



**Pontificia Universidad Católica del Ecuador**

**Sede Ibarra**

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

**TEMA:**

EVALUACIÓN DE PROPÓLEO FRENTE AL HONGO (*Colletotrichum spp.*) EN TOMATE DE  
ÁRBOL (*Solanum betaceum Cav.*) EN FASE IN-VITRO

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

INGENIERO AGROPECUARIO

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

GESTIÓN SOSTENIBLE Y APROVECHAMIENTO DE LOS RECURSOS NATURALES

**AUTOR:** ANDERSON STEVEN CUATIN RUANO

**ASESOR:** MSc. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

IBARRA, OCTUBRE, 2022

## CERTIFICACIÓN DEL ASESOR DE TESIS

Ibarra, 3 de octubre 2022

Mgs. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

ASESOR

### **CERTIFICA:**

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



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. EDWIN FERNANDO DEL POZO VILLACIS

C.C.: 1001756566

(f):  .....

Mgs. DAVID ROLANDO NARVAEZ VEGA

C.C.: 1717526428

## ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Anderson Steven Cuatin Ruano, 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 derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades 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, 3 de octubre 2022



f): .....

Anderson Steven Cuatin Ruano

C.C.: 1050453057

## **AUTORÍA**

Yo, Anderson Steven Cuatín Ruano, portador de la cédula de ciudadanía N° 1050453057, 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): .....

Anderson Steven Cuatín Ruano

C.C.: 1050453057

## DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: Anderson Steven Cuatin Ruano, con CC: 1050453057, autor del trabajo de grado intitulado: Evaluación de propóleo frente al hongo (*Colletotrichum spp.*) en tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*) en fase *in-vitro*, previo a la obtención del título profesional de ingeniería agropecuaria, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (E.C.A.A).

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, 3 de octubre 2022



(f.) .....


Anderson Steven Cuatin Ruano

C.C. 1050453057

## DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “Evaluación de propóleo frente al hongo (*Colletotrichum spp.*) en tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*) en fase *in-vitro*.” 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 11 de mayo del 2021.

Ibarra, 3 de octubre 2022

(f)  .....

Anderson Steven Cuatín Ruano

C.C.: 100384097-0

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo principalmente a Dios por permitirme alcanzar este sublime momento e importante de mi vida, por ser mi fortaleza para ser mejor.

A mis padres, Joselito Cuatín Cuatín y Maura Oliva Ruano, quienes siempre me han guiado incondicionalmente en la parte moral incluso profesionalmente, con su apoyo lograron sembrar en mí la búsqueda de la superación constante, también han estado siempre durante todo el trayecto de mi vida estudiantil y han sido el motor para verme convertirse en un profesional.

También a mis mentores de la prestigiosa Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales por su dedicación, por transferirme los conocimientos necesarios para forjar un profesional más de valores éticos y cristianos de tal modo me enriquecen a lo largo de mi carrera.

*Anderson Steven Cuatin R.*

## AGRADECIMIENTO

Durante los años de estudio son muchas las personas que me han apoyado y guiado en este trabajo y quiero expresar mi gratitud por todo el apoyo incondicional. En primer lugar, quiero agradecer a mi estimado asesor Santiago Xavier Mafla por el tiempo y el esfuerzo que me ha dedicado de modo no hubiese sido posible realizar esta tesis.

A las autoridades de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra principalmente a la Mgs. Moraima Cristina Mera Aguas, responsable del uso de laboratorios de Microbiología y Biotecnología, para el aislamiento del hongo e identificación del mismo, también la extracción etanólica del propóleo y la disponibilidad de insumos para la evaluación del hongo en fase *in-vitro*.

Y finalmente, nunca hubiera podido llegar hasta aquí con el apoyo de mis padres Joselito Cuatín Cuatín y Maura Oliva Ruano, estoy estrechamente agradecido por todo el apoyo, el cariño y los consejos que han puesto en mí para alcanzar este arduo trabajo

*Anderson Steven Cuatin R.*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
2.3. HIPÓTESIS.....	3
2.3.1. Hipótesis.....	3
CAPÍTULO III.....	4
3. ESTADO DEL ARTE.....	4
3.1. Tomate de árbol <i>Solanum betaceum Cav.</i> .....	4
3.1.1. Origen y Generalidades.....	4
3.1.2. Características sanitarias del cultivo de tomate de árbol.....	6
3.2. Antracnosis.....	7
3.2.1. <i>Colletotrichum spp.</i> .....	8
3.2.2. Morfología de la colonia.....	9
3.2.3. Epidemiología.....	11
3.2.4. Desarrollo de la enfermedad.....	11
3.3. Control.....	13
3.3.1. Propóleo.....	13
CAPÍTULO IV.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Materiales.....	16

4.2.	Tratamientos.....	18
4.3.	Diseño experimental.....	19
4.4.	VARIABLES INDEPENDIENTES.....	19
4.4.1.	Concentración de extracto etanólico de propóleo EEP.....	19
4.5.	VARIABLES DEPENDIENTES.....	20
4.6.	Esquema de unidades experimentales .....	21
4.7.	Análisis de Varianza.....	22
4.8.	Manejo del Ensayo .....	22
4.8.1.	Recolección y aislamiento del hongo <i>Colletotrichum spp</i> a partir de material vegetal <i>Solanum betaceum Cav.</i> en condiciones de laboratorio.....	22
4.8.2.	Obtención de Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) .....	23
4.8.3.	Preparación de los extractos de propóleo:.....	23
4.9.	VARIABLES EN ESTUDIO .....	24
4.9.1.	Técnica de antibiograma con sensidiscos humedecidos .....	24
4.9.2.	Descripción del método de cuantificación de UFC .....	24
4.9.3.	Cámaras húmedas .....	26
CAPÍTULO V.....		29
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
5.1.	Resultados y Discusión .....	29
5.1.1.	Caracterización del hongo <i>Colletotrichum spp.</i> .....	29
5.1.2.	Pruebas macro y microscópicas .....	29
5.1.3.	Comparación de la actividad antifúngica del EEP mediante prueba de antibiograma con sensidiscos humedecidos .....	31
5.1.4.	Incidencia y severidad en cámaras húmedas.....	36
CAPÍTULO VI.....		42
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	42

