



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Control in vitro de *Phytophthora* sp. mediante aplicación de extracto etanólico de propóleo”

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO AGROPECUARIO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN: Línea 4. Gestión Sostenible y Aprovechamiento de los Recursos Naturales.

SUBLINEA: Desarrollo y sostenibilidad

AUTOR: Sanguano Coronel Dario Javier

ASESOR: Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

Ibarra, 2022

Ibarra, 2022

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigente en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



(f).....

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):



(f).....

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399



(f).....

Mgs. Lennys Beatriz Berutty Suarez

C.C.: 1757289986



(f).....

Mgs. Edwin Fernando del Pozo Villacis

C.C.: 1001756566

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo DARIO JAVIER SANGUANO CORONEL, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derecho de disponer de sus derechos o autorizar de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 2022



f):

SANGUANO CORONEL DARIO JAVIER

C.C.: 100320907-7

AUTORÍA

Yo, DARIO JAVIER SANGUANO CORONEL, portador de la cédula de ciudadanía N° 100320907-7, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.



f):

SANGUANO CORONEL DARIO JAVIER

C.C.: 100320907-7

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, DARIO JAVIER SANGUANO CORONEL, con C.C:100320907-7, autor del trabajo de grado intitulado: “Control in vitro de *Phytophthora* sp. mediante aplicación de extracto etanólico de propóleo”. previo a la obtención del título profesional de Ingeniería Agropecuaria, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

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

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

Ibarra, 2022



f):

SANGUANO CORONEL DARIO JAVIER

C.C.: 100320907-7

**DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN,
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación de Proyecto de Titulación: **“Control in vitro de *Phytophthora* sp. mediante aplicación de extracto etanólico de propóleo”**, lo propuesto en el Código de Ética de la investigación y el aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 03 de febrero 2022.

Para constancia firma:



f):

Darío Javier Sanguano Coronel

Estudiante que ejecuta el trabajo de Titulación

C.C: 100320907-7

Carrera: Ingeniería Agropecuaria

Ibarra, 2022

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, quien me ha guiado por el buen camino, por darme fuerzas para seguir adelante sin desmayar ante los problemas que me suscitaban, el darme la paciencia, la virtud y encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad.

Con todo mi amor a mi madre que gracias a su sabiduría y paciencia han logrado forjar en mi un profesional de bien, que ante las dificultades del camino, siempre me ha mostrado una luz que prevalece por sobre todas las adversidades, llegando así al final de una meta que es símbolo de perseverancia y amor.

Darío Sanguano

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme acompañado a lo largo de mis estudios, de darme fuerzas para emprender hacia delante y nunca rendirme y de haberme brindado enseñanzas y mostrarme el camino hacia la felicidad.

Un caluroso y afectuoso agradecimiento a mi madre Consuelo Coronel, por inculcarme valores y una excelente educación sobre todo ese inmenso amor brindado y ser para mí un ejemplo de vida a seguir, por demostrarme su amor y ser el apoyo moral en todo momento, por ayudarme a salir adelante sin importar las decisiones que tome. A mis hermanos Joel y Esthefanía quienes supieron extenderme su mano y reconfortarme en aquellos momentos más difíciles para no rendirme y luchar por llegar a cumplir con esta meta. A mi padre Cleverth Sanguano quien a su manera supo brindarme su apoyo en los momentos de mayor percance para poder culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mis amigos Moisés Cueva, Josué Quelal, Santiago Villarreal, Diego Montalvo, Erick Jarrín, Cinthya Orbe y Gustavo Aguinaga, que han sido parte importante durante este camino y me han sabido apoyar a su manera en sus respectivos momentos, agradezco por darme el valor para seguir adelante, estar presentes con sus conocimientos, paciencia y sobre todo haberme acompañado durante esta etapa de mi camino profesional.

Finalmente, un agradecimiento sincero a mi asesor de tesis Mgs. Santiago Mafla, así como muchos docentes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, quienes me brindaron la oportunidad de recurrir a sus capacidades y conocimientos científicos, de igual manera gracias por la paciencia, tiempo y recomendación brindadas para culminar con éxito el trabajo de titulación y las ganas de seguir adelante con mi carrera profesional.

ÍNDICE

RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO I.....	18
INTRODUCCIÓN.....	18
CAPÍTULO II.....	19
OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo General	19
2.2. Objetivos Específicos	19
2.3. Hipótesis.....	19
CAPÍTULO III.....	20
ESTADO DEL ARTE.....	20
3.1. <i>Phytophthora</i> sp.	20
3.1.1. Condiciones Favorables para su Diseminación	20
3.1.2. Síntomas Producidos	21
3.1.3. Importancia Económica	22
3.1.3.1. Afección causada en cultivo de aguacate.....	22
3.1.4. Métodos de control.....	24
3.2. Métodos de Control In Vitro.....	25
3.2.1. Pruebas Antibiogramas.....	25
3.3. Propóleo.....	26
CAPÍTULO IV.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28

4.1. Materiales	28
4.1.1. Materiales de laboratorio	28
4.1.2. Equipos de laboratorio	28
4.1.3. Reactivos.....	29
4.1.4. Material biológico.....	29
4.2. Métodos.....	29
4.2.1. Recolección de muestras de estudio	29
4.2.2. Preparación de Extracto Etanólico de Propóleo (EEP).....	30
4.2.3. Aislamiento del Fitopatógeno.....	31
4.2.4. Extracción de ADN del Fitopatógeno para Caracterización Molecular	32
4.2.5. Técnica de Antibiograma con Sensidiscos Humedecidos	33
4.2.6. Tratamientos	34
4.3. Variables de estudio	34
4.4. Diseño Experimental	35
4.4.1. Unidad Experimental.	35
4.4.2. Distribución e Identificación de las Unidades Experimentales.	35
4.4.3. Fase Desarrollada en Laboratorio	35
4.5. Procesamiento de Datos y Análisis Estadístico.....	36
4.5.1. Análisis Estadístico.....	36
4.5.2. Esquema de Análisis ADEVA.....	36
CAPÍTULO V	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1. Caracterización Morfológica de <i>Phytophthora</i> sp.	37
5.2. Caracterización molecular de <i>Phytophthora</i> sp.	38

5.3. Crecimiento del micelio en medio de cultivo.....	38
5.4. Evaluación de la Actividad Antifúngica del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) Mediante la Prueba de Antibiograma con Sensidiscos Humedecidos	39
5.5. Evaluación estadística de la actividad antifúngica del extracto etanólico de propóleo .	42
5.6. Evaluación de UFC por espectrofotometría de la actividad antifúngica del extracto etanólico de propóleo	44
CAPÍTULO VI.....	47
CONCLUSIONES.....	47
CAPÍTULO VII.....	48
RECOMENDACIONES.....	48
CAPÍTULO VIII.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Esquema de los tratamientos aplicados en la investigación	34
Tabla 2 Esquema de análisis ADEVA.....	36
Tabla 3 Resultados de análisis molecular realizados por la empresa	38
Tabla 4 Resultados del porcentaje alcanzado por el halo de inhibición de los diferentes tratamientos.....	41
Tabla 5 Análisis ADEVA sobre el diámetro del halo de inhibición de EEP contra <i>Phytophthora</i> sp.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Superficie y producción de aguacate en el año 2018 región sierra norte	23
Figura 2 Distribución de las unidades experimentales del ensayo	35
Figura 3 Identificación morfológica del fitopatógeno bajo el microscopio.....	37
Figura 4 Desarrollo del micelio de <i>Phytophthora</i> en medio de cultivo agar-centeno.....	39
Figura 5 Actividad antifúngica de diferentes concentraciones de propóleo	40
Figura 6 Medidas del diámetro del halo de inhibición de los tratamientos aplicados contra <i>Phytophthora</i> sp.	43
Figura 7 Correlación de la curva de crecimiento de UFC de <i>Phytophthora</i> sp y agentes de control como el principio activo Metalaxil y diluciones de EEP.....	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Recolección de propóleo de la granja experimental ECAA.....	54
Anexo 2 Maceración de propóleo recolectado.....	54
Anexo 3 Recolección de muestras de raíz de ejemplares con sintomatología de <i>Phytophthora</i> sp	55
Anexo 4 Siembra de muestras de tejido vegetal en PDA	55
Anexo 5 Siembra de muestras de tejido vegetal con crecimiento de hongo.....	56
Anexo 6 Caracterización morfológica del agente patógeno en microscopio.....	56
Anexo 7 Purificación de <i>Phytophthora</i> sp en agar centeno	57
Anexo 8 Preparación de sensidiscos	57
Anexo 9 Establecimiento de diseño experimental	58
Anexo 10 Registro del crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp en ensayo a los 6 días	59
Anexo 11 Registro del crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp en ensayo a los 10 días	59
Anexo 12 Halo de inhibición generado por concentración de propóleo en la máxima concentración de propóleo a los 12 días posteriores a la inoculación del medio.	60
Anexo 13 Halo de inhibición formado 15 posteriores a la inoculación del medio con diluciones de extracto de propóleo.....	61
Anexo 14 Secuenciación PCR enviada laboratorio de análisis molecular	62
Anexo 15 Empacado de muestras para envío a laboratorio de análisis molecular.	63
Anexo 16 Parte 1 del informe correspondiente a caracterización molecular.....	64
Anexo 17 Parte 2 del informe correspondiente a caracterización molecular.....	65
Anexo 18 Resultado de conteo de UFC por espectrofotometría.....	66
Anexo 19 Desarrollo del halo de inhibición	67
Anexo 20 Halo de inhibición formado en cada tratamiento	67

RESUMEN

El propóleo se presenta como una resina proveniente de la producción apícola, la cual es utilizada en la conformación del panal como un poderoso elemento antifúngico y bactericida, lo cual se le atribuye a su composición a base de compuestos como ésteres y ácidos fenólicos que tienen la capacidad de inhibir o repeler el crecimiento y proliferación de hongos y bacterias, generando dentro del panal un ambiente antiséptico e ideal para el desarrollo de la colmena, es así que con esta cualidad para impedir el crecimiento de hongos y bacterias se establece la aplicación de diluciones de propóleo a diferentes concentraciones con el objetivo de evaluar la eficacia a nivel in vitro para disminuir el crecimiento de *Phytophthora* sp, obteniendo como resultado que una concentración de 20 g de propóleo en 100 ml de alcohol etanol al 96% permite inhibir el crecimiento de este agente fitopatógeno con un porcentaje de halo de inhibición del 24,34%, estableciendo un halo de inhibición de crecimiento con un valor aproximado al generado por el agente de control químico con principio activo Metalaxil que obtuvo un halo de inhibición de 31,96%, además de evaluar que a nivel de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por espectrofotometría, el uso de propóleo presenta una característica de control efectivo para el desarrollo de *Phytophthora* sp.

Palabras clave: UFC, fitopatógeno, inhibición, In vitro, espectrofotometría.

ABSTRACT

Propolis It is presented as a resin from beekeeping production, which is used in the conformation of the honeycomb as a powerful antifungal and bactericidal element, which is attributed to its composition based on compounds such as esters and phenolic compounds that have the ability to inhibit or repel the growth and proliferation of fungi and bacteria, generating within the honeycomb an antiseptic and ideal environment for the development of the hive, so with this quality to inhibit the growth of fungi and bacteria, the application of propolis dilutions at different concentrations with the aim of evaluating the efficacy at the in vitro level to inhibit the growth of *Phytophthora* sp, obtaining as a result that a concentration of 20 g of propolis in 100 ml of 96% ethanol alcohol allows to inhibit the growth of this phytopathogenic agent with a percentage of inhibition halo of 24.34%, establishing a growth inhibition halo nto with an approximate value to that generated by the chemical control agent with active ingredient Metalaxil that obtained an inhibition halo of 31.96%, in addition to evaluating that at the CFU level by spectrophotometry, the use of propolis presents an effective control characteristic for the development of *Phytophthora* sp.

Keywords: CFU, phytopathogen, inhibition, In vitro, spectrophotometry.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En los procesos de producción agrícola existen varios factores que comprometen la salud de un cultivo cómo puede ser la presencia de insectos y en algunos casos enfermedades provocadas por ciertos tipos de agentes fitopatógenos como oomicetos, que pueden llegar a convertirse en responsables de importantes pérdidas económicas para el sector primario, ya que la afección que estos generan en un cultivo puede llegar a comprometer seriamente el rendimiento productivo e incluso generar pérdidas completas si no son manejados con la debida precaución temprana.

