí Saá, C. (2018). Caracterización Morfológica, Patológica y Molecular de la Antracnosis (*C. acutatum*) del Tomate de Árbol y Chocho. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Pullopaxi Taco, J. (2022). Evaluación del efecto del macerado a base de chocho seco y tierno para el control de plagas en el cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el barrio Anchilivi, Salcedo, Cotopaxi 2022. Latacunga, Cotopaxi, Ecuador.
- Pullopaxi, J. (2018). “*EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MACERADO A BASE DE CHOCHO SECO Y TIERNO PARA EL CONTROL DE PLAGAS EN EL*”.
- Reyes Suárez, A., Piovani, J. I., & Potaschner, E. (2018). *Aportes latinoamericanos a los debates metodológicos de las ciencias sociales*. Teseo.
- Ríos Madril, M. (2010). Control biológico de la Antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides* Penz) en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en el ecotipo: amarillo puntón, mediante hongos endófitos antagonistas (Bachelor's thesis). Paute, Azuay, Ecuador.
- Rodriguez, R., Solórzano, E., & Ccanto, R. (2014). Morfología de las raíces de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Ciencia e Investigación Agraria*, 41(2), 215-222.

- Romero, L., Alipaz, P., & Vidaurre, P. (2017). Rentabilidad económica del cultivo de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en los Andes centrales de Perú. *Revista de Ciencia y Tecnología Agrícola*, 18(2), 65-75.
- Serrato Cruz, O., & Larios Palacios, E. (2020). Evaluación in vitro de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 14. <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/2077/3209>
- Sotelo, A., Barrientos, H., & Delgado, F. (2020). Valor nutritivo y productivo del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en la alimentación animal. *Revista Peruana de Biología*, 27(3), 279-286.
- Terán, W., Guerrero, E., & Cáceres, E. (2017). *Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet): Un cultivo olvidado con gran potencial nutricional y de mercado en Ecuador*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
- Triola, M. (2016). *Estadística*. PEARSON EDUCACIÓN.
- Vieira, R., Grisólia, A., Batista, L., Pinto, E., & Vilela, F. (2020). Alkaloids and their importance in plant protection. *Phytochemicals: Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*, 97-117.
- Villacres, E., Peralta, L., Cuadrado, J., Revelo, S., & Abdo, R. (2009). *Propiedades y Aplicaciones de los Alcaloides del Chocho*. Quito.
- Zhang, Y., Yang, J., Liu, W., & Gu, Z. (2017). Isolation and purification of lupin alkaloids from *Lupinus mutabilis* and their antibacterial and antifungal activities. *Molecules*. 22(11), 1876.
- Zhao, P., Du, X., Liu, M., & Wang, B. (2019). Bioactive alkaloids from marine-derived *Aspergillus* sp. fungus: chemical diversity and anticancer activities. *Marine drugs*, 17(5), 310.