6.1. Conclusiones .....	42
6.2. Recomendaciones.....	43
CAPÍTULO VII .....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>S. betaceum</i> .....	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica del <i>Colletotrichum spp.</i> .....	9
<b>Tabla 3.</b> Detalles de los tratamientos .....	19
<b>Tabla 4.</b> Esquema ADEVA.....	22
<b>Tabla 5.</b> Calibres del tomate de árbol .....	27
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de inhibición del hongo <i>Colletotrichum spp.</i> .....	32
<b>Tabla 7.</b> Análisis ADEVA sobre el diámetro de inhibición de EEP sobre <i>Colletotrichum spp.</i> .....	34
<b>Tabla 8.</b> Análisis ADEVA sobre el porcentaje de incidencia de EEP sobre <i>Colletotrichum spp.</i> .....	36
<b>Tabla 9.</b> Análisis ADEVA sobre el índice de severidad EEP sobre <i>Colletotrichum spp.</i> ..	38
<b>Tabla 10.</b> Plan de Actividades en el periódico académico.....	56
<b>Tabla 11.</b> Recolección de datos del halo de inhibición en (mm) .....	65
<b>Tabla 12.</b> Recolección de datos de incidencia y severidad .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Colletotrichum</i> spp (a partir del sustrato de <i>Solanum betaceum</i> ).....	10
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	12
<b>Figura 3.</b> Diseño completamente al azar para la prueba de antibiogramas.....	21
<b>Figura 4:</b> Escala de color del tomate de árbol.....	26
<b>Figura 5.</b> Diagrama para cuantificar la severidad en <i>Solanum betaceum</i> .....	28
<b>Figura 6.</b> Aislamiento del hongo <i>Colletotrichum</i> spp del fruto de tomate de árbol .....	30
<b>Figura 7.</b> Observación microscópica de <i>Colletotrichum</i> spp (a partir del sustrato de <i>Solanum betaceum</i> ) .....	30
<b>Figura 8.</b> Prueba Tukey al 5% para el diámetro de inhibición. ....	35
<b>Figura 9.</b> Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de incidencia. ....	37
<b>Figura 10.</b> Prueba Tukey al 5% para el índice de severidad.....	39
<b>Figura 11.</b> Recolección del propóleo y extracción del propóleo. ....	57
<b>Figura 12.</b> Recolección de las muestras y aislamiento del hongo. ....	59
<b>Figura 13.</b> Cuantificación e identificación del hongo <i>Colletotrichum</i> spp.....	60
<b>Figura 14.</b> Pruebas de antibiogramas con el fitopatógeno de antracnosis en un periodo de 72 horas. ....	61
<b>Figura 15.</b> Cámaras húmedas.....	63

## RESUMEN

En la presente investigación se planteó comparar la actividad antifúngica del extracto etanólico de propóleo (EEP) frente al hongo *Colletotrichum spp* determinando su efectividad como un biocontrol natural. Se evaluó el efecto de la aplicación de EEP en diferentes disoluciones de EEP en el control *in-vitro* de antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum spp*, mismo que fue aislado a partir de frutos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) y caracterizado mediante pruebas en laboratorio. Los extractos se obtuvieron a partir del propóleo proveniente de la Granja Experimental ECCA de la PUCE Sede Ibarra, utilizando como solvente etanol al 96 %. La actividad antifúngica se demostró utilizando los tratamientos: T= Alcohol Etílico 96 % (Testigo), T1= 10 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96% (Dosis baja), T2= 20 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis media), T3= 30 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis alta), TQ= 0,30 l/ha azoxystrobin y difenoconazole (Control positivo). Los resultados fueron positivos, en los antibiogramas se puede decir que el tratamiento con la dilución que se desempeñó mejor para inhibir el crecimiento del hongo *Colletotrichum spp*, fue el tratamiento T3 con valores de 15,24 mm de diámetro que corresponde un porcentaje de 27, 24 % en promedio de inhibición. Del mismo modo, para el porcentaje de incidencia en cámaras húmedas tratadas con las diferentes soluciones de EEP el tratamiento T3 tuvo un porcentaje promedio bajó del 23,33%, aunque estadísticamente son similares al tratamiento T2. También, para el caso de severidad el T3 tiene el índice más bajo de 1,28 mientras tanto el T2 se comporta similar de 1,74. Numerosas investigaciones demuestran que el propóleo es un compuesto bioactivo que puede ser aprovechado por grandes y pequeños agricultores incluso después de su pos-cosecha sin afectar o exponer la salud humana y brindar una seguridad alimentaria. Los apicultores, son los principales comercializadores de ofrecer el material principal por ende tienen otro ingreso económico a parte de la producción de miel incluso de otros beneficios que genera la abeja. El apicultor tiene nuevas oportunidades económicas de crear productos bioactivos para el control de patógenos de manera segura.

**Palabras Clave:** *Solanum betaceum*, *Colletotrichum spp*, propóleo, antibiogramas, incidencia, severidad

## ABSTRACT

In the present investigation, the antifungal activity of ethanolic extract of propolis (EEP) against the fungus *Colletotrichum spp* was compared to determine its effectiveness as a natural biocontrol. The effect of the application of EEP in different EEP solutions on the in-vitro control of anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum spp*, which was isolated from tree tomato fruits (*Solanum betaceum Cav.*) and characterized by laboratory tests, was evaluated. The extracts were obtained from propolis from the ECCA Experimental Farm of PUCE Ibarra, using 96% ethanol as solvent. The antifungal activity was demonstrated using the treatments: T= 96% ethyl alcohol (Control), T1= 10 g of propolis and diluted in 100 ml of 96% ethanol (Low dose), T2= 20 g of propolis and diluted in 100 ml of 96% ethanol (Medium dose), T3= 30 g of propolis and diluted in 100 ml of 96% ethanol (High dose), TQ= 0, 30 l/ha azoxystrobin and difenoconazole (Positive control). The results were positive, in the antibiograms it can be said that the treatment with the dilution that performed better in inhibiting the growth of the fungus *Colletotrichum spp*, was the T3 treatment with values of 15, 24 mm in diameter which corresponds to a percentage of 27, 24 % on average of inhibition. Similarly, for the percentage of incidence in humid chambers treated with the different EEP solutions, treatment T3 had an average percentage of 23, 33%, although statistically similar to treatment T2. Also, for the case of severity, T3 has the lowest index of 1, 28 while T2 has a similar behavior of 1,74. Numerous researches show that propolis is a bioactive compound that can be used by large and small farmers even after post-harvest without affecting or exposing human health and providing food safety. Beekeepers are the main marketers offering the main material and therefore have another economic income apart from the production of honey and other benefits generated by the bee. The beekeeper has new economic opportunities to create bioactive products for the control of a pathogen in a safe way.

**Key words:** *Solanum betaceum*, *Colletotrichum spp*, propolis, antibiograms, incidence, severity.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

El Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC, 2019; INEC, 2020) a través de las Encuestas de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC, 2019) sobre el Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) es uno de los cultivos representativos de la región sierra del Ecuador, las principales provincias son: Azuay, Bolívar, Carchi, Imbabura y Tungurahua su producción está entre las 1.586, 4.669, 1.319, 2.955 y 11.356 t respectivamente y con una en una superficie de 2 224 ha. Se cultiva desde los 1000 hasta los 3000 msnm bajo un rango de temperatura que oscila entre los 8 hasta 26 °C y precipitaciones de 500 a 2500 mm anuales con una humedad relativa del 60 al 80% (Mejía et al., 2016).

En este cultivo se ve afectada su producción por diferentes enfermedades y plagas las cuales bajan su rendimiento. Una de ellas es Antracnosis u “Ojo de pollo” (*Colletotrichum spp*) una enfermedad provocada por un hongo y tiene un gran rango de hospedantes como papaya, ají, mango, limón y aguacate, entre otros (Rojo et al., 2017). *Colletotrichum* alcanza la etapa asexual (anamorfo) de *Glomerella* (teleomorfo), el cual corresponde al phylum Ascomycota, clase Hypocreomycetidae, orden Glomerellales, familia Glomerellaceae (Réblová et al., 2011).