Dado que varios son los microorganismos fitopatógenos que pueden llegar a atacar a un cultivo y pasar inadvertido hasta cierta etapa, la prevención se ha convertido en una de las principales acciones de eficacia para poder controlar el desarrollo e incidencia de enfermedades causadas por la presencia de los agentes antes mencionados, haciendo uso de productos de origen sintético con principios activos de efecto protectante; más sin embargo debido al manejo poco tecnificado en la aplicación de ciertos agroquímicos, se ha generado una resistencia por parte de los diferentes microorganismos a los diversos productos de control fitosanitario, convirtiéndose en un problema cada vez más difícil de controlar y a su vez en un foco de contaminación ambiental por los residuos que son transportados en el proceso de lixiviado de la producción agrícola, de manera que al implementar posibles soluciones más amigables con el medio ambiente como lo es el uso de los principios activos presentes en elementos naturales como el propóleo que gracias a su contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides, presentan capacidad antagónica ante el desarrollo de diferentes microorganismos, cualidad que puede ser aprovechada en el proceso de producción agrícola con la finalidad de mejorar un sistema de manera positiva y más amigable con el medio ambiente.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Evaluar la eficacia del extracto etanólico de propóleo ante el fitopatógeno causante de la podredumbre de raíz *Phytophthora* sp. cultivado en laboratorio.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar mediante caracterización molecular la presencia *Phytophthora* sp de muestras procedentes de cultivo vegetal enfermo con sintomatología características del agente fitopatógeno”.
- Analizar 4 diluciones del extracto etanólico de propóleo y un control químico (Metalaxil), frente al hongo causante de la podredumbre de raíz, aplicando en muestras fúngicas cultivadas en el laboratorio de biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

2.3. Hipótesis

El extracto etanólico de propóleo influye como agente de control frente al hongo causante de la podredumbre de raíz (*Phytophthora* sp)

Ha: *El extracto etanólico presenta un control efectivo en diferentes dosis ante el agente fúngico.*

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1. *Phytophthora* sp.

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria de México (SENASICA, 2021) establece que el género *Phytophthora* incluye a 313 especies, las cuales se encuentran descritas de alta importancia económica en cultivos de regiones templadas y tropicales; este género se encuentra ubicado en el phylum Oomycota, el cual abarca a organismos diploides que tienen relación con microorganismos protistas y algas; dicha relación se atribuye, dado a la semejanza en la conformación de la estructura móvil de sus esporas flageladas durante la reproducción asexual y la generación de estructuras identificadas como oogonios globosos durante el proceso de reproducción sexual.

De acuerdo con Soto et al., (2017) este género es capaz de comprometer la salud de los cultivos por el proceso de daño radicular, generando lo que se conoce comúnmente como podredumbre de raíz, siendo esta sintomatología algo característico de este agente. Dentro del Ecuador esta enfermedad se encuentra identificada en varios cultivos, los cuales presentan una sintomatología muy similar en cuanto al daño radicular generado, por lo cual Tello et al., (2019) establecen que para el control de esta enfermedad se implementa un programa de sobreutilización y sobredosificación de fungicidas, generalmente a base de cobre, lo cual incrementa los costos de producción y a su vez llegan a ser un peligro al comprometer la salud del agricultor.

3.1.1. Condiciones Favorables para su Diseminación

El género *Phytophthora* a la vez que manifiesta características de daño similar en los diferentes cultivos a los que ataca, presentando condiciones similares para su diseminación, tal como lo establece la revista digital CERTIS (2021), este agente fitopatógeno expresa una alta capacidad de supervivencia y en condiciones apropiadas demuestra un acelerado desarrollo que compromete la salud completa de un cultivo, ya que este ingresa por la raíz y consigue avanzar hacia los haces vasculares para así llegar a producir el proceso de marchites generalizado en la planta, asimismo comprende el siguiente proceso de desarrollo bajo condiciones de una temperatura del suelo entre 15-23°C y a su vez presenta una humedad elevada por un exceso de precipitaciones, riego inadecuado o ineficiencia en el tipo de drenaje del suelo, dando lugar

a la enfermedad conocida como podredumbre de raíz, además este agente tiene la particularidad de invernar en tubérculos, raíces, bulbos infectados e incluso en el mismo suelo, manteniéndose en los siguientes estadios:

- **Oosporas:** Se trata de un periodo dentro del ciclo biológico del organismo, en el cual el desarrollo y su actividad en general se detienen de manera temporal, también se conocen como esporas sexuales que se encuentran en un periodo conocido como dormancia.
- **Micelio:** Comprende el conjunto de estructuras conocidas como hifas, las cuales conforman la parte vegetativa de un hongo
- **Esporangios:** Son unas estructuras que presentan la particularidad de germinar directamente o bien de producir zoosporas.
- **Clamidosporas:** Estas son un tipo de esporas de una pared gruesa, las cuales pertenecen a varias clases de hongos.

Es de esta manera que la podredumbre de raíz generada por *Phytophthora* puede iniciarse desde varios procesos, como cuando se presentan las condiciones de tipo invernales (temperaturas muy bajas) el hongo presenta la capacidad de soportarlo en forma de esporas con paredes gruesas (Clamidosporas y Oosporas) y una vez que se presentan las condiciones ambientales favorables, las esporas germinan y es en esta etapa en donde tienen la capacidad de penetrar directamente en las células epidérmicas de raicillas o heridas; también el micelio que se encuentra presente en raíces infectadas o rastrojos vegetales infectados, se convierte en vectores diseminadores de esta enfermedad.

3.1.2. Síntomas Producidos

Por lo regular este género presenta una característica en común que es el marchitamiento, tal como lo indica Elliot (2017), la identificación de síntomas causados por *Phytophthora* corresponden a los momentos en el cual la humedad del suelo es demasiado elevada, y esto da paso a que las oosporas inicien el proceso de diseminación y multiplicación del inóculo, es entonces que el patógeno se desarrolla y genera los síntomas más habituales que son la decadencia radicular, el ahogamiento de plántulas jóvenes, la pudrición de tallos, bulbos tubérculos y hojas, dependiendo del cultivo al que ataquen.

De esta manera la revista digital CERTIS (2021), establece que el género *Phytophthora* abarca más de 90 especies, con cierto grado de particularidad entre algunas especies relacionadas a un único hospedero, mientras que la gran mayoría tiene la capacidad de parasitar a una amplia gama de plantas, entre las cuales se resaltan principalmente las siguientes:

- Dentro de la familia Rosaceae, se ha logrado caracterizar principalmente a la especie *P. fragariae*, la cual en cultivos como como fresas y frambuesas genera un decaimiento de plantas y en poco tiempo da paso a su marchitez.
- En los cultivos del género Solanum, la especie característica de mayor predominancia se identifica como *P. infestans*, la cual se presenta en condiciones alrededor del 80% y temperaturas comprendidas entre 15-23°C, sumado a elevadas precipitaciones.
- A su vez dentro del género *capsicum*, la especie de *Phytophthora* de mayor presencia es la *P. capsicum*, la cual afecta con mayor incidencia al cultivo de pimientos, dando paso a una enfermedad conocida como tizón o marchitez del pimiento.
- De la misma manera para cultivos pertenecientes a la familia Lauracea, el *P. cinnamomi* se convierte en la especie de *Phytophthora*, más predominante en este cultivo, comprometiendo la salud de los ejemplares generando la podredumbre de raíz.

De manera que los signos y síntomas de esta enfermedad en la mayoría de los cultivos atacados presentan similitud de afección entre sí como es un déficit de vigor, amarillamiento, decaimiento de las hojas y la formación de parches o bloques en las plantas.

3.1.3. Importancia Económica

El impacto económico que provoca el género *Phytophthora* radica en las pérdidas devastadoras producidas en los cultivos infectados, tal como lo establece Drent (2013), debido a la enfermedad originada por este fitopatógeno, tomando como ejemplo los casos presentes en el Sudeste Asiático, las perdidas oscilan entre el 5-10% para los cultivos de coco y pimienta negra, el 25% para el cultivo de caucho, cacao, cítricos y papa, además de forma referencial se establece que en la industria del cacao, se producen perdidas de aproximadamente 450 000 toneladas, valoradas en mil millones de dólares en el año de investigación.

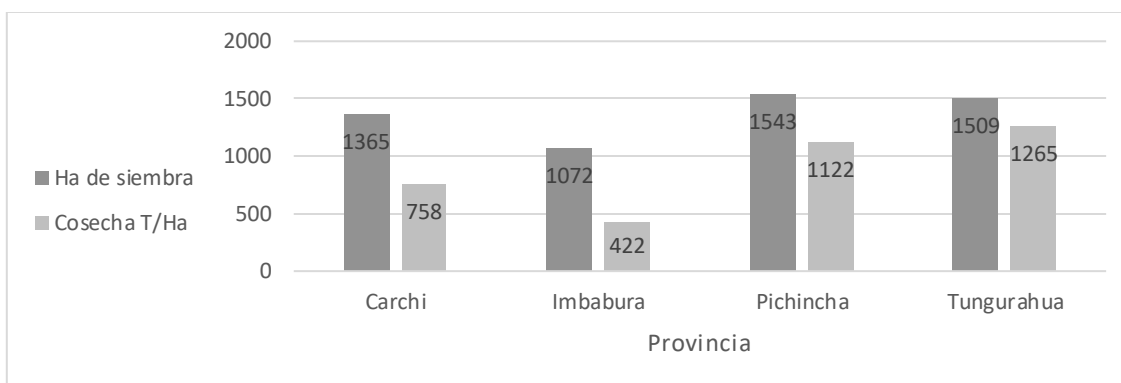
3.1.3.1. Afección causada en cultivo de aguacate.

La pudrición de raíz es un problema que afecta a variedades nacionales y mejoradas de aguacate, presentando una pérdida de alrededor del 30-50% de árboles en etapas de viveros,

esto durante los dos primeros años de vida (Castaño y Leal, 2017), por otra parte, en Ecuador El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2014) da a conocer que este cultivo está presente de manera relevante a nivel comercial en la región interandina en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Azuay y Loja, estableciendo que las mejores condiciones para su desarrollo se encuentran a una altitud entre los 1 800 a 2 500 msnm con una media en la temperatura de 18°C, detallando que los mejores suelos para este cultivo son de tipo franco a franco arenoso que posean un buen drenaje.

Figura 1

Superficie y producción de aguacate en el año 2018 región sierra norte



Nota: Se detalla la distribución de las áreas destinadas a la siembra de aguacate y su respectivo rendimiento, adaptado de Álvarez et al., (2021)

Dentro del cultivo se presentan agentes como insectos u hongos que pueden llegar a comprometer la salud del cultivo, siendo que en este caso el aguacate presenta una predisposición al ataque de insectos como *Heliothrips hermorrhoidalis*, *Conotrachelus perseae*, *Copturus aguacatae*, *Oligonychus yothersi*, *Laparocerus* entre los más principales; así mismo se presentan enfermedades causadas por agentes fúngicos como el *Phytophthora* sp, siendo el más característico encontrado en cultivos de aguacate el *P. cinnamomi*, que da paso a una enfermedad conocida en algunas localidades como tristeza del árbol, lo que se debe a un problema de podredumbre de raíz, esta afección se expresa cuando el agente se encuentra presente en el medio local y se da un encharcamiento del suelo o una excesiva humedad, logrando identificar su presencia por el marchitamiento de la planta, además de presentar en la parte aérea una secado a nivel del sistema foliar, seguido de una clorosis de las hojas y una

producción cada vez más pequeña de fruto para finalmente culminar con la muerte de la planta (Torres, 2007).

Álvarez et al., (2021) expresan que el aguacate se establece como una fruta no tradicional, la cual en los últimos años ha incrementado su demanda de consumo a nivel mundial, generando de esta manera un impulso a nivel económico para el establecimiento de este cultivo, siendo así que datos de investigación arrojan que en el año 2018 a nivel mundial se importaron 2,5 millones de toneladas de aguacates, con un valor de 6,1 millones de dólares, representando el 55% del total de las importaciones mundiales Estados Unidos, los países bajos y Francia.

De esta manera con los antecedentes mencionados, el Ecuador se coloca en el séptimo puesto como óptimo para la producción y exportación de frutas no tradicionales que presentan un aroma único, gracias a la ubicación geográfica, la cual permite que los cultivos de estas frutas se presenten de una calidad excepcional. Gracias a esto en el 2020 la exportación de aguacate generó una ganancia de 300 millones de dólares, de igual manera el Ministerio de Agricultura y Ganadería, estima un incremento del 10% en la demanda mundial de este producto, sin embargo como expresan Guerrero y Ramos (2016) el principal peligro que se presenta en el caso del cultivo de aguacate es la podredumbre de raíz, que es causado por el agente *Phytophthora cinnamomi*, y llega a comprometer a nivel económico este sistema puesto que genera un retraso en el desarrollo y reduce significativamente la productividad y calidad del producto final, disminuyendo fuertemente su retribución económica, por lo cual el indagar en métodos de control hacia estos agentes patógenos se convierte en una alternativa viable, orientándose en descubrir la eficacia de productos orgánicos, que bien utilizados pueden aportar un desarrollo vigoroso y mermar el impacto ambiental al disminuir el uso de agroquímicos.

3.1.4. Métodos de control

Para el manejo de este tipo de enfermedad es aconsejable ejecutar controles sanitarios durante las primeras etapas de desarrollo de los ejemplares vegetales, siendo como tal lo recomendado por Castaño y Leal (2018) que explican diferentes métodos como la desinfección o esterilización de sustratos con fungicidas a base de cobre y la aplicación de fungicidas sistémicos hacia las plantas, además en investigaciones similares para el control de este fitopatógeno, Trujillo et al., (2021) establecen que es posible el uso de alternativas como

extracto de principios activos de ciertas plantas u controles orgánicos, para prevenir la diseminación de esta enfermedad en cultivos determinados.