ANEXOS

1. Toma de muestras del hongo fitopatógeno



2. Preparación de las muestras para desinfectar en hipoclorito de sodio



3. Muestras cortadas y desinfectadas para colocar en las cajas petri



4. Siembra de las muestras infectadas con antracnosis, en las cajas Petri con medio PDA



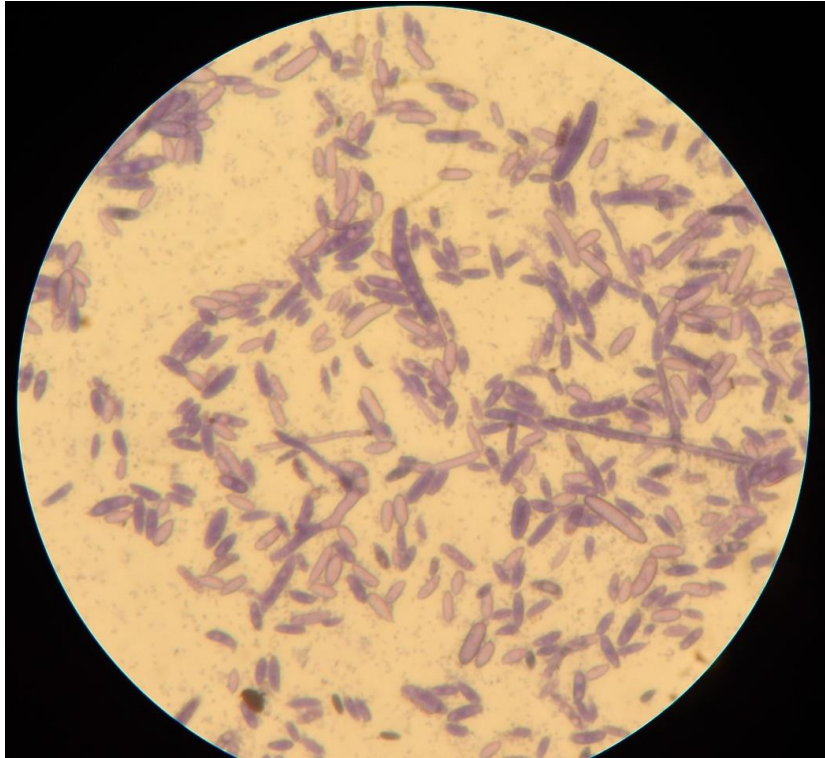
5. Pruebas previo a montar el ensayo de la acción de los alcaloides en antracnosis *Colletotrichum* sp.



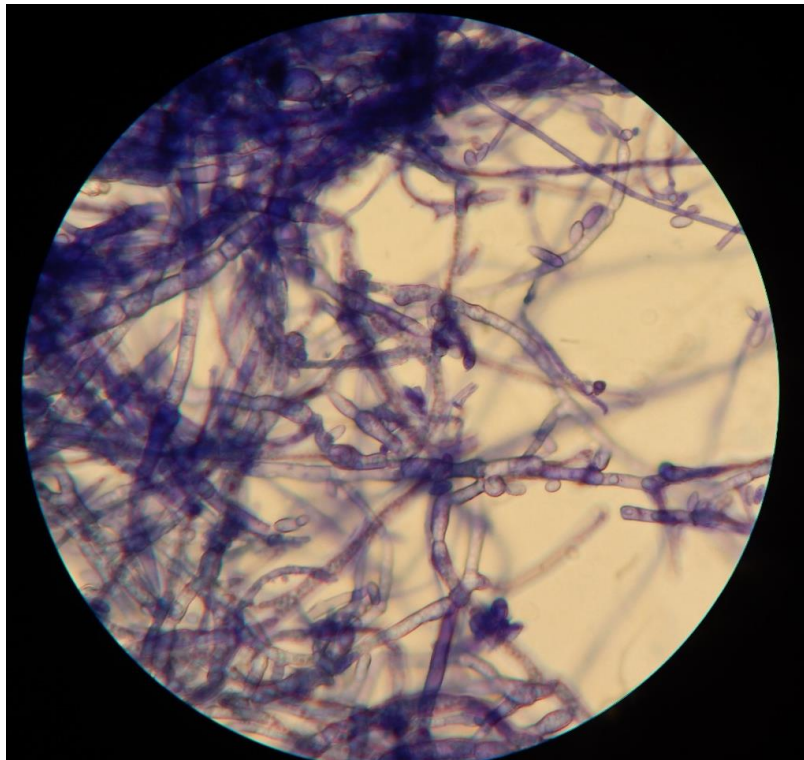
6. Análisis del hongo fitopatógeno, microscópicamente