Como menciona Falconí et al., (2013) en Ecuador a nivel morfológico y molecular señalan como responsable a *C. acutatum*, en un artículo realizado en tres localidades del Ecuador (Pichincha, Cotopaxi e Imbabura). Esta es una enfermedad fúngica que tiene una gran incidencia en diferentes cultivos uno de los muchos es el tomate de árbol ocasionando daños a nivel foliar, fructificación y pos-cosecha. A nivel de la sierra ecuatoriana los productores se enfrentan a un enemigo en común y constituyéndose una amenaza para estas zonas productoras.

Por lo cual el hongo *Colletotrichum spp* ha generado pérdidas significativas para el cultivo y se han realizado controles culturales y químicos, los productos químicos más usados están el sulfato de cobre y zinc, clortalonil, captan, de tipo preventivo, ingredientes activos como difeconazole, carbendazim, dimetomorf, (Cárdenas et al., 2005). Son productos que poseen actividad fungicida de amplio espectro, se aplican a nivel foliar con distintos modos de acción, a nivel sistémico, curativo antiesporulante, protector y preventivo, pero con un peligro de crear resistencia y por ello se debe investigar nuevas alternativas.

Por lo tanto, se busca nuevas soluciones biológicas para el control de este patógeno mediante extractos de propóleo etanólico ya que tiene ciertas propiedades antifúngicas que pudiesen ser aprovechadas para el control de este hongo. También ofrece un aporte hacia las cadenas productoras apícolas desde el punto de vista fisicoquímico y de actividad biológica utilizando el propóleo como un bioinsumo para el control y sanidad de los frutos o verduras.

Como importante para esta investigación se ha recurrido al estudio de las propiedades bioactivas del propóleo, una sustancia embalsamadora para cubrir la colmena, elaborada por las abejas (*Apis mellifera*) tiene varias funciones, en sí misma evita la entrada de habitantes extraños y del mismo modo evita la incidencia de bacterias y hongos, (Sánchez et al., 2014). El propóleo es un compuesto utilizado desde varios estudios como la medicina, odontología entre otros, pero aún más en las ciencias agrícolas y pecuarias. El propóleo está compuesto por la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides y ésteres que son los responsables bioactivos (Manrique, 2006; Chaillou y Nazareno, 2009). Este producto natural puede ser aprovechado como una alternativa antifúngica. Por consiguiente, el propóleo parece ser un candidato potencialmente interesante para el tratamiento poscosecha.

## CAPÍTULO II

### 2. OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo general

Evaluar el extracto de propóleo frente al hongo (*Colletotrichum spp.*) en tomate de árbol (*Solanum betaceum cav.*) en fase *in-vitro*

#### 2.2. Objetivos específicos

- Analizar las diferentes concentraciones de extracto etanólico de propóleo frente al hongo (*Colletotrichum spp.*).
- Evaluar la mejor dosis del extracto etanólico de propóleo en el fruto del tomate de árbol (*Solanum betaceum cav*) mediante pruebas *in-vitro* en cámaras húmedas.

#### 2.3. HIPÓTESIS

##### 2.3.1. Hipótesis

- **Hipótesis alternativa (Ha):** Si el extracto etanólico de propóleo (EEP) tiene actividad antifúngica sobre el crecimiento *in vitro* frente al hongo (*Colletotrichum spp.*)

## CAPÍTULO III

### 3. ESTADO DEL ARTE

#### 3.1. Tomate de árbol *Solanum betaceum* Cav.

##### 3.1.1. Origen y Generalidades

Según CORPOICA (2003, como se citó en Maita, 2011) el tomate de árbol se considera una planta nativa de América del Sur, siendo entre los más posibles centros de origen en las selvas y bosques ubicados al norte de Argentina y el sur de Bolivia; por otra parte, al hallar gran diversidad genética en el norte de Perú y sur de Ecuador y Colombia se los considera como el centro de domesticación. La fruta se ha establecido en los Andes Suramericanos en zonas ubicados desde los 1800 hasta los 3000 m.s.n.m. y en la actualidad este cultivo se encuentra disperso por otras partes del mundo.

##### 3.1.1.1. Taxonomía

El tomate de árbol, como lo denominó inicialmente Cavanilles en 1799, luego fue traducido al género *Cyphomandra* por Sendtner en 1845 donde persistió hasta 1995, cuando Bohs lo regreso al género *Solanum* (Sendtner, 1845; Bohs, 1995).

Actualmente *Cyphomandra* es un clado dentro del género *Solanum* y no como un género apartado y se maneja la denominación *Solanum betacea* Cav. y *Cyphomandra betacea* Cav como sinónimos.

**Tabla 1.**

*Clasificación taxonómica de S. betaceum*

<b>TAXÓN</b>	<b>NOMBRE</b>
Reino	Plantae
División	Fanerógamas
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Simpétalas
Orden	Tubiflorae
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>S. betaceum Cav.</i>
Nombre común	Tomate de árbol

(Revelo et al., 2004)

### **3.1.1.2. Variedades**

En Ecuador, los genotipos de tomate de árbol no se mantienen puros, debido a los cruzamientos entre los materiales que se cultivan. Las plántulas que se obtienen de huertos con estas características, presentan gran variabilidad genética, presentando frutos de una amplia gama de tonalidades entre el anaranjado y el morado (León, 2002; Mejía et al., 2016).

Los genotipos cultivados en el Ecuador según León (2002) Ávila (2009) y Mejía et al., (2016); son:

- a) Anaranjado puntón:** el color del epicarpio es anaranjado, la pulpa y mucílago que rodean a las semillas son de color anaranjado medio, presenta alrededor de 196 semillas. Estos frutos a la madurez completa tienen 14,8 grados Brix y 260 ml/l de vitamina C.

Es importante señalar que son susceptibles a antracnosis este cultivar presenta menor incidencia y severidad

**b) Anaranjado gigante:** tanto su epicarpio, mesocarpio y mucílago son anaranjados. Tiene aproximadamente de 308 semillas. Presenta un contenido de azúcares de 13,2 grados Brix y además 320 ml/l de vitamina C.

Este genotipo es el de mayor cultivo en la actualidad debido a que presenta frutos de buen tamaño y su comercialización es apreciada en el mercado.

**c) Amarillo puntón:** su epicarpio, mesocarpio y mucílago son de color anaranjado. A la madurez presenta 14,42 grados Brix y además 270 ml/l de vitamina C. Este genotipo es poco sembrado y distribuido, por tener menor calibre, pero tiene alta capacidad productiva, precocidad y menor tamaño de la planta.

**d) Mora:** el epicarpio presenta una coloración rojiza oscura, el mesocarpio y el mucílago van de un color rojo oscuro a morado. Tiene una cantenidad de azúcares de 15 grados Brix y 310 ml/l de vitamina C. Es favorecido por los consumidores en los Estados Unidos y Europa debido a que el color es más atrayente, aunque el sabor es más ácido que el anaranjado.

### ***3.1.2. Características sanitarias del cultivo de tomate de árbol***

León et al., (2004); Revelo et al., (2004); Mejía et al., (2016) sostiene que el tomate de árbol es uno de los cultivos que presenta mayor sensibilidad a la presencia de plagas por hongos, virus y nematodos que reducen el crecimiento, productividad, calidad de la fruta, e inclusive su supervivencia.