3.1.4.1. Control químico.

Dentro de un control establecido para la podredumbre de raíz generada por el *Phytophthora*, se destacan grupos de fungicidas como la alanina o fenil amidas los cuales son específicos para este patógeno, ya que tienen la capacidad de suprimir el desarrollo y actúa sobre la biosíntesis del ADN sin embargo esto genera un alto riesgo de estimular una alta resistencia a estos principios activos, razón por la cual se recomienda una combinación con fungicidas de amplio espectro como son: benalaxil, furalaxil y metalaxil, siendo este último el más ampliamente utilizado para el tratamiento tanto en el suelo como en las semillas por su capacidad protectante (Leal et al., 2014).

3.2. Métodos de Control In Vitro

La European Chemicals Agency (ECHA, 2020) introduce que los métodos conocidos como in vitro se tratan de un ensayo realizado fuera de un organismo vivo, para lo cual se consideran muestras de tejidos, órganos, células aisladas o similares, es así entonces que los datos obtenidos posterior a esta metodología puede satisfacer de forma parcial o completa información que solamente se obtendría a partir de datos generados con ensayos efectuados en organismos vivos.

3.2.1. Pruebas Antibiogramas

Vázquez (2020) establece que las pruebas antibiogramas, también llamadas pruebas de sensibilidad, son aquellas que permiten determinar la susceptibilidad de algún microorganismo determinado frente a elementos posiblemente antagónicos, a partir de una exposición de una concentración estandarizada del elemento a evaluar.

Las pruebas de sensibilidad pueden ser según su método de evaluación, también pueden ser cualitativas, semicuantitativas o métodos con base en ácidos nucleicos.

3.2.1.1. Métodos cualitativos

Estos métodos se consideran como un rango menor de efectividad que los semicuantitativos y estos resultados generalmente se detallan en la siguiente manera:

- Susceptible (S)

- Intermedia (I)
- Resistente (R)

Varias cepas no poseen criterios establecidos para determinar una resistencia, de modo que así se puede determinar cómo susceptibles o no susceptibles.

3.2.1.2. Métodos semicuantitativos

Dentro de esta metodología se establece cual es la concentración mínima necesaria de un antibiótico o elemento de control para que desarrolle una inhibición en el crecimiento de un microorganismo en particular in vitro. Esta concentración inhibitoria mínima (CIM) se detalla como un valor numérico que luego de interpretarse en una de estas cuatro clases: sensible, intermedio, resistente y hasta no susceptible Vázquez (2020).

3.2.1.3. Método antibiograma de disco

La técnica de antibiogramas de disco es muy recomendada para la determinación de la sensibilidad bacteriana frente a los productos antimicrobianos, esta metodología tal como lo detalla García et al., (2020) se basa en la aplicación sobre la superficie de agar de una caja Petri previamente inoculada con el microorganismo en donde se añaden los discos de papel secante impregnados con los diferentes productos antibióticos, es así que tan pronto el disco impregnado del producto de interés entra en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde en el agar, de esta manera el producto se disemina radialmente a través del medio de cultivo y da lugar a un gradiente de concentración, luego de transcurrir un determinado tiempo aparece una zona de inhibición conocido también como halo de inhibición.

3.3. Propóleo

Este elemento se trata de una sustancia resinosa, generalmente presenta un color verde a castaño oscuro de un sabor amargo y un olor ligeramente agradable. Es recolectado por las abejas (*Apis mellifera*) principalmente de las yemas jóvenes y cortezas de algunas especies vegetales, siendo que durante el proceso de recolección de esta sustancia, transporte y almacenaje, las abejas adicionan ceras y secreciones salivares lo que le confiere propiedades terapéuticas a este producto, siendo así que en estado natural contiene resinas y bálsamos, los cuales a su vez contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus esteres (50%), ceras con un

contenido muy variable (7-35%) y aceites volátiles que confieren un aroma al producto final, sin dejar de lado la característica antifúngica (Pineda et al., 2010).

De tal manera que el presente documento plantea como eje de importancia la investigación en las propiedades presentes en el propóleo, ya que, en primer lugar dentro de su función natural, se trata de un elemento que las abejas utilizan para cubrir la colmena cumpliendo algunas funciones como evitar el ingreso de otras especies y a su vez evitando la presencia de hongos y bacterias Sánchez et al., (2014); en segundo lugar el uso de esta sustancias se encuentra presente en estudios relacionados con la medicina y a su vez se encuentra inmiscuido en investigaciones de ámbito agropecuario, ya que parte de los compuestos que estructuran esta sustancia como ácidos fenólicos, flavonoides y estéres son responsables de bioactivos que dan lugar a que pueda ser usado como una alternativa antifúngica y fomentar de esta manera una producción agrícola orgánica y saludable con el medio ambiente y el consumidor Chaillou y Nazareno (2009) y Manrique (2006).

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente ensayo de investigación tuvo lugar en el laboratorio de biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, pertenecientes a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

Para la ejecución del presente trabajo de titulación denominado “Control in vitro de *Phytophthora* sp. mediante aplicación de extracto etanólico de propóleo” se aisló la cepa del fitopatógeno de interés a partir de muestras vegetales como raíces provenientes de cultivos de árboles de aguacate (*Persea americana*) y hojas pertenecientes a plantas de un cultivo de tomate riñón (*Solanum lycopersicum* L.) que presentaban sintomatología de las enfermedades como podredumbre de raíz y tizón tardío respectivamente; posteriormente se desarrolló la obtención del extracto etanólico de propóleo (EEP) y se evaluó mediante bioensayos su actividad antagonica, al aplicar diferentes concentraciones de este elemento ante cepas purificadas de *Phytophthora* sp cultivadas de manera in vitro en laboratorio.

4.1. Materiales

4.1.1. Materiales de laboratorio

- Cajas Petri de cristal
- Frascos Boeco
- Mecheros bunsen
- Parafilm
- Cooler
- Frascos Erlenmeyer
- Papel filtro
- Kit de sutura

4.1.2. Equipos de laboratorio

- Autoclave vertical (N-Biotek modelo: NB-1080)
- Balanza analítica (ADAM modelo: PW 254)
- Campana de flujo laminar (N-BIOTEK)
- Microscopio óptico

4.1.3. Reactivos

- Agar-centeno
- Agar-v8
- Alcohol al 96%
- Sucrosa
- Antibióticos (Ampixilina, Rifampicina, Polimixina, Vancomicina)
- Agua destilada

4.1.4. Material biológico

- Muestras de vegetales con sintomatología de la enfermedad (fragmentos de hojas y raíces)
- Propóleo

4.2. Métodos

4.2.1. Recolección de muestras de estudio

El presente proyecto se efectuó en los laboratorios de las instalaciones de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador – Sede Ibarra, recolectando para el desarrollo experimental muestras de propóleo proveniente de los apiarios pertenecientes a la granja experimental, propiedad del recinto de educación superior (Latitud N 00°21'50", longitud W 78°15'40' y altitud 2220 msnm).

Para la obtención de la materia prima primero se ejecutó la selección de las colmenas con buena densidad poblacional y actividad de las abejas, que a simple vista permitió elegir la mejor colmena para la extracción de propóleo, de la cual aplicando el uso del método de raspado directo con ayuda de una palanca de acero inoxidable se extrajo un aproximado de 25 g, de esta manera una vez obtenida la muestra del material de interés posteriormente se procedió a su conservación, colocando el material recolectado en frascos de color ámbar manteniéndolos a una temperatura de -3°C hasta el momento de su análisis, aplicando de esta manera el protocolo para esta recolección dado a conocer por Chaillou et al., (2004) y Manrique (2006).

Simultáneamente para la obtención del agente fitopatógeno de interés, se dio paso a la revisión bibliográfica de la sintomatología que produce la presencia del género *Phytophthora* en algunos cultivos representativos de la zona norte como son papa (*Solanum tuberosum*), aguacate (*Persea americana*) y tomate riñón (*Solanum lycopersicum* L.), para posteriormente

identificar en estas especies vegetales síntomas que presentasen posiblemente por la contaminación por *Phytophthora* sp, es así que se tomó muestras de tejido vegetal, siendo en el caso del cultivo de solanáceas por medio de la recolección de hojas enfermas de las plantas presentes establecidas en huertas orgánicas de tomate riñón y papa, los cuales se encontraban ubicados en la parroquia de la Esperanza perteneciente a la ciudad de Ibarra (Latitud N 0.297646°, longitud -78.117806° y altitud 2 350 msnm) y muestras de raíz de árboles de aguacate que de igual forma presentaron síntomas de afección por *Phytophthora* sp, ubicados en la granja Imbaya propiedad de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (Latitud N 0.354193°, longitud -78.155025° y altitud 2 220 msnm).

4.2.2. Preparación de Extracto Etanólico de Propóleo (EEP)

Para desarrollar el proceso de extracción de las muestras obtenidas, se realizó el protocolo presente en el Código Alimentario Argentino (Popoya et al., 2004) y recomendaciones realizadas para este mismo procedimiento, establecidas por Martínez (2009), extrayendo la metodología más adecuada en base a la guía de los autores antes mencionados, para obtener un protocolo de trabajo ajustado a las condiciones locales de desarrollo experimental.

Una vez acoplado el diseño experimental a las condiciones de la respectiva localidad se procedió con ayuda de un mortero a compactar las muestras de resina, hasta reducir significativamente su granulometría, posteriormente se diluyó en un matraz Erlenmeyer 20 g de propóleo en 100 ml de etanol destilado al 96%, para consecutivamente sellar los recipientes y colocar sobre un agitador por 48 horas a temperatura ambiente; una vez transcurrido este tiempo se dio paso al centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos, luego se filtró por gravedad y se añadió 10 ml de agua destilada, esperando el tiempo necesario hasta obtener la precipitación de toda la cera, es así que se filtraron las veces necesarias hasta registrar una ausencia total de ceras (Popova et al., 2005); Una vez culminado este proceso se dio lugar a recolectar toda la muestra de extracto etanólico, para embotellar la resina obtenida en frascos color ámbar y mantenerlos en refrigeración a menos 4°C, hasta el momento de ser utilizados (Martínez, 2009).

4.2.3. Aislamiento del Fitopatógeno

La recolección de muestras del presente ensayo consistió en identificar los cultivos representativos, dentro de los cuales existiese la presencia de una sintomatología característica del género *Phytophthora* sp.

Para el caso de las muestras de raíz, una vez obtenido el material vegetal se efectúa un protocolo de desinfección con ayuda de una solución jabonosa aplicada durante 5 minutos, seguido de un lavado de agua destilada durante 3 minutos, y finalizando con hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos, para posteriormente utilizar 3 enjuagues de agua destilada previamente esterilizada, por un periodo de 3 minutos y secado con toallas absorbentes esterilizadas (Chacín et al., 2013). Por otra parte, en el caso de las muestras correspondientes a material foliar se procede a recolectar las porciones afectadas de tejido vegetal de la parte aérea de la planta, aplicando el mismo protocolo de desinfección, una vez culminado el proceso se coloca en una cámara húmeda previamente preparada con un fondo de papel absorbente humedecido con agua destilada anteriormente esterilizada, una malla plástica desinfectada y conservado al interior de una hielera preparada para mantener una temperatura alrededor de los 5°C.

Después de aplicar el protocolo de desinfección presentado por Chacín (2013) se da lugar a la siembra del tejido preparado en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), hasta finalizar con 4 siembras en PDA de las muestras vegetales y seguidamente se dio paso a la siembra sucesiva de los microorganismos para aislarlos procediendo a la caracterización macroscópica y microscópica. A continuación, las réplicas conseguidas se seleccionan micelios y se replicarán en medio de cultivo Agar-centeno, para dar paso a la evaluación antifúngica de los extractos.

La elaboración del Agar-centeno como parte fundamental en el desarrollo de esta investigación se elaboró en base a información bibliográfica contenida en documentos de apuntes de campo y ajustado a parámetros empíricos que otorgan el exitoso resultado esperado para el aislamiento del género *Phytophthora* sp, para lo cual se detallan los siguientes pasos:

- A 60 g de semilla de centeno de buena calidad aplicar un prelavado con agua destilada y posteriormente dejar en remojo con 500 ml agua destilada esterilizada durante 24 horas.