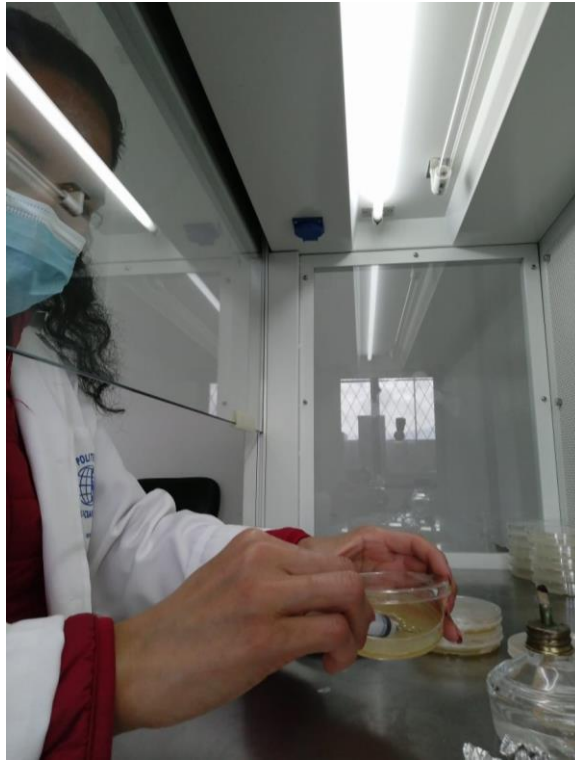
7. Esporas de *Colletotrichum sp.*



8. Hifas de *Colletotrichum sp.*



9. Breve raspado de las esporas de *Colletotrichum sp.* de la caja Petri



10. Disolución de las esporas de *Colletotrichum sp.* para realizar el conteo de UFC



11. Conteo de las esporas UFC de *Colletotrichum sp.* con la cámara de neubauer



12. Obtención del macerado mediante trituración completa en el mortero



13. Hidratación y macerado de chocho en reposo por 24 horas para armar el ensayo



14. Toma del fragmento de micelio del hongo fitopatógono para inocular en las cajas Petri con medio PDA



15. Inoculación del hongo fitopatógeno en el centro de la caja con medio PDA



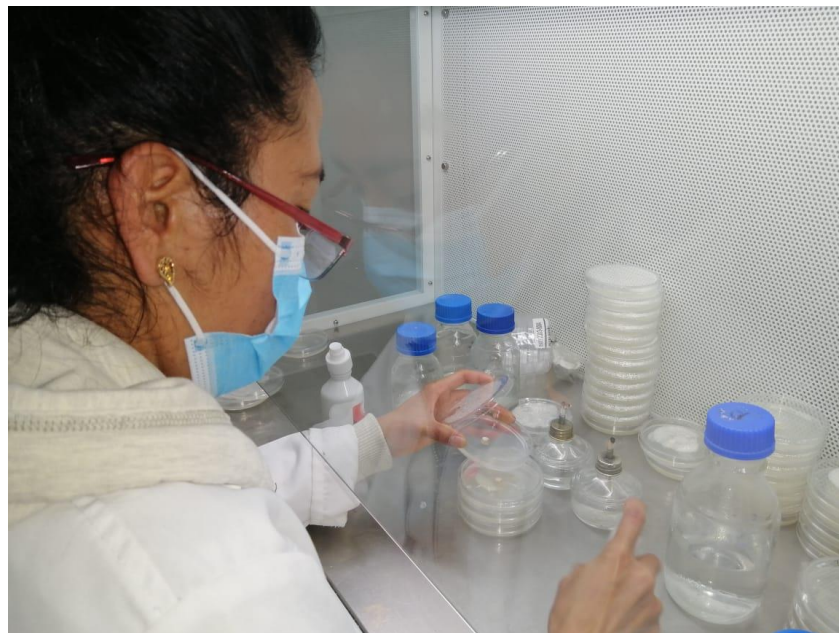
16. Dosis del líquido residual del chocho hidratado



17. Concentraciones del macerado de chocho



18. Aplicación de los alcaloides en las cajas con el hongo fitopatógeno



19. Preparación de la dosis del fungicida para el tratamiento químico