#### **3.1.2.1. Plaga**

León et al., (2004); Maita, (2011) y Mejía et al., (2016) mencionan que en Ecuador, las plagas más frecuentes en orden de prioridad están la antracnosis conocida como “ojo de pollo” (*C. acutatum*), lanchar (*Phytophthora infestans*), mancha negra también conocida como “pata de puerco” (*Fusarium solani*) y oídio (*Oidium sp.*) como las más significativas. También encontramos alternariosis o tizón temprano (*Alternaria sp.*), virus mosaico del tamarillo Potyvirus (TamMV) y el virus de la marchitez manchada del tomate Tospovirus (TSWV). Estos virus se encuentran formando un complejo viral, mismo que deriva en la

marchitez manchada del tomate, conocida como Mancha aceitosa o bronceado del tomate de árbol (Revelo et al., 2008).

En lo referente a insectos, entre las limitantes del cultivo del tomate de árbol en la zona tenemos el chinchorro, mencionado también chinche foliado o patón (*Leptoglossus zonatus*), pulgones o áfidos (*Aphis sp.* y *Myzus sp.*), en ácaros (*Tetranychus sp.*), y los nematodos (*Meloidogyne incognita*) (Revelo et al., 2008; Maita, 2011).

### **3.2.Antracnosis**

León (2002); Wharton y Diéguez (2004); Revelo et al., (2008) y Mejía et al., (2016) mencionan que este hongo causa la enfermedad conocida como “ojo de pollo” ampliamente distribuida en las zonas productoras y es considerada por muchos productores y comercializadores como la enfermedad más importante del cultivo, pudiendo ocasionar pérdidas económicas entre el 50% y 100% de la producción.

Los síntomas logran mostrarse sobre todo a nivel de los frutos, tallos y ramas en sus diferentes etapas fenológicas de desarrollo. La mayor incidencia de la enfermedad se presenta en periodos lluviosos y con temperaturas promedio entre 13 a 15 °C y una humedad relativa del 95%. El hongo produce conidios incoloros, de una sola célula, ovoides, cilíndricos y en ocasiones arqueados o en forma de pesas en acérvulos. La masa de conidios presenta tonalidades salmón o rosa. Los acérvulos son sub-epidérmicos y nacen a través de la superficie de los tejidos de la planta, tienen forma de disco y cojín y son cerosos con conidióforos simples, cortos y erectos. En las hojas los síntomas de antracnosis se presentan como manchas con anillos concéntricos de color oscuro y bordes definidos (León, 2002; Maita, 2011; Falconí, 2013).

Los conidios son diseminados sólo cuando los acérvulos se encuentran húmedos. Son diseminados por la lluvia, trasladados por el viento o al entrar en contacto con los insectos, otros animales, herramientas, etc. Los conidios germinan cuando están en presencia de agua. Posteriormente de haber germinado, originan un apresorio y una clavija que le sirve para introducirse y se implanta directamente en los tejidos de su hospedante. Al principio, las

hifas crecen con gran rapidez tanto intracelular como intracelularmente, pero producen poca o ninguna decoloración visible u otros síntomas de alteración. (Agrios, 2008).

Las especies de *Colletotrichum* producen un amplio rango de enzimas capaces de destruir los componentes estructurales de los tejidos de las plantas y algunas que pueden matar las células. Dos tipos de enzimas ocurren frecuentemente; las que degradan los carbohidratos y así disuelven la pared celular y las otras que hidrolizan las cutículas (Bailey et al., 1992)

### **3.2.1. *Colletotrichum* spp.**

Wharton y Diéguez (2004); Cannon et al., (2012); Pardo et al., (2016) señalan las especies más representativas dentro del género *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides*, *C. tamarillo* i, *C. boninense*, *C. orbiculare*, *C. fioriniae*, *C. simmonds ii*. Sin embargo, Falconí et al., (2013) y Castro et al., (2019) confirman a nivel morfológico y molecular que el complejo *C. acutatum* es el agente causal de la antracnosis u “ojo de pollo” en el cultivo de tomate de árbol en el Ecuador, principalmente en la provincia de Imbabura. Entre otras, como las provincias de Azuay y Loja.

Este hongo fitopatógeno puede afectar a la mayor parte de la planta, desde la raíz hasta las hojas, flores, ramas, y fruta, produciendo enfermedades tales como la pudrición de la raíz, defoliación, muerte de las flores, y descomposición de la fruta. Sin embargo, la totalidad de las pérdidas significativas se debe a la infección por *C. acutatum* e incide cuando el patógeno ataca a la fruta (Prusky et al., 1992; Wharton et al., 2004; Maita, 2011).

#### **3.2.1.1. Taxonomía**

Según Agrios (2008), la categorización taxonómica de *Colletotrichum* spp es: Dominio Eukaryota, Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Clase Filamentous Ascomycetes (III) Deuteromycetes u hongos Mitospóricos, del Género *Colletotrichum* en estado anamorfo.

La taxonomía de *C. acutatum* se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 2.**

*Clasificación taxonómica del Colletotrichum spp.*

TAXÓN	NOMBRE
Reino:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Clase:	Sordariomycetes
Subclase:	Hypocreomycetidae
Orden:	Glomerellales
Familia:	Glomerallaceae
Género:	<i>Colletotrichum</i>

(Than et al., 2008; Damm et al., 2012)

### 3.2.1.2. Morfología

*Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds fue descubierta por Simmonds en 1965 al estudiar el patógeno de la pudrición del fruto en papaya (*Carica papaya*) en Australia, es una de las especies de *Colletotrichum* más conocidas por su amplia variabilidad biológica y distribución en el mundo (Simmonds, 1968; Than et al., 2008; Maita, 2011; Damm et al., 2012).

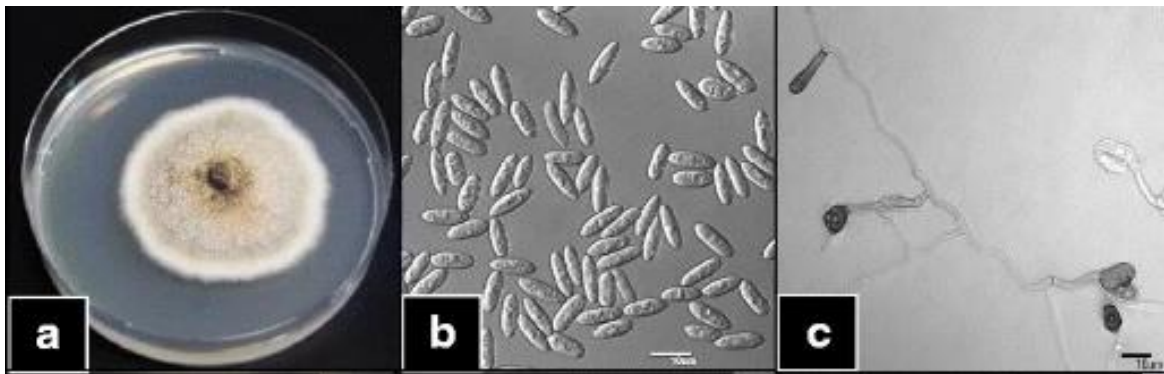
### 3.2.2. Morfología de la colonia

Falconí et al., (2013) sostiene que todos los aislamientos expresan pigmentación blanco grisáceo. El desarrollo de los aislamientos es regular y progresivo en el agar PDA y posteriormente de diez días a  $17 \pm 2$  ° C a la luz del día, en el área de la caja Petri es cubierta. También, los aislados de la fruta de tomate de árbol se forma micelio aéreo blanco ligeramente pálido, algodonoso y a menudo denso cerca del centro. En resumen, el color de la colonia de los aislamientos de la fruta cambia su pigmentación con en el transcurso del

tiempo de blanco a oscuro y los conidios de color salmón rosado. El porcentaje de crecimiento es más uniforme entre aislamientos a 25 ° C, mientras que a 30 ° C la tasa de crecimiento de los hongos se reduce.