- Transcurridas 24 horas de remojo se da paso a separar las semillas de centeno del agua y colocamos esta última en un lugar para utilizarla más adelante.
- La semilla obtenida del remojo se procede a licuar con 500 ml de agua destilada esterilizada a velocidad media durante 3 minutos para seguidamente colocar dentro de un frasco boeco el licuado y este se lo traslada a baño María durante 3 horas a 50°C, con ligeras agitaciones manuales del contenido cada 30 minutos, exceptuando la última media hora para permitir una sedimentación del material.
- Una vez terminado el proceso de cocción se da paso al filtrado del sobrenadante mediante el uso de una gasa de 6 capas sin dejar caer el sedimento del fondo.
- El resultado debe ser cercano a 400 ml de material líquido filtrado al cual se añade los 500 ml de agua de centeno remojada obtenido al inicio del proceso y se afora a 1 L con agua destilada esterilizada.
- A continuación, el litro de sustancia obtenido separamos en dos partes 700 y 300 ml, de las cuales en los 700 ml añadimos 15 g de agar-agar y 20 g de sucrosa, para enviar al Auto-clave por un tiempo de 20 minutos a 120°C.
- Finalmente se retira del equipo de autoclavado la muestra de 300 ml de preparado, dejando al interior del equipo la de 700 ml para evitar la solidificación de este último, es así que, continuando con el enfriamiento de los 300 ml se añade a este un mix de antibióticos (Rifampicina 20 mg/L, Polimixina B sulfato 50 mg/L, Ampicila 200mg/L) y se mezcla con los 700 ml restantes para posteriormente dispensar en cajas Petri.

4.2.4. Extracción de ADN del Fitopatógeno para Caracterización Molecular

Para la extracción de ADN que permitió el análisis molecular correspondiente, se aplicó el protocolo “E.Z.N.A. Protocolos del mini kit de ADN fúngico”, el cual es un método simplificado que permite el aislamiento rápido de ADN de muestras frescas, congeladas o secas para su uso en reacciones de PCR. El procedimiento limita la cantidad de material de partida y hace uso de los siguientes materiales y equipos:

- Microcentrífuga capaz de generar al menos 10 000 xg
- Libre de nucleasas 2 ml. tubos de microcentrífuga (Cat# SSI-1310-00)
- Baño de agua capaz de 65°C

- Isopropanol 100% etanol
- Nitrógeno líquido
- B-mercaptoetanol Opcional: 3M NaOH

4.2.5. Técnica de Antibiógrama con Sensidiscos Humedecidos

Para la evaluación de la capacidad antifúngica del extracto de propóleo, se aplicó la técnica de antibiógrama con sensidiscos, los cuales fueron humectados con diluciones del EEP tomando como referencia las concentraciones utilizadas en la metodología empleada por Pineda et al., (2010) quien en su protocolo aplicó concentraciones referidas del 0%, 15%, 20% y 30%, siendo que una dilución de 20 g de propóleo por cada 100 ml de etanol al 96% corresponde al 100% de EEP en su investigación, por lo cual ante el desarrollo del presente ensayo, para poder evaluar los efectos antifúngicos se establecen las siguientes dosis: 20 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96% (100% EEP), 15 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96% (75% EEP), 10 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96% (50% EEP), 5 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96% (25% EEP), a una temperatura ambiental constante de 17°C.

El tiempo de evaluación se establece en base a la referencia de la investigación presentada por Pineda et al., (2010) en donde la duración del ensayo se verá relacionada con el periodo en el cual el agente fitopatógeno colonice totalmente el medio de cultivo del tratamiento determinado como testigo y los demás tratamientos presenten una estabilidad del halo inhibición.

El porcentaje de inhibición se determinará empleando la ecuación de porcentaje:

$$\% I = \left(\frac{P}{B} \right) * 100$$

Dónde: I es el porcentaje (%) de inhibición, P es el promedio del crecimiento en mm de cada tratamiento y B es el blanco absoluto (sin tratamiento). Se emplea entonces como control etanólico al 96%.

4.2.6. Tratamientos

Considerando como referencia las dosis utilizadas en investigaciones similares por Pineda et al., (2010), la eficacia del extracto etanólico de propóleo, se evalúa mediante la dilución en diferentes concentraciones, considerando también un producto de control efectivo para comparar a la acción de control ejecutada entre los elementos de estudio, estableciendo de esta forma los tratamientos de la siguiente manera:

Tabla 1

Esquema de los tratamientos aplicados en la investigación

Tratamiento	Código	Descripción
1	T0	Etanol al 96%
2	T1	Dilución de principio activo Metalaxil (2.50 g/100 ml de agua destilada)
3	T2	Dilución de propóleo al 100% (20 g/100 ml de etanol al 96%)
4	T3	Dilución de propóleo al 75% (15 g/100 ml de etanol al 96%)
5	T4	Dilución de propóleo al 50% (10 g/100 ml de etanol al 96%)
6	T5	Dilución de propóleo al 25% (5 g/100 ml de etanol al 96%)

Nota: Se detalla la dilución de los tratamientos a implementar durante el desarrollo del ensayo, en la cual para la dilución del principio activo se hace uso de la dosis establecida en la ficha técnica del producto.

4.3. Variables de estudio

Variables Independiente

- Diluciones de extracto etanólico de propóleo (20, 15, 10 y 5 g/100 ml de etanol al 96%)
- Dilución principio activo Metalaxil en dosis comercial (2.50 g/100 ml de agua destilada)

Variables dependientes

- Desarrollo en milímetros del micelio de *Phytophthora* sp.
- Halo de inhibición formado por diluciones de propóleo y Metalaxil.
- Unidades formadoras de colonia (UFC)

4.4. Diseño Experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) debido a que el material y el entorno experimental se trata de un entorno controlado al desarrollarse en condiciones de laboratorio. Se aleatorizó a nivel de todo el ensayo los 6 tratamientos establecidos y se determinaron tres observaciones, obteniendo 18 unidades experimentales constituidas por las cajas Petri, en las que se realizó las inoculaciones del agente fitopatógeno y los sensidiscos con los diferentes tratamientos establecidos.

4.4.1. Unidad Experimental.

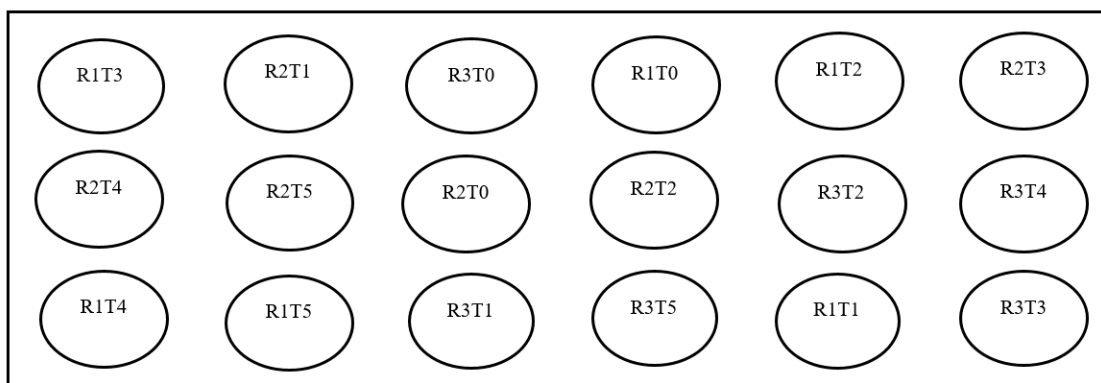
La unidad experimental se encuentra establecida por una caja Petri con 20 ml de medio de cultivo agar-centeno, la cual presenta un fragmento de cultivo de *Phytophthora* sp purificado, conteniendo a su vez tres sensidiscos previamente empapados de la solución destinada a ser evaluada como controlador.

4.4.2. Distribución e Identificación de las Unidades Experimentales.

El área destinada al experimento corresponde a 1 m² de los stands del área restringida del laboratorio de biotecnología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, ubicados de forma aleatoria de acuerdo al diseño completamente al azar como se muestra establecidos en la figura 2.

Figura 2

Distribución de las unidades experimentales del ensayo



4.4.3. Fase Desarrollada en Laboratorio

Una vez establecida las 18 cajas Petri que representan las unidades experimentales, se procede en el interior de la cámara de flujo laminar, dispensar en cajas Petri de 10 cm de

diámetro 20 ml de medio de cultivo agar-centeno, para una vez gelificado introducir un fragmento de 1 cm² *Phytophthora* sp purificado, y simultáneamente colocar 3 sensidiscos de grado MN 640 previamente empapados con soluciones de control (diluciones de propóleo y Metalaxil).

Se establece la temperatura de la habitación en 17°C y se mantiene en reposo cada caja para evaluar cada 24 horas el crecimiento del micelio de *Phytophthora* sp y el efecto del halo de inhibición generado por los elementos controladores.

4.5. Procesamiento de Datos y Análisis Estadístico

4.5.1. Análisis Estadístico

Los datos se evalúan mediante la aplicación de un análisis de varianza ADEVA, posteriormente se hace uso de la prueba Tukey al 5% con la ejecución del programa de cálculo estadístico de software libre R-Studio para el análisis y comparación entre las diferentes dosis que se aplican en el ensayo.

4.5.2. Esquema de Análisis ADEVA.

Tabla 2

Esquema de análisis ADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	n - 1 = 17
Tratamientos	t - 1 = 4
Observaciones	o - 1 = 2
Error experimental	(t-1)(o-1)= 8

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización Morfológica de *Phytophthora* sp.

Se recolectaron muestras de tejidos vegetales como hojas y raíces de plantas que presentasen sintomatología de podredumbre de raíz, de los cuales se aislaron fragmentos de cada tejido en cajas Petri con medio de cultivo PDA y purificados en Agar Centeno tal como lo establece Toapanta (2013) en su trabajo de investigación “**Identificación molecular de *Phytophthora* spp. en el cultivo de Aguacate (*Persea americana* M.), de las principales zonas productoras del Ecuador**”, donde se establece como medio de cultivo selectivo para el desarrollo del género *Phytophthora* al Agar-Centeno, ya que este presenta mejores condiciones de desarrollo y por ende facilita la caracterización posterior a nivel morfológico.

En la figura 3. Se registran las muestras analizadas bajo el microscopio óptico en un lente de 40X, con lo que se permite apreciar su estructura y ciertas características morfológicas que serán evaluadas a continuación.

Figura 3

Identificación morfológica del fitopatógeno bajo el microscopio



Nota: *Phytophthora* sp en fase sexual: (a) esporangio papilado con pedicelos cortos y caducos; (b) esporangios en esporangioforos.

Una vez completado el proceso de aislamiento del posible fitopatógeno, tiene lugar la identificación de las características morfológicas de la potencial muestra de *Phytophthora* sp. donde de acuerdo a Fernández et al., (2018), a nivel de visualización por microscopio, el desarrollo de este organismo presenta una formación ovoide a elipsoidal, concordando con la investigación presentada por Calvo (2016) “**Control químico in vitro de *Phytophthora* sp agente causal de la mancha negra en el cultivo de cacao**”, quien afirma que su morfología se caracteriza por ser en forma ovoide producida en sucesión, además de presentar esporangios incoloros o levemente amarillento.

5.2. Caracterización molecular de *Phytophthora* sp.

A partir de la extracción de ADN realizada de las muestras purificadas del agente fitopatógeno, dicho material genético fue enviado al laboratorio de análisis molecular, el cual se establece como una empresa de biotecnología de Corea del Sur, encargada de desarrollar la secuenciación y caracterización molecular de material genético, estableciendo como se indica en la tabla 3.

Tabla 3

Resultados de análisis molecular realizados por empresa certificada

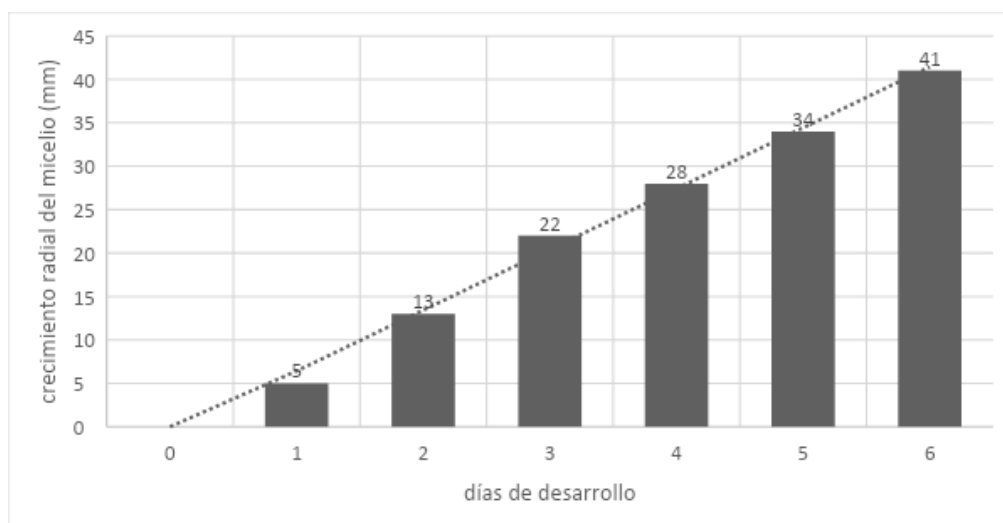
Microorganismo	Similitud	Número de accesión	Base de datos
<i>Phytophthora infestans</i>	98.05%	ON705717.1	NCBI

5.3. Crecimiento del micelio en medio de cultivo

Según figura 4. Se establece el desarrollo del micelio registrado en milímetros, manteniendo un crecimiento regular durante los primeros seis días posterior a la siembra en medio de cultivo.