**Figura 1.**

*Colletotrichum spp* (a partir del sustrato de *Solanum betaceum*).



**Nota:** Colonia, conidios y apesorios del representante *Colletotrichum spp*. Aislados de tomate de árbol de la sierra ecuatoriana cultivados durante 14 días a  $21 \pm 2$  °C en agar papa dextrosa acidulada (PDAa). a , b y c obtenidas de la parroquia Mulliquindil (Cotopaxi ). Tomado de “Multilocus molecular identification and phylogenetic analysis of *Colletotrichum tamarilloi* as the causal agent of Tamarillo (*Solanum betaceum*) anthracnose in the Ecuadorian highlands.” (p. 7), por J. Caicedo et al., 2017, *European Journal of Plant Pathology*, 148

La característica principal de esta especie es la forma de sus conidios, siendo fusiformes o elipsoides; es decir, que al menos uno de sus extremos tenga un lado puntiagudo, su tamaño aproximado es de  $8,5-16-5 \times 2,5-4$   $\mu\text{m}$ . Sus colonias son de color blancas es sus inicios, tornándose rojas o naranjas con el paso del tiempo; como se puede observar en la Figura 1. En muchos casos, algunas cepas de esta especie liberan pigmentos rojos o naranjas. Se diferencian de otras especies por su crecimiento lento (Maita, 2011; Santacruz, 2013; Caicedo et al., 2017)

### **3.2.3. Epidemiología**

Maita (2011) y Rodríguez et al., (2021) mencionan que la mayoría de las enfermedades causadas por *Colletotrichum* son transmitidas por conidios que son llevados por varias formas: por el agua, viento, insectos e incluso por el mismo agricultor.

Las infecciones quiescentes<sup>1</sup> causan en las etapas de altas precipitaciones y de temprano crecimiento de la fruta. León et al., (2004); Maita, (2011) y Rodríguez et al., (2021) mencionan que en el campo, la esporulación de hongos en tejidos contagiados ocurre durante períodos de humedad prolongada, y los conidios son diseminados por las salpicaduras de lluvia. A continuación la contaminación, el hongo empieza infecciones quiescentes y síntomas de la enfermedad.

También es diseminada por insectos perforadores de frutos, tales como: *Neoleucinodes elegantalis* y *Leptoglossus zonatus* Dallas y también por algunas larvas de lepidópteros, que facilitan la entrada del hongo y predisponen el fruto a la infección (Contreras y Almeida, 2003).

### **3.2.4. Desarrollo de la enfermedad**

Jayawardena et al., (2021), sostiene que las primeras fases del desarrollo de hongos durante el transcurso de infección son básicamente las mismas para todas las especies de *Colletotrichum*, por ello las separan en fases, incluyendo:

- a. Deposición de conidios en superficie de las plantas.
- b. Fijación de conidios de aquellas superficies.
- c. Germinación de los conidios.
- d. Producción de apresorios.

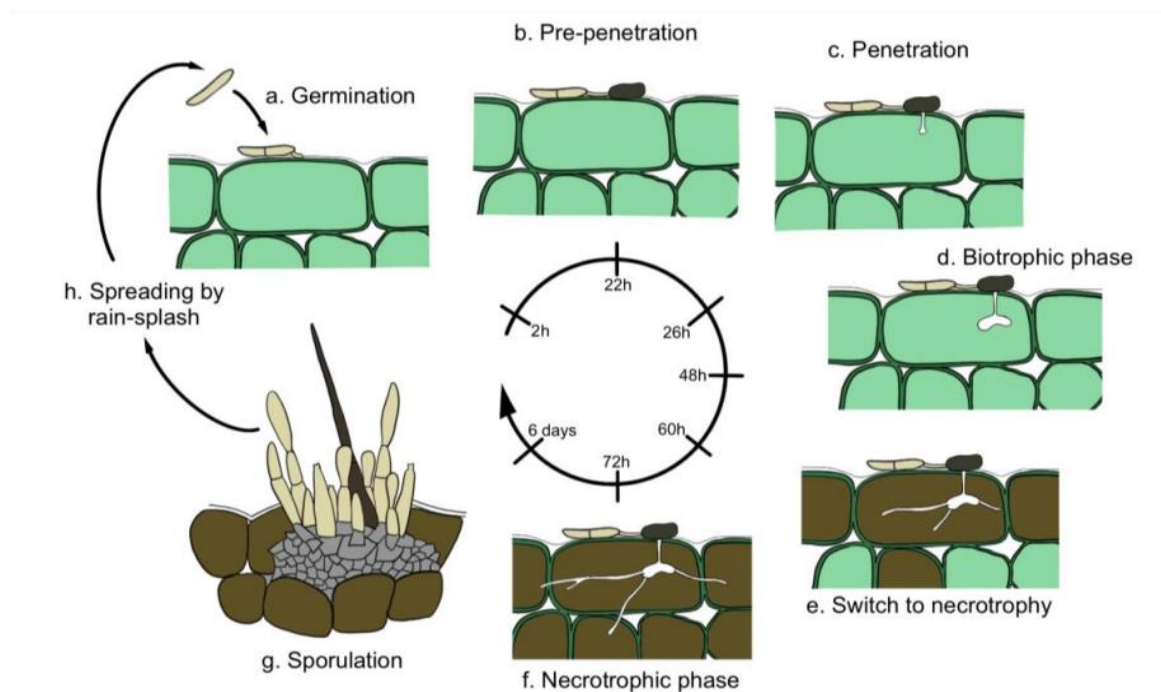
---

<sup>1</sup> Infección quiescente representa una relación parasitaria inactiva o latente, que después de un periodo considerable y las circunstancias fisiológicas y ambientales lo permitan, cambie a una relación parasitaria activa en cualquier momento de las siguientes etapas: germinación, elongación del tubo germinativo, producción del apresorio y penetración (Wharton y Diéguez, 2004).

- e. Penetración a la epidermis de la planta.
- f. Crecimiento y colonización en los tejidos vegetales.
- g. Producción de acérvulos y la esporulación.

**Figura 2.**

*Ciclo de vida de Colletotrichum spp.*



**Nota:** En el gráfico representa el desarrollo del hongo durante el proceso de infección Tomada de “*Colletotrichum: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species*” (p. 524), por R.S. Jayawardena et al., 2021, *Mycosphere*, 12(1).