Figura 4

Desarrollo del micelio de *Phytophthora* en medio de cultivo agar-centeno



Nota: Registro del desarrollo del micelio registrado cada 24 horas durante un periodo de 6 días continuos a partir de la siembra en el medio de cultivo.

Calva (2016) da a conocer en la investigación “**Control químico in vitro de *Phytophthora* sp agente causal de la mancha negra en el cultivo de cacao**” que en el aislamiento de *Phytophthora* sp. El promedio alcanzado en el desarrollo del micelio a los seis días es de 45 mm mientras que en el resultado obtenido en el ensayo establecido tal como se muestra en la figura 4. es de 41 mm lo cual corresponde a valores cercanos a los resultados aportados por Calva (2016), por lo que se le atribuye la variación de datos a las condiciones locales en las cuales fueron establecidos cada experimento, más sin embargo consideran resultados cercanos entre sí.

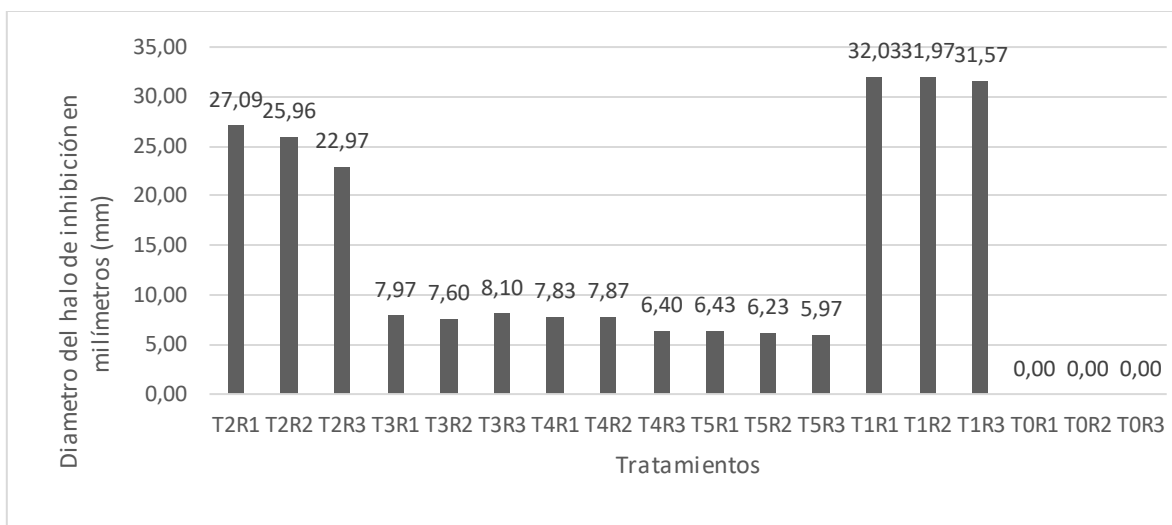
5.4. Evaluación de la Actividad Antifúngica del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) Mediante la Prueba de Antibiograma con Sensidiscos Humedecidos

El registro del diámetro de los halos de inhibición se realizó durante un periodo de 3 días posterior a los 12 días de desarrollo y colonización completa en el medio de cultivo de las cepas purificadas de *Phytophthora* sp, considerando como base la inhibición formada por el agente de control positivo, obteniendo el resultado presentado en la figura 5, en la cual se

establece el halo de inhibición formado de manera estable y sin cambio por los sensidiscos humedecidos con las diferentes concentraciones de propóleo, control químico y el testigo.

Figura 5

Actividad antifúngica de diferentes concentraciones de propóleo



Nota: En la figura se representa el halo de inhibición formado por los diferentes tratamientos, en los cuales se evidencia que el tratamiento T0 a base de etanol al 96% no desarrolló ningún efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo.

En la figura 5 se detalla el registro del halo de inhibición formado por los sensidiscos humedecidos con diferentes concentraciones de propóleo, donde se evidencia un mayor control en el crecimiento de *Phytophthora* sp. en el T2, correspondiente a una concentración de 20 g/100 ml de etanol al 96%, siendo superado por el T1, el cual corresponde al control químico de una dilución de Metalaxil de 2.50 g/100 ml de agua destilada, adicional se evidencia como en una menor concentración de EEP el halo de inhibición por debajo de 15 g/100 ml de etanol al 96%, expresa una gran disminución respecto al control antagónico esperado.

Para evaluar la eficacia del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) sobre el desarrollo in vitro de *Phytophthora* sp se procedió a calcular el porcentaje de inhibición de los tratamientos efectuados, con la utilización de la ecuación de porcentaje citada en el punto 4.2.5. considerando para el resultado del halo de inhibición formado, un promedio obtenido a partir del promedio

de las repeticiones correspondientes a cada tratamiento, estableciendo una comparación con el testigo y diferentes tratamientos, tal como se presenta en la tabla 4 a continuación:

Tabla 4

Resultados del porcentaje alcanzado por el halo de inhibición de los diferentes tratamientos

Tratamiento	Promedio de halos de inhibición (mm)	Control positivo T0 (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
T1	31,86	00,00	31,86
T2	25,34	00,00	24,34
T3	7,89	00,00	7,89
T4	7,37	00,00	7,37
T5	6,21	00,00	6,21

Nota: El porcentaje de inhibición con mayor resultado corresponde al T1 que equivale al control químico con principio activo Metalaxil, seguido del T2 que corresponde a una dilución de extracto etanólico de propóleo de 20 g/100 ml de etanol al 96%.

El tratamiento 1 (T1) como se indica en la tabla 4 es el que se expresa con un mayor porcentaje de halo de inhibición, debido a que se trata del control químico con principio activo Metalaxil, el cual según da a conocer el Manual de Plaguicidas de la Universidad de Costa Rica (IRET, 2020) actúa de modo sistémico, curativo y protector, inhibiendo la síntesis de proteínas interfiriendo con la síntesis de ARN ribosomal, estableciendo de esta manera un control más específico en el desarrollo del agente patógeno de estudio, seguido del tratamiento 2 (T2) el cual corresponde a una dilución de propóleo de 20 g/100 ml de etanol al 96% de etanol, donde se aprecia un porcentaje de inhibición del 24.34% para el desarrollo de *Phytophthora* sp. esto generado por la composición de los principios activos presentes en las muestras de propóleo, donde Huang et al., (2014) expresan que debido a los compuestos flavonoides como principal constituyente estructural, este presenta un amplio espectro de propiedades biológicas como efectos antibacterianos y antifúngicas, los cuales son aprovechados dentro del campo médico e investigativo en general, dando así información sobre la acción del extracto etanólico de propóleo como inhibidor de desarrollo de agentes fitopatógenos, como lo expresan Manzo et

al., (2018), en su estudio “**Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleo**” en una concentración de 50 g/100 ml de etanol al 96% de etanol al 96% se obtiene una respuesta de inhibición del 45.1% a los 15 días de desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*, mientras que a una concentración más baja, en el mismo tiempo se obtiene una inhibición de 27.6%.

5.5. Evaluación estadística de la actividad antifúngica del extracto etanólico de propóleo

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de los tratamientos implementados sobre el control in vitro de *Phytophthora* sp se procede a aplicar el programa estadístico R-studio, empleando un Test de normalidad, para lo cual se aplicó el comando Shapiro-test que corresponde a la prueba Shapiro-Wilk, donde el valor $p\text{-value} = 0.17$ lo cual establece que existe una distribución normal de datos, a continuación se verifica la homogeneidad de las varianzas con una Prueba Barlett.Test, en la que se obtiene un $p\text{-value} = 0.99$ estableciendo de esta manera que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que de manera estadística existen diferencias significativas en los tratamientos, con lo que se da paso al análisis de varianza ADEVA, aplicando un Diseño Completamente al Azar.

Tabla 5

Análisis ADEVA sobre el diámetro del halo de inhibición de EEP contra Phytophthora sp.

FV	GL	SC	CM	F0	F0.05	
Tratamientos	5	2342	468.4	645.07	$3e^{-12}$	***
Observaciones	2	3.6	1.8	2.481	0.133	
Error	10	7.3	0.7			
Total	17					
CV (%)	6.45					

Nota: Códigos de significancia = 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’1; F.V: Fuentes de variación, G.L: Grados de libertad, S.C: Suma de cuadrados, CM: Cuadrados medios, Fo: valor de F calculado, F0.05: valor de F tabulado al 5% con un 95% de valor alfa de confiabilidad, ***: Altamente significativo.

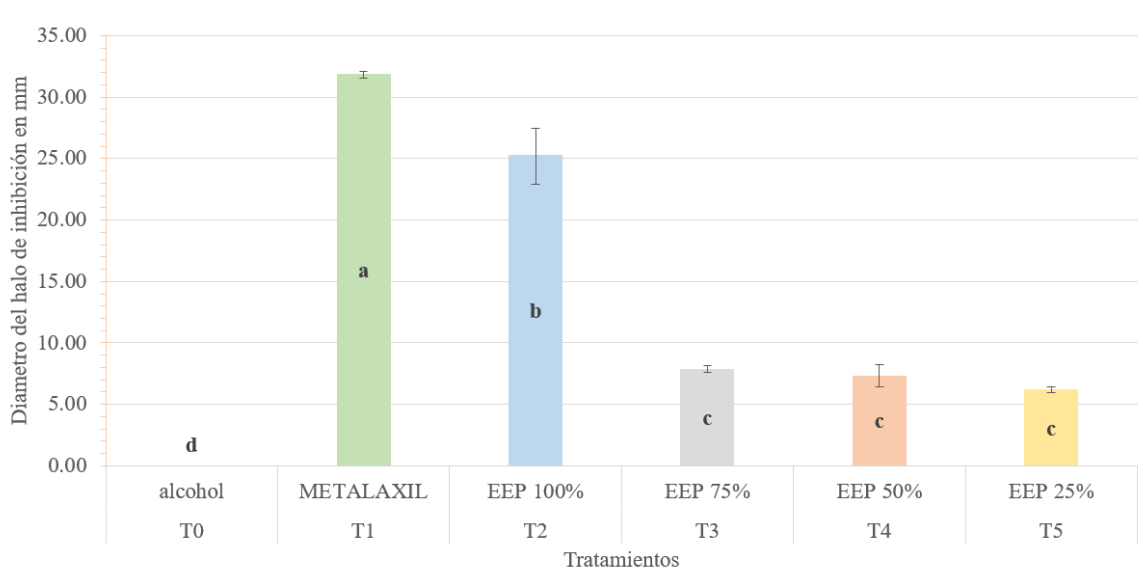
A continuación, se presenta en la figura 6 el grafico de caja correspondiente a la comparación de los 6 tratamientos para el análisis de la variable del diámetro del halo de inhibición, expresando dentro de las distribuciones las variables de inhibición y la serie

correspondiente a cada tratamiento, en lo cual se destaca que el mejor tratamiento para el control de *Phytophthora sp* corresponde al tratamiento T1 que es el correspondiente al que contiene el principio activo Metalaxil, seguido por el tratamiento T2 que corresponde a una dilución de Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) de 20 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96%,

Finalmente, mediante la aplicación de la prueba Tukey al 5% se obtiene un coeficiente de variación $CV = 6.45\%$, con lo que se afirma que existe una baja variación de datos, por lo que se confirma la confiabilidad y diferencias altamente significativas, obteniendo la formación de 4 rangos, donde se establece el rango A al tratamiento que presenta mayor formación del halo de inhibición el cual corresponde al control positivo (T1) que utiliza al principio activo Metalaxil, seguido del rango B, el cual utiliza como tratamiento a la dilución de propóleo 20 g/100 ml de etanol al 96% (T2), evidenciando que los controles menos efectivos son los tratamientos T3, T4 y T5 ubicándose en el rango C ya que a nivel estadísticos no representan diferencias significativas y ubicando en el rango D al tratamiento testigo (T0), el cual utiliza etanol al 96%, siendo este el menos efectivo para inhibir el crecimiento de *Phytophthora sp*.

Figura 6

Medidas del diámetro del halo de inhibición de los tratamientos aplicados contra *Phytophthora sp*.



Nota: T0= Alcohol Etílico 96% (Testigo), T1= 2.50 g del principio activo Metalaxil diluido en 100 ml agua destilada, T2= 20 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96%, T3= 15 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96%, T4= 10 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96%, T5= 5 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96%.

La efectividad el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP), comprobada en investigaciones similares a nivel in vitro contra fitopatógenos, es reportada por Khalil et al., (2022) en su trabajo de investigación titulado **“Biochemical activity of propolis alcoholic extracts against fusarium oxysporum hm89. Egyptian Journal of Botany”** donde se comprobó que la actividad bioquímica de EEP ante *Fusarium oxysporum* a nivel de laboratorio, desarrolló satisfactoriamente una inhibición en el crecimiento de este hongo en un 32.8%, expresando así un valor obtenido como se explica en la tabla 4, donde el resultado de una concentración de EEP de 20 mg/100 ml de etanol al 96% generó una inhibición del 24.34%, verificando la eficacia como inhibidor de ciertos agentes fúngicos que pueden llegar a comprometer la salud de un cultivo.