Las estrategias de infección son similares para las especies de *Colletotrichum*, sin embargo Bailey et al., (1992); Wharton y Diéguez, (2004), mencionan una estrategia de infección que son: **Hemibiotrofos intracelular**, donde forma hifas primarias, que pueden colonizar las células epidérmicas y del mesófilo adyacentes. Al iniciar las primeras etapas de este tipo de colonización, la relación entre el hospedero y el patógeno es biotrófica (célula viva está interpretada en verde). La posterior interacción necrotrofica (Figura 2, representa en marrón)

se determina por el desarrollo de hifas secundarias delgadas. Las hifas secundarias se desarrollan intracelular e intercelularmente mientras tanto producen ciertas enzimas que degradan la pared celular y matan las células huésped. **Necrotrofia subcuticular e intramural**, este tipo de colonización el hospedero es primeramente por las hifas subcuticulares e intramurales, la fase biotrófica es muy breve o no sucede. El hongo se extiende levemente a través del tejido y su crecimiento es tanto inter como intracelularmente.

### **3.3.Control**

León et al., (2004); Parra, (2008); Maita, (2011) y Rodríguez et al., (2021) mencionan, que el control efectivo de las enfermedades causadas por *Colletotrichum* implica el uso de uno o una combinación de los siguientes métodos:

- a. Cultivares resistentes.
- b. Control cultural.
- c. Control químico.
- d. Control biológico utilizando organismos antagónicos.
- e. Control botánico (Extractos y Aceites vegetales).

El control químico es el más frecuente debido al grado de importancia económica del cultivo. Se disponen de muchos químicos, entre los más utilizados se encuentran compuestos como: ditiocarbamato, benzimidazoles y triazoles; y otros fungicidas como chlorothalonil, imazalil, prochloraz, dimetomorf, captafol, folpet (Cárdenas et al., 2005; Parra, 2008; Landero et al., 2016).

#### **3.3.1. Propóleo**

El propóleo, una sustancia resinosa natural y compleja, es recolectado por las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) a partir de las yemas, cortezas, hojas u otras fuentes botánicas de árboles y arbustos. Su composición química es compleja y depende principalmente de la

especie botánica y del origen geográfico de donde se recogen las sustancias resinosas. Es rica en compuestos polifenólicos y tiene asociadas muchas propiedades fármaco-biológicas demostradas científicamente, como sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, antitumorales o antimicrobianas (Oryan et al., 2018).

Su principal función en la colmena del propóleo no simplemente es un material de edificación, sino que además es el mecanismo de defensa contra los microorganismos patógenos presentes en la colmena; la representación de este compuesto en la parte interna de la colmena presta un ambiente no adecuado para el crecimiento de hongos u otros microorganismos (Toreti et al., 2013).

#### **3.3.1.1.Descripción del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP)**

La investigación de antifúngicos a partir de productos naturales ha despertado un gran interés, como el extracto etanólico de propóleo (EEP). Según Manrique, (2006); Chaillou y Nazareno (2009); Mattiuz et al., (2015); Manzo et al., (2018); Dudoit et al., (2020), Becerra y Rendón, (2020) mencionan que, el propóleo es un compuesto utilizado en varios estudios una de ellas en las ciencias agrícolas y pecuarias. A pesar de la diversidad de clases de compuestos con potencial antifúngico, todos los extractos de propóleos descritos en la bibliografía resultan eficaces contra diversos mohos fitopatógenos, como *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Candida albicans* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

#### **3.3.1.2.Principio activo del propóleo**

La actividad antifúngica del EEP es bastante compleja y se ha atribuido a la actividad sinérgica entre sus componentes biológicos, que constituyen una clase muy importante de polifenoles, en la cual, esta composición está directamente relacionada con el origen del propóleo y el lugar de recolección (Silva-Carvalho et al., 2015)

En el interior de la colmena, el propóleo cumple la función de defensa contra microorganismos patógenos, propiedad que deriva de los componentes químicos de su

estructura; el principio activo se encuentra en los fenoles y flavonoides, tales como: pinocembrina, galangina, pinobanskina, que se identifican como responsables de las actividades antimicrobianas y en particular antifúngicas (Manrique, 2006; Dota et al., 2011; Aguiar et al., 2013).

Según Corrêa et al., (2020), señala que la bioactividad del EEP actúa sobre la estructura celular del hongo y está relacionada esencialmente con la pérdida de la integridad de la membrana celular y el aumento de la permeabilidad, comprometiendo la viabilidad celular, además de provocar la pérdida de la integridad de la pared celular, importante para la morfogénesis del hongo. El EEP también interfiere en la germinación y la filamentación, inhibiendo la formación de tubos germinales e hifas verdaderas. Y, además no tiene potencial mutagénico.

## CAPÍTULO IV

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la ejecución de esta tesis tipo investigativa-experimental, “Evaluación de propóleo frente al hongo (*Colletotrichum spp*) en tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*) en fase *in-vitro*”, se aisló la cepa fitopatógena causante de la enfermedad de antracnosis, luego se obtiene el extracto etanólico de propóleo (EEP); por último, se evaluó *in-vitro* la actividad antifúngica del EEP en las diferentes concentraciones frente a *Colletotrichum spp*.

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en el área de microbiología y biotecnología en los laboratorios de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de PUCE - Sede Ibarra.

#### 4.1. Materiales

Los materiales de campo y equipos de laboratorio que se utilizaron en la presente investigación son los siguientes:

##### a) Materiales

- Bisturí
- Pinzas
- Mechero
- Asa
- Porta y cubreobjetos
- Tijeras
- Fundas plásticas

- Embudos
- Mortero
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Frasco hueco de 500 ml
- Mortero
- Papel filtro
- Papel toalla
- Algodón
- Papel aluminio
- Cámaras húmedas
- Material vegetal: Fruta de tomate de árbol
- Propóleo

**b) Equipos**

- Cámara de flujo (N-BIOTEK)
- Microscopio
- Estufa (MEMMERT)
- Congelador
- Pie de rey

- Balanza analítica (aeADAM)
- Agitador magnético (Wisd: MSH-220D)
- Incubadora con agitación (N-BIOTEK: 205L)
- Cámara de Neubauer (BOECO Germany)
- Pipetas
- Autoclave (N-BIOTEK: NM-1080)

**c) Insumos**

- Azul de metileno
- Papa Dextrosa Agar (TITAN BIOTECH LTD.)
- Hipoclorito de sodio
- Alcohol (NOVACHEM)
- Agua destilada

**4.2.Tratamientos**

El factor en estudio de la presente investigación son las dosis del EEP frente al fitopatógeno *Colletotrichum spp* mediante pruebas de antibiogramas tomando como referencia las dosis del EEP empleadas por Campo et al., (2018) en su investigación y sus recomendaciones para así plantear los tratamientos mencionados en la siguiente tabla:

**Tabla 3.**

*Detalles de los tratamientos*

<b>Tratamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Descripción</b>
1	Dosis alta (T1)	30 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 %
2	Dosis media (T2)	20 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 %
3	Dosis Baja (T3)	10 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 %
4	Químico (TQ)	0,30 l/ha azoxystrobin y difenoconazole (β-metoxiacrílico y difenoconazole)
5	Testigo (T)	Alcohol Etílico 96 %

#### **4.3. Diseño experimental**

Se utilizó un diseño completamente al Azar (DCA)

- Tratamientos: 5
- Repeticiones: 3
- Unidades Experimentales: 15

#### **4.4. Variables independientes**

##### **4.4.1. Concentración de extracto etanólico de propóleo EEP**

La concentración para la evaluación del extracto de propóleo se determinó de acuerdo a la metodología empleada por Pineda et al. (2010) y Campo et al, (2018). Todos los ensayos se ejecutaron por triplicado con las diferentes concentraciones de EEP para evaluar la eficiencia de inhibición en condiciones *in-vitro*. Las concentraciones a emplear son:

- **Tratamiento 1:** 10 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 %, (Dosis alta)
- **Tratamiento 2:** 20 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 %, (Dosis media)
- **Tratamiento 3:** 30 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 %, (Dosis baja)
- **Tratamiento 4:** 0,30 l/ha azoxystrobin y difenoconazole ( $\beta$ -metoxiacrílico y difenoconazole), (Control positivo)
- **Tratamiento 5:** Alcohol Etílico 96 % (Testigo)

#### 4.5. Variables dependientes

Las variables evaluadas fueron tres parámetros de inhibición a considerar según Campo et al, (2018) y Hernández et al, (2018) que están asociados con la respuesta a las diferentes concentraciones de EEP.

- **Halo de inhibición**

El porcentaje de inhibición de los microorganismos empleando la técnica de antibiograma con sensidiscos humedecidos impregnados de EEP. Las placas se incubaron durante 6 días y se midieron con pie de rey el diámetro de inhibición del micelio cada 24 h. Para la evaluación de la capacidad antifúngica del extracto de propóleo se midió el porcentaje de inhibición (Ecuación 1) de acuerdo a la metodología empleada por Pineda et al., (2010) y Campo et al, (2018)

- **Incidencia**

Esta variable se tomó a los 17 días después de la aplicación con los diferentes tratamientos. El porcentaje de incidencia se determinó dividiendo el número de frutos enfermos entre los frutos evaluados y multiplicandos por 100, para los diferentes ensayos de las cámaras húmedas aplicados con el EEP (Hernández et al., 2018).

- **Severidad**

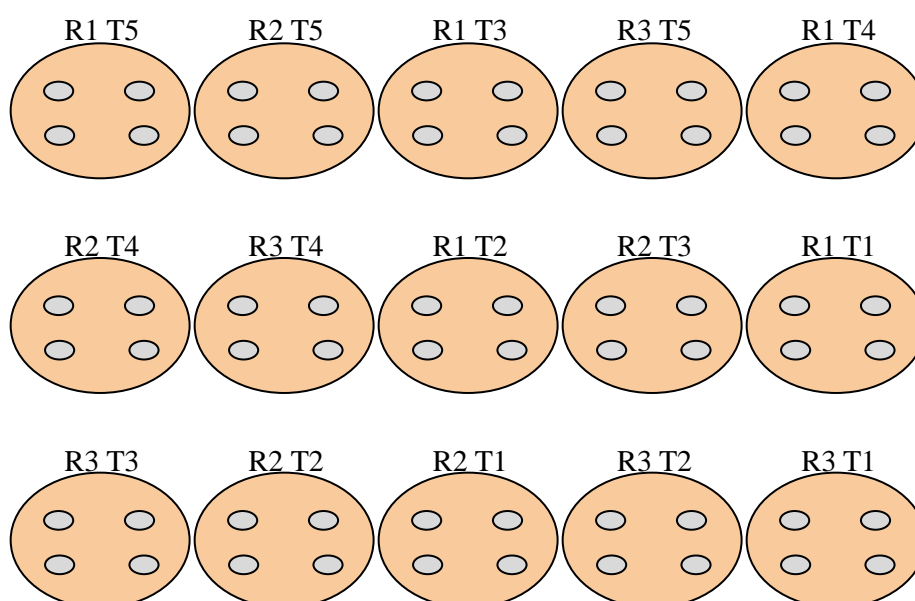
Esta variable se tomó a los 17 días después de la aplicación con los diferentes tratamientos, para la severidad se evaluó con una escala de 5 clases: 1:0 %, 2:1-25 %, 3:26-50 %, 4:51-75 %, y 5:76-100 % (Figura 5) en donde se puede observar en los diferentes ensayos el grado de daño en la superficie de cada fruto con síntomas de *Colletotrichum spp* (Hernández et al., 2018).

#### 4.6. Esquema de unidades experimentales

Las unidades experimentales consisten en la técnica de antibiogramas con sensidiscos humedecidos con el EEP a las concentraciones determinadas (Tabla 3) de acuerdo con la metodología de Pineda et al., (2010) y Campo et al., (2018). Considerando el diseño experimental DCA, se resolvió realizar una aleatorización en el programa estadístico R (versión: 1.1.463) teniendo como resultado el siguiente Figura 3:

**Figura 3.**

*Diseño completamente al azar para la prueba de antibiogramas.*



#### 4.7. Análisis de Varianza

Para el análisis de los resultados de las variables en el presente trabajo se aplicó un DCA y sus resultados fueron examinados estadísticamente mediante el Análisis de Varianza (ADEVA) y el nivel de significancia por la prueba de Tukey 5 %, todos los registros se los analizó mediante el programa R Studio (versión libre 1.4.1717).

**Tabla 4.**

*Esquema ADEVA*

Fuentes de Variación	GL (Grados de Libertad)
Total	14
Tratamientos	4
Error Experimental	10

#### 4.8. Manejo del Ensayo

##### *4.8.1. Recolección y aislamiento del hongo Colletotrichum spp a partir de material vegetal Solanum betaceum Cav. en condiciones de laboratorio.*

El hongo *Colletotrichum spp* se aisló de frutos de tomate de árbol con sintomatología de antracnosis, provenientes de mercados de la ciudad de Ibarra. Estos frutos fueron transportados en fundas herméticas al laboratorio de microbiología.

Según la metodología a aplicar por Campo et al., (2018) y Chacin et al., (2013) se realizó la desinfección con solución jabonosa por 5 min, agua destilada por 3 min, hipoclorito de sodio al 10 % por 5 min, tres enjuagues en agua destilada por 3 min cada uno, un enjuague en alcohol al 70 % por 5 min y posteriormente en agua destilada por 3 min para secar con papel absorbente estéril.

Luego se sembró el tejido con selecciones en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) se realizaron tres siembras en PDA de los ex plantas del fruto y resiembras sucesivas de los microorganismos para aislarlos, para la caracterización macro y microscópica se tomó la tercera siembra purificada. Los caracteres considerados fueron color y forma de la colonia, color del micelio. A partir de esta prueba se tomaron el micelio y se replicaron en PDA para evaluar la capacidad antifúngica de los extractos (Chacin et al., 2013).

#### ***4.8.2. Obtención de Extracto Etanólico de Propóleo (EEP)***

Para la recolección del EEP se recolectó el propóleo en los apiarios seleccionados que deben ser colmenas con abundante población de abejas, buena postura de las reinas y dos alzas, se deberá recolectar alrededor de 17 a 30 gramos de propóleo.