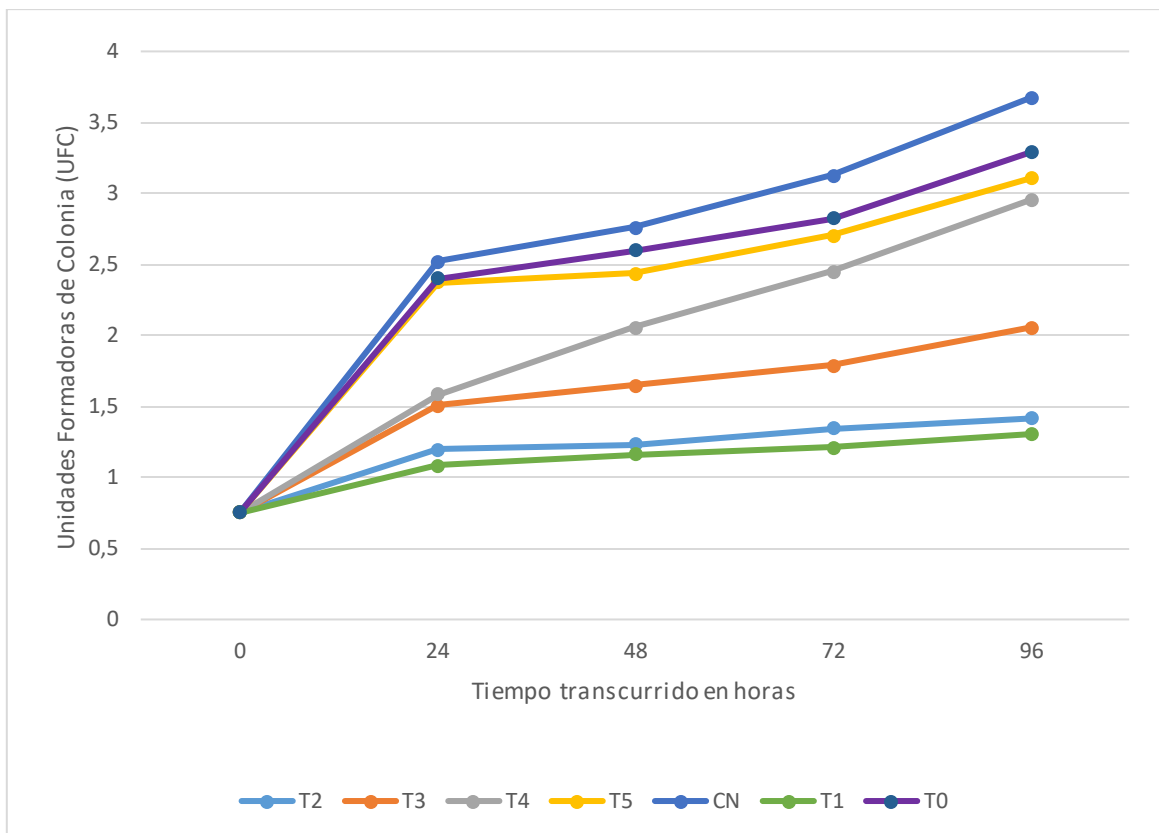
Finalmente, dentro del ensayo se evidencia en la figura 6 como el efecto inhibitorio mayor del EEP corresponde a la mayor concentración utilizada dentro del ensayo debido a como lo expresa Silva et al., (2018) quienes confirman que ante agentes fitopatógenos que ataquen a cultivos comerciales, determinados elementos presentes en la estructura del propóleo como son compuestos conocidos como flavonoides, fenoles y estéres actúan de manera efectiva para controlar la proliferación de ciertos oomicetos o microorganismos similares que puedan llegar a comprometer la seguridad de un cultivo de interés comercial, estableciendo que un mayor estudio dentro de este campo puede abarcar nuevas alternativas para el tratamiento de ciertas enfermedades provocadas por distintos agentes fitopatógenos.

5.6. Evaluación de UFC por espectrofotometría de la actividad antifúngica del extracto etanólico de propóleo

En la figura 7 se expresa el resultado mediante espectrofotometría de las UFC desarrolladas en condiciones controladas de laboratorio durante 96 horas (27°C y 70% humedad relativa constante), a partir de muestras purificadas en estado de esporulación en caldo nutritivo, evaluando la correlación entre las UFC y los diferentes agentes de control como es el principio activo Metalaxil y las diferentes concentraciones extracto etanólico de propóleo.

Figura 7

Correlación de la curva de crecimiento de UFC de *Phytophthora sp* y agentes de control como el principio activo Metalaxil y diluciones de EEP



Nota: T0= Alcohol Etílico 96% (Testigo), T1= 2.50 g del principio activo Metalaxil diluido en 100 ml agua destilada, T2= 20 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96%, T3= 15 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96%, T4= 10 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96%, T5= 5 g del propóleo diluido en 100 ml de etanol al 96%, CN = Caldo nutritivo sin ningún agente de control.

En la figura 7 se detalla la curva de crecimiento obtenida mediante la aplicación de espectrofotometría, en la cual se puede evaluar que el efecto inhibitorio del EEP funciona de forma eficaz para la formación de UFC de agente fitopatógeno *Phytophthora sp*, ya que al evaluar la correlación existente entre el tiempo transcurrido y la concentración de los agentes de control (Metalaxil y EEP), se expresa una clara diferencia entre el tiempo transcurrido y los tratamientos utilizados, evidenciando que para el tratamiento T1 y T2 la UFC de *Phytophthora sp* presenta un menor crecimiento o desarrollo de colonias, mientras que en los tratamientos T3,

T4, T5 y el adicional para este caso CN, es apreciable el incremento significativo de las UFC conforme disminuyen las concentraciones de EEP y el principio activo, esto debido a la características antimicóticas, antimicrobianas y antioxidantes que expresa el EEP, tal como lo da a conocer Carrera (2016), en su trabajo de investigación “**Evaluación del extracto etanólico de propóleo como conservante en queso cabaña**” , donde se identifica que la capacidad inhibitoria del EEP actúa de suma importancia en la industria alimenticia, ya que diversos ensayos desarrollados dentro del margen de esta investigación comprueban la eficacia para controlar el desarrollo de agentes patógenos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Se estableció la presencia de *Phytophthora* sp en muestras de material vegetal recolectado correspondientes a muestras foliares de *Solanum Lycopersicum* L, el cual presentaba la sintomatología característica de la enfermedad, caracterizándose por su morfología detallada a través del microscopio y verificando mediante análisis moleculares que el agente presente corresponde a *Phytophthora infestans*.
- Mediante ensayo se puede verificar la eficacia del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) ante el desarrollo del agente fitopatógeno *Phytophthora* sp, ya que el control efectuado sobre este se expresa de mejor manera en el tratamiento 2 (T2), que corresponde a una dilución de EEP de 20 g/100 ml de etanol al 96%, el cual a los 15 días expresa un halo de inhibición en el medio de cultivo de 24,34% además que esta concentración generó un efecto positivo en el control para el desarrollo de UFC del agente fitopatógeno.
- El extracto etanólico de propóleo se establece como una opción de control para el desarrollo de agentes fitopatógenos como es el caso de presente estudio realizado, el cual, si bien no presenta estudios iguales de confrontación para desarrollar una discusión de EEP contra *Phytophthora* sp, se hace uso de investigaciones de similar interés, donde también se expresa una efectividad como controlador antifúngico y biocontrolador en otras áreas de investigación, por lo cual se da crédito a la capacidad como un bioactivo de amplio uso en el sistema productivo.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Basado en el resultado del efecto de inhibición por parte de la dilución del extracto etanólico de propóleo, se recomienda evaluar la eficacia en dosis más elevadas de este elemento, puesto que se pudo evidenciar como en una menor concentración el efecto disminuye drásticamente, verificar si en una concentración más alta el efecto de control se logra optimizar de una manera más eficiente.
- Dentro de los resultados obtenidos se puede confirmar que la eficacia del EEP sobre el agente fitopatógeno *Phytophthora infestans* es evidente, por lo que se recomienda desarrollar la siguiente etapa que corresponde a una fase de campo, evaluando los factores que intervienen dentro de la producción como control fitosanitario.
- Estudiar los efectos que la aplicación de EEP genera en un cultivo una vez este es introducido como parte del proceso de control fitosanitario, para de esta manera establecer la relación costo beneficio al introducir este producto como parte del sistema productivo de un cultivo.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez , J., Vite, H., Garzón, V. y Carvajal, H. (2021). Análisis de la producción de aguacate en el Ecuador y su exportación a mercados internacionales en el periodo 2008 al 2018. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, Vol. 4(S1), 164-172. <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/424/444>
- Castaño, J. y Leal, J. (2017). Manejo integrado de la pudrición de raíces del aguacate (*Persea americana* Miller), causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Temas Agrarios*, Vol. 23(2), 131-143. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6638369.pdf>
- Calvo, C. (2016). *Control químico in vitro de Phytophthora sp agente causal de la mancha negra en el cultivo de cacao*. [Trabajo de titulación, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio institucional UTMACH. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/7637/1/DE00028_TRABAJODETITULACION.pdf
- CERTIS (28 de junio del 2021). *Noticias y actualidad agrícola, Phytophthora: aprende a prevenir y controlar esta enfermedad*. <https://www.certiseurope.es/noticias/detalle/news/phytophthora-aprende-a-prevenir-y-controlar-esta-enfermedad>
- Chaillou, L. y Nazareno, M. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina related to their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 42 (2009), 1422–1427. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0023643809000668?token=01DA7CC4F58CC1D550B0017F66CE6F31FDEAE478E7DFA9B41F957A85485700AC78848C602DA247AAA9508C283D4DF325&originRegion=us-east-1&originCreation=20220725174421>
- Chacin, A., Blanco, M., Sanchez, S e Isidro, C. (2013). Evaluación a nivel de laboratorio del efecto de 7 extractos vegetales para el control de *Colletotrichum sp* agente causal de la antracnosis en el cultivo de tomate de árbol. *Innovaciencia*. 30-35.
- Carrera, H. (2016). Evaluación del extracto etanólico de propóleo como conservante en queso cabaña. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.

<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/913c8004-5f67-498c-85e4-164318d5feaf/content>

- Cruz, J., Hernández, V., Sánchez, L. y Fuentes, L. (2021). Alternativas de control biorracionales sobre *Phytophthora* infestans, fitopatógeno causante de la gota en papa. *Nova*, Vol. 19(36), 31-48. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v19n36/1794-2470-nova-19-36-31.pdf>
- Drenth, A. y Guest, D. (2013). *Phytophthora*: la destructora de plantas. *Palmas*, Vol. 34. (1), 49-56.
<https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/download/10666/10651>
- ECHA (2020). Métodos in vitro. European Chemical Agency. Recuperado 20/06/2022 de: <https://echa.europa.eu/es/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/in-vitro-methods>
- Elliott, M. (2017). *Identificación de Síntomas Causados por Phytophthora*. WSU Puyallup Research and Extension Center. Taller de Buenas Prácticas de Manejo en Viveros: Sanidad con Vapor e Identificación de Enfermedades. [Diapositiva de PowerPoint]. https://s3.wp.wsu.edu/uploads/sites/410/2017/03/04-Phytophthora-id_SPANISH_Final.pdf
- Fernández, Y., Lachenaud, P., Decock, C., Díaz, A., y Noryaisi, R. (2018). Caracterización de *Phytophthora*, agente etiológico de la pudrición negra de la mazorca del cacao en Cuba y Guyana Francesa. *Revista Centro Agrícola*. Vol. 45(3), 17-26. <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v45n3/0253-5785-cag-45-03-17.pdf>
- García, J., Cantón, R., Gómez, L., Martínez L., Rodríguez, C. y Vila, J. (2000). *Procedimientos en microbiología clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. [Archivo PDF]. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Gerrero, M. y Ramos, A. (2016). Prevenga y maneje la pudrición radical del aguacate causada por el Oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Publicación del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA*. <https://www.ica.gov.co/getattachment/41201ed4-e8b1-4503-b25c-92de40f5d2f4/Prevenga-y-maneje-la-pudricion-del-aguacate-causad.aspx>

Huang, S., Zhang, C., Wang, K., Li, G. y Hu, F. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* 2014, 19(12), 19610-19632.

<https://doi.org/10.3390/molecules191219610>

IRET. (2020). Manual de Plaguicidas de Centroamérica, Universidad Nacional de Costa Rica.

<http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/373-metalaxil#:~:text=Modo%20de%20acci%C3%B3n%20sist%C3%A9mico%20curativo,Estable%20hasta%20300%20%C2%BA>.

Khalil, N. M., Ali, H. M., & Ibrahim, A. E. (2022). Biochemical activity of propolis alcoholic extracts against fusarium oxysporum hm89. *Egyptian Journal of Botany*, 62(1), 197-212. doi:10.21608/ejbo.2021.74897.1687

Leal, J., Castaño, J. y Bolaños, M. (2014). Manejo de la pudrición radical (*Phytophthora cinnamomi* Rands) del Aguacate (*Persea americana* Linneo). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, Vol. 17(1), 105-114. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262014000100012&lng=en&tlng=es.

Manzo, G., Pérez, R., Chan, W., Silva, E., Sánchez, J., Ayala, M., Galindo, E. (2018). Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleo contra *Mycosphaerella fijiensis*: un estudio in vitro. *Scientia Fungorum*. vol. 47: 13-24.

<https://www.scielo.org.mx/pdf/sf/v47/2594-1321-sf-47-13.pdf>

Manrique, A. (2006) Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Tropical*. Vol. 24(1): 43-53.

<http://www.bioline.org.br/pdf?zt06004#:~:text=Los%20resultados%20obtenidos%20muestran%20que,Staphylococcus%20aureus%20y%20Micrococcus%20luteus>.

Pineda, J., Principal, J., Barrios, C., Milla, D., Solano, Y., y Gil, E. (2010). Propiedad fungistática in vitro de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Zootecnia Tropical*, Vol. 28(1), 83-91.

<http://ve.scielo.org/pdf/zt/v28n1/art11.pdf>.

- Vargas, R., Torrescano, G., Mendoza, W., Vallejo, G., Acedo, F., Sánchez, J., Peñalba, M. y Sánchez, A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biotecnia*, Vol. 16(1) 32-37.
<https://biblat.unam.mx/hevila/Biotecnia/2014/vol16/no1/6.pdf>
- SENASICA (2021). *Ficha técnica para el diagnóstico de: Phytophthora fragariae, P rubi, P.citricola, P.erythroseptica en cultivos de fresa y frambuesa*. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. México.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/723930/36_Ficha_tcnica_Phytophthora_frutillas.pdf
- Silva-Castro, I., Martín-García, J., Diez, J. J., Flores-Pacheco, J. A., Martín-Gil, J., & Martín-Ramos, P. (2018). Potential control of forest diseases by solutions of chitosan oligomers, propolis and nanosilver. *European Journal of Plant Pathology*, 150(2), 401-411. doi:10.1007/s10658-017-1288-4
- Soto, A., Rodríguez, G., Fernández, Y., Pedraza, M., López L., Celaya, M. y Fernández, S. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Vol. 8(8), 1867-1880. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>.
<http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/708/560>
- Tello, C., Ochoa, J., Angamarcar, H., Cuvi, M., Realpe, J., Sierra, N., y Pozo, M. (2019). *Desarrollo de principios de manejo del tizón tardío (Phytophthora infestans) de la papa en Ecuador*. En Libro de memorias: VIII Congreso ecuatoriano de la papa: Artículos del Evento (pp. 47-48). Quito, Ecuador: Editorial IDEAZ.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5353/1/iniapsc382h.pdf>
- Toapanta, D. (2013). *Identificación molecular de Phytophthora spp. En el cultivo de aguacate (persea americana mill.) De las principales zonas productoras de ecuador*. [Tesis de posgrado].
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1144/1/T-UCE-0004-5.pdf>
- Torres, E. (2017). *Plagas y enfermedades del cultivo de aguacate*. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. [Diapositiva PowerPoint].
https://www.icia.es/icia/download/noticias/Eduardo_Torres.pdf
- Vázquez, M. (2020). *Pruebas de sensibilidad o antibiogramas*. MSD Manuals.

https://www.msdmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/diagnostico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas#v998442_es

ANEXOS

Anexo 1 Recolección de propóleo de la granja experimental ECAA



Anexo 2 Maceración de propóleo recolectado



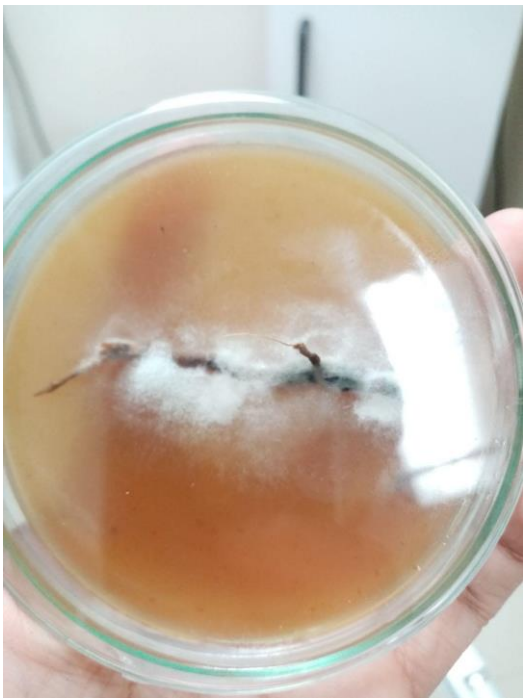
Anexo 3 Recolección de muestras de raíz de ejemplares con sintomatología de *Phytophthora* sp



Anexo 4 Siembra de muestras de tejido vegetal en PDA



Anexo 5 Siembra de muestras de tejido vegetal con crecimiento de hongo



Anexo 6 Caracterización morfológica del agente patógeno en microscopio



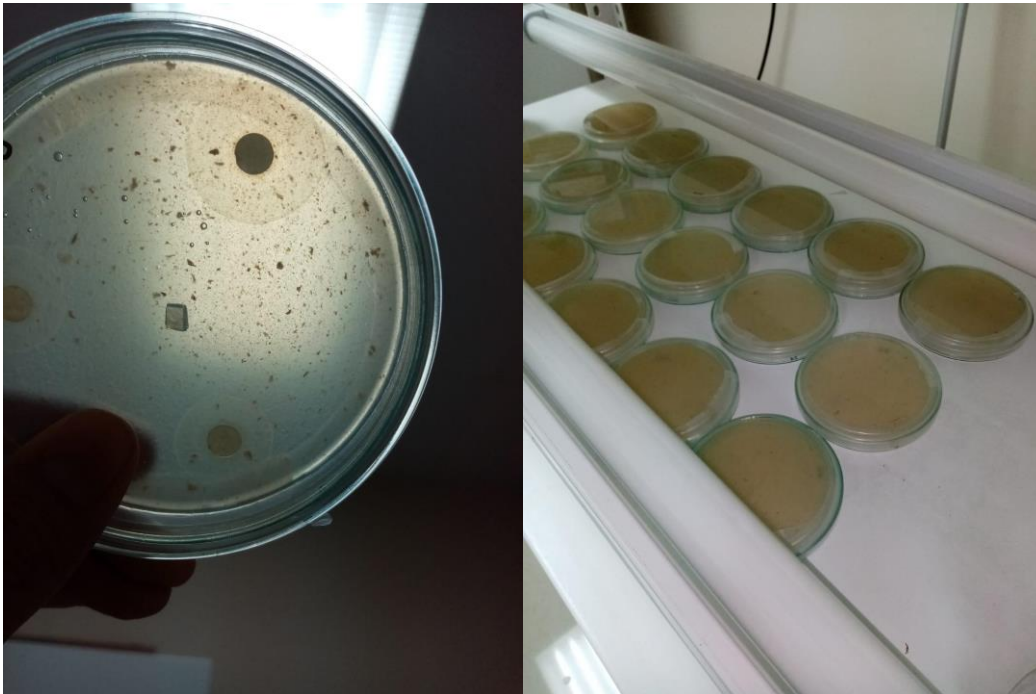
Anexo 7 Purificación de *Phytophthora* sp en agar centeno



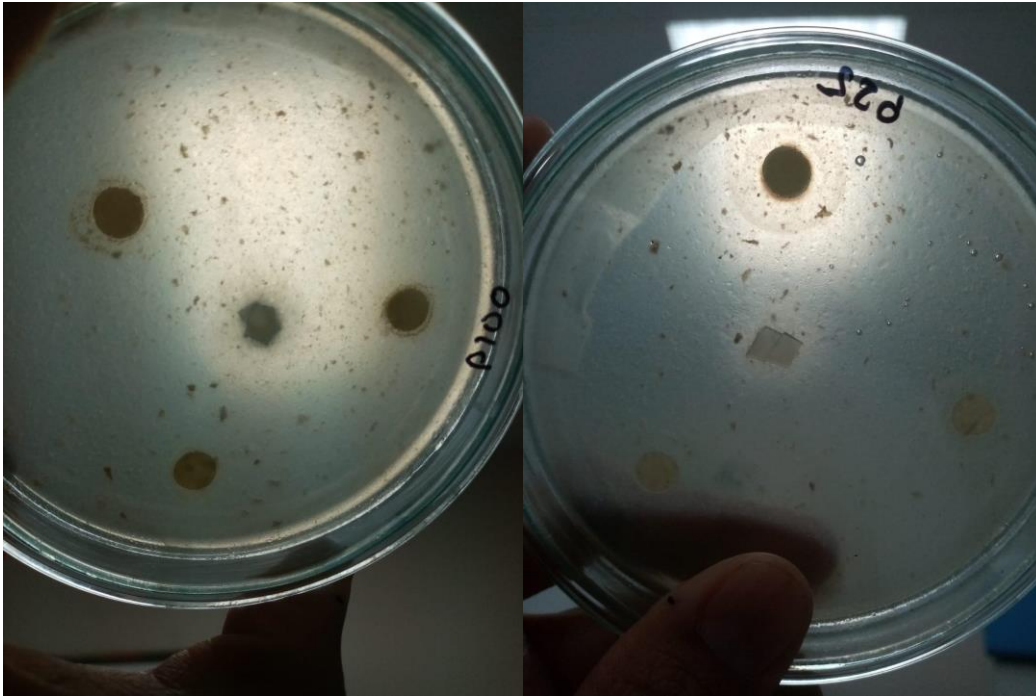
Anexo 8 Preparación de sensidiscos



Anexo 9 Establecimiento de diseño experimental



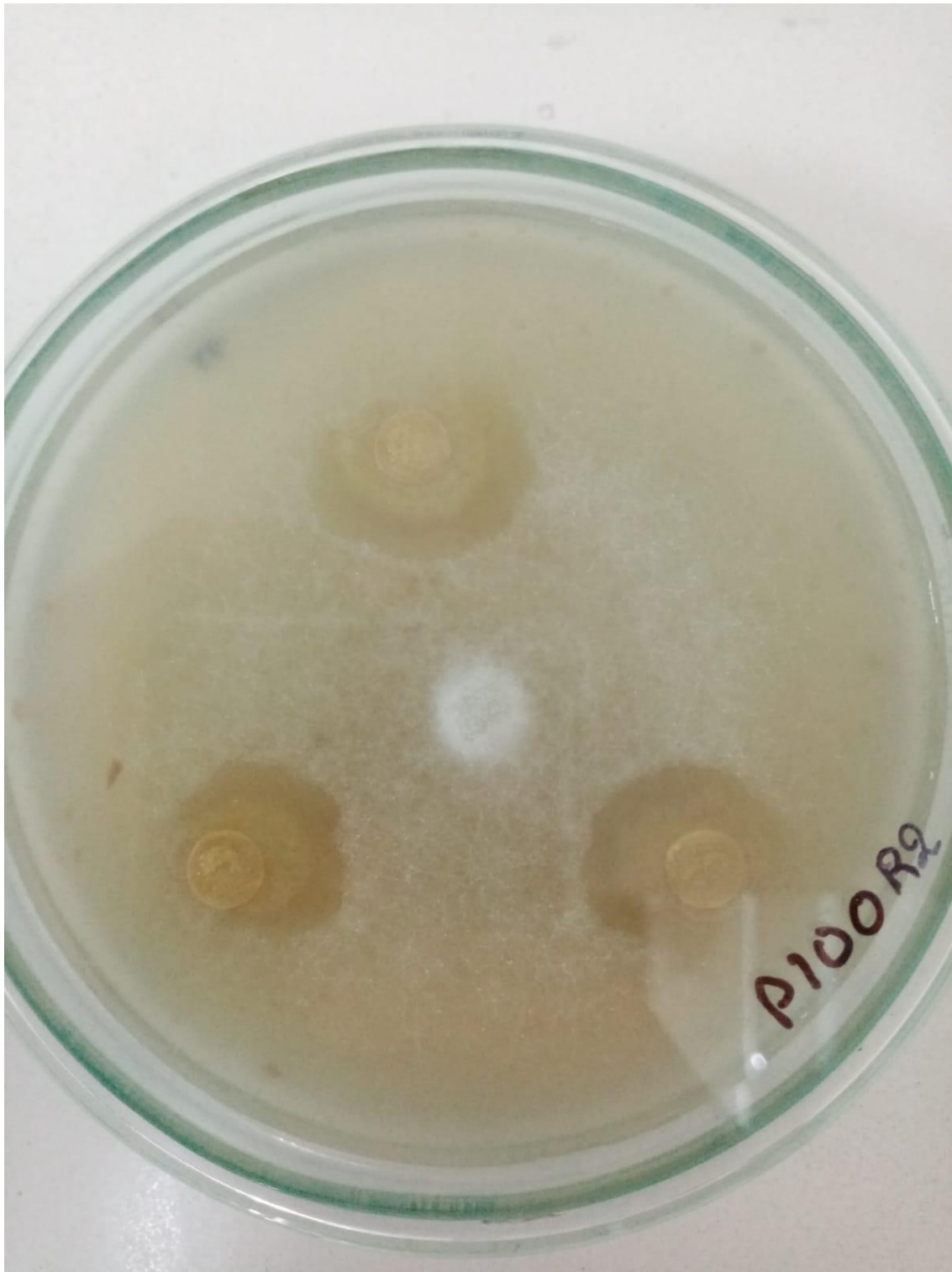
Anexo 10 Registro del crecimiento de *Phytophthora* sp en ensayo a los 6 días



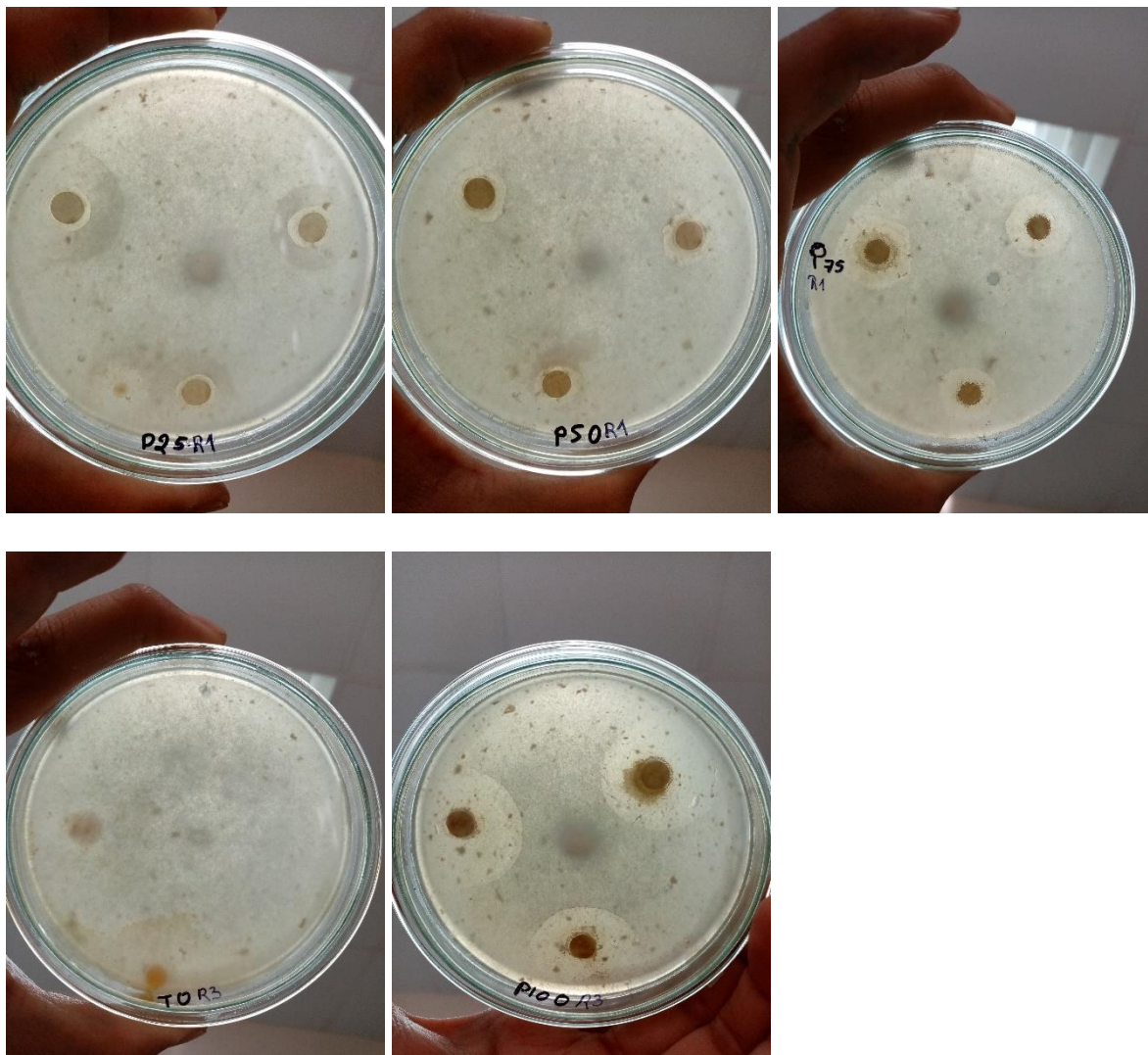
Anexo 11 Registro del crecimiento de *Phytophthora* sp en ensayo a los 10 días



Anexo 12 Halo de inhibición generado por concentración de propóleo en la máxima concentración de propóleo a los 12 días posteriores a la inoculación del medio.



Anexo 13 Halo de inhibición formado 15 posteriores a la inoculación del medio con diluciones de extracto de propóleo.



Anexo 14 Secuenciación PCR enviada a laboratorio de análisis molecular.



Anexo 15 Empacado de muestras para envío a laboratorio de análisis molecular.



Anexo 16 Parte 1 del informe correspondiente a caracterización molecular.

INFORME DE RESULTADOS

Código de la muestra: PS-SI

DATOS INFORMATIVOS

Solicitante: Darío Sanguano
Teléfono: N.A.

Fecha de ingreso de la muestra: N.A.
Fecha de ejecución del ensayo: N.A.
Fecha de reporte del resultado: 22/08/2022

ENSAYOS SOLICITADOS

- **PT-LFCB-001:** Identificación molecular de un microorganismo

Tipo de muestra: Colonia fúngica en medio no descrito.

Características de la muestra: Ejemplar perteneciente al género *Phytophthora* por identificación morfológica.

RESULTADOS

Cebador: ITS1

Secuencia:

```
TAGTTGGGGTCTTACTTGGCGGCGCTGCTGGCTTTATTGCTGGCGGCTACTGCTGGGCGAGCCCTATCAAAAGGC
GAGCGTTTGGACTTCGGTCTGAGCTAGTAGCTTTTTTATTTTAAACCCTTACTTAAACTGATTATACTGTGGGGAC
GAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGC
GAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACCTCCGGGT
AGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACAACAACTTGGCTTCTTCCCTCCGTGATGCTGGTGGAGGAGA
TGCCAGATGTGAAGTGTCTTGGGTTGGTTTTCCGACCGACTGCGAGTCTTTTAAATGTACTAACTGACTTCTC
TTTGTCCAAAAGTGGTGGCATTGCTGGTTGTGGACGCTGCTATTGTAGCGAGTTGGCGACCGGTTTGTCTGCTGC
GCGTTAATGGAGAAATGCTCGATTCTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCGCTTATTGGGTGATTTCTCTGC
TGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATGGCTCTTAGCTTGGCATTGAATCGGCTTGTCTGTGCGAAGTAGAGTGG
CGGCTTCGGCTGCCGAGGGTCGATCCATTGGGAAATGTTGTGACTTCGGTATGCATCTCAATTGGACCTGATATC
AGGCAAGATTACCCGCTGAACCTAGCTACATAAAGGGGGGGAGAAGAAACACACCTTAAACTTTCCCGTGAAC
CGTTCACCCAATAGTTTGGGGTCTAACTTGGCGGCCGCCCGCCGC
```

Anexo 17 Parte 2 del informe correspondiente a caracterización molecular.

Cebador: ITS4

Secuencia:

```
CCAAATGGATCGACCCTCGGCAGCCGAAGCCGCCACTCTACTTCGCAACAGCAAAGCCGATTCAAATGCCAAGCTAAAGAGCCA  
TGGTTCACCAGTCCATCACGCCACAGCAGGAAAATCACCCAATAAGCGCATTGTTACAGCGAAGCCAACCATAACCACGAATCGA  
GCATTTCTCCATTAACGCCGAGCAGACAAACCCGGTCGCCAACTCGCTACAAATAGCAGCGTCCACAACCAGCAATGCCACCACTT  
TTGGAGCAAAGAGAGTACAGTTTAGTACATTTAAAAGGACTCGCAGTCGGTCCGAAAACCACCAGCAAGACTTCACATCTG  
GCATCTCCTCCACCGACTACCGGAAGGAAAGAAAGCCAAAGTTTGTGTACGGACTGATACAGGCATACTTCCAGGACTAACCC  
CGGAAGTGC AATATGCGTTCAAATTTTCGATGACTACTGAAATCCTGCAATTCGATTACGTATCGCAGTTCGAGCGTTCTTCAT  
CGATGTGCGAGCCTAGACATCCACTGCTGAAAGTTGCTATCTAGTTAAAAGCAGAGACTTTCGTCCCACAGTATAATCAGTATT  
AAGTAAAGGGTTTTAAAAATAAAAAGCTACTAGCTCAGACCGAAGTCCAAAACGCTCGCCTTTTGATAGGGCTCGCCAGCAGTAG  
CCGCCAGCAATAAAGCCAGCAGCCGCCGCAAGTAAGACCCCAACTATGGGGTTGAAACGGTTCACGTGAAAAGTTTTAGGT  
GTGGTAATGATCC
```

Microorganismo	Similitud	Número de accesoión	Base de datos
<i>Phytophthora infestans</i>	98.05%	ON705717.1	NCBI

Resultado válido únicamente para la muestra analizada

OBSERVACIONES

N.A

Elaborado por



Melanie Luna
Pasante de laboratorio

Revisado por



Mtr. Jeniffer Yáñez A.
Directora de laboratorio

F-LFBC-01-Ed.1

Anexo 18 Resultado de conteo de UFC por espectrofotometría

Horas	T2	T3	T4	T5	CN	T1	T0
0	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
24	1.195	1.506	1.585	2.375	2.519	1.085	2.403
48	1.232	1.65	2.056	2.438	2.761	1.158	2.599
72	1.344	1.787	2.45	2.701	3.127	1.208	2.823
96	1.415	2.056	2.954	3.106	3.673	1.305	3.289

24 horas	T2	T3	T4	T5	CN	T1	T0
R1	1,150	1,315	1,874	2,480	2,570	0,950	0
R2	0,985	1,598	2,32	2,520	2,650	0,747	2,345
R3	1,240	1,605	1,295	2,124	2,336	1,085	2,460
Promedio	1,195	1,506	1,585	2,375	2,519	1,085	2,403

48 horas	T2	T3	T4	T5	CN	T1	T0
R1	1,230	1,460	1,951	2,350	2,792	1,155	0,048
R2	1,145	1,701	2,650	2,610	2,782	1,196	2,520
R3	1,320	1,790	1,568	2,354	2,708	1,124	2,678
Promedio	1,232	1,650	2,056	2,438	2,761	1,158	2,599

72 horas	T2	T3	T4	T5	CN	T1	T0
R1	1,290	1,597	2,120	2,410	3,071	1,190	0,051
R2	1,347	1,905	2,820	2,829	3,101	1,215	2,850
R3	1,395	1,860	1,827	2,864	3,208	1,218	2,796
Promedio	1,344	1,787	2,256	2,701	3,127	1,208	2,823

96 Horas	T2	T3	T4	T5	CN	T1	T0
R1	1,315	1,708	2,533	2,956	3,530	1,310	0,048
R2	1,510	2,310	3,120	3,208	3,782	1,290	3,225
R3	1,420	2,150	2,130	3,154	3,708	1,315	3,352
Promedio	1,415	2,056	2,594	3,106	3,673	1,305	3,289

dia 0	T2	T3	T4	T5	CN	T1	T0
R1	0,715	0,715	0,715	0,715	0,715	0,715	0,715
R2	0,785	0,785	0,785	0,785	0,785	0,785	0,785
R3	0,757	0,757	0,757	0,757	0,757	0,757	0,757
Promedio	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75

Anexo 19 Desarrollo del halo de inhibición

Tratamiento	R1	R2	R3	Promedio
T0	0	0	0	0.00
T1	32.03	31.97	31.57	31.86
T2	27.09	25.96	22.97	25.34
T3	7.97	7.6	8.1	7.89
T4	7.83	7.87	6.4	7.37
T5	6.43	6.23	5.97	6.21

Anexo 20 Halo de inhibición formado en cada tratamiento

Tratamiento	Halo de inhibición			Promedio
	Disco 1	Disco 2	Disco 3	
T2R1	28.5	26.6	26.18	27.09
T2R2	26.09	24.69	27.1	25.96
T2R3	25.2	21.8	21.9	22.97
T3R1	7.8	8.2	7.9	7.97
T3R2	7.2	7.5	8.1	7.60
T3R3	8.3	7.9	8.1	8.10
T4R1	7.7	7.5	8.3	7.83
T4R2	8.1	7.9	7.6	7.87
T4R3	7.6	5.7	5.9	6.40
T5R1	6.7	6.1	6.5	6.43
T5R2	5.9	6.5	6.3	6.23
T5R3	6.2	5.8	5.9	5.97
T1R1	32.8	29.9	33.4	32.03
T1R2	32.2	31.8	31.9	31.97
T1R3	34.7	29.9	30.1	31.57
T0R1	0	0	0	0.00
T0R2	0	0	0	0.00
T0R3	0	0	0	0.00