Una vez recolectado el material, se almacena en frascos ámbar y se conservará a -18 °C hasta su análisis. Para hacer la recolección de muestras de propóleo se usó el método de raspado directo con palanca de acero inoxidable con las cuales se removerá el propóleo (Chaillou et al., 2004; Manrique, 2006).

#### ***4.8.3. Preparación de los extractos de propóleo:***

La metodología de extracción del propóleo se realizó teniendo en cuenta el Código Alimentario Argentino y varios artículos científicos Popova et al., (2004) y Martínez, (2009) cuyos autores reportaron extracción etanólica de propóleos (EEP). El proceso generalizado es el producto de la mezcla de varias metodologías y el ajuste de éstas a nuestras situaciones de trabajo.

En un mortero se macera la resina, hasta reducir su granulometría, después se pesaron 30 g y se diluyen en 100 ml de etanol destilado al 96 %, luego se deja en recipientes envueltos en papel aluminio sobre un agitador por 48 h a temperatura ambiente; la mezcla se centrifugó a 3000 rpm. 10 min y se filtra por gravedad, al filtrado se le adicionan 10 ml de agua destilada y se deja en refrigeración hasta que se precipite toda la cera, se hará filtración dos veces hasta ya no observar presencia de ceras, (Popova et al., 2005; Martínez, 2009). El extracto

etanólico resultante se someterá a una temperatura de 40°C, la resina obtenida se embotella en frascos color ámbar y se conservarán en refrigeración hasta el momento de utilizar para las ensayos (Martínez, 2009).

#### **4.9. Variables en estudio**

##### ***4.9.1. Técnica de antibiograma con sensidiscos humedecidos***

Para la evaluación de la capacidad antifúngica del extracto de propóleo, se aplicó la técnica de antibiograma con sensidiscos humedecidos con el extracto de las concentraciones determinadas (Tabla 3.) acorde al método empleado por Pineda et al., (2010). En los ensayos se elaborarán con tres repeticiones. Las placas se incubaron durante 6 días a 25°C y se medirá con pie de rey el diámetro de inhibición del micelio cada 24 h.

Mediante Campo et al., (2018), el porcentaje de Inhibición fue determinado empleando la ecuación 1:

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

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 empleó como control etanol al 96%.

##### ***4.9.2. Descripción del método de cuantificación de UFC***

Hay diversos tipos de muestra en forma de suspensión. Para ello, se colocarán 100µl de suspensión del hongo a explorar que en este caso sería *Colletotrichum spp* (Fila A), en la fila superior de la gradilla. Después se depositarán 180µl de agua destilada esterilizada en el resto de los tubos de ensayo (Fila B), con la ayuda de una pipeta.

Una vez lista la placa, se realizan las diluciones escalonadas en factor 1:10. Este paso se realizará con la ayuda de la pipeta. Con puntas estériles se tomarán 20 µl de la muestra A y

se transferirán a la siguiente fila (B), diluyendo y homogeneizando las muestras en el agua contenidas en los tubos de ensayo; por medio de una re-suspensión que consistirá en subir y bajar, durante 8 segundos, la suspensión a través de las puntas de la pipeta. Los ejemplares de la fila B arrojaron en una dilución 1/10. Se cambiarán las puntas de la pipeta y se tomarán 20 µl de la dilución 1/10 de la fila B y se transferirán a la fila C volviendo a diluir y homogeneizar la muestra durante 8 segundos. Entonces las muestras o ejemplares de la fila C arrojan una dilución 1/100. Este procedimiento se continuará realizando hasta diluir la muestra 1/100000 en la fila F (Lugo et al., 2012).

Cada una de las diluciones (incluyendo las suspensiones iniciales de las muestras) será inoculada en los medios de selección o de crecimiento gelificado de acuerdo con el experimento. Para esto se utilizará un replicador estéril, el cual permitirá tomar un volumen similar de cada una de las muestras de la placa y depositarlas en medio (contenido en placas Petri). El volumen de las gotas que tomará cada prolongación del replicador fue de 1,65 µl, por lo que este valor se usará para los cálculos de UFC/ml. Una vez que las muestras fueron inoculadas en el medio gelificado respectivo, las placas se incubaron en condiciones óptimas para el crecimiento del hongo, temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) (Lugo, et al., 2012).

Para determinar el número de UFC/ml en las muestras, se tomará el número de colonias de la dilución contable (ejm. 5colonias); asumiendo que una colonia es igual a una UFC/ml, el valor equivale al número de UFC/ml que existe en el volumen de la gota que dejó el replicador. Después mediante una “regla de tres”, se determinará el número de colonias que hay en 100 µl y posteriormente en 1 ml (Lugo, et al., 2012).

Una vez determinado el número de colonias en 1 ml, el resultado se multiplicará por el factor de dilución en la cual se contarán las colonias y así se obtendrá el número de UFC/ml del hongo de interés contenido en la muestra.

Ecuación 2.

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Número de UFC x Factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

### 4.9.3. Cámaras húmedas

Para la preparación de la cámara húmeda se utilizarán envases transparentes previamente esterilizados; luego, internamente se colocó papel absorbente húmedo para que se mantenga en condiciones óptimas para su desarrollo del hongo y con la presencia de luz/oscuridad y temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C). Posteriormente en este ensayo, se utilizó los diferentes tratamientos de EEP para el desarrollo de *Colletotrichum spp* en las cámaras húmedas. Los frutos de tomate de árbol que se obtendrán deben ser: con un tamaño uniforme y un índice de madurez 5-6, correspondiente a un estado maduro (Figura 4.), para todos los tratamientos.

#### Figura 4:

*Escala de color del tomate de árbol*



**Nota:** Color de 1 a 2: VERDE, 3 a 4: PINTÓN y de 5 a 6: MADURO. Tomada de “*Frutas Frescas. Tomate De Árbol. Requisitos*” (p. 5), por Norma Técnica Ecuatoriana (NTE-INEN 1909:2015), 2015.

Para considerar un tamaño uniforme se tomó en cuenta el calibre de la fruta, se determinó por el diámetro máximo de la fruta, la longitud (mm) y la masa (g); la relación entre calibre, diámetro, longitud y masa, se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 5.***Calibres del tomate de árbol*

<b>Calibre</b>	<b>Diámetro, D, mm</b>	<b>Longitud, L mm</b>	<b>Masa promedio, M, g</b>
<b>Grande</b>	$D \geq 55$	$L \geq 70$	$M \geq 120$
<b>Mediano</b>	$45 < D < 55$	$60 < L < 70$	$60 < M < 120$
<b>Pequeño</b>	$D < 45$	$L < 60$	$M < 60$

*Nota:* El tamaño que se consideraron en las diferentes unidades experimentales fueron Grande y Mediano. Tomada de “*Frutas Frescas. Tomate De Árbol. Requisitos*” (p. 4), por Norma Técnica Ecuatoriana (NTE-INEN 1909:2015), 2015.

A cada fruta se le realizó una laceración de 0,05 cm con una aguja estéril y luego se inoculó 50 µl de una suspensión de esporas de *Colletotrichum spp* a una concentración de  $10^5$  esporas/ml. Después de 24 h los frutos se sumergieron en las diferentes dosis de EEP. Y se secaron a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C). Los tratamientos control consistirán en sumergir los frutos en alcohol y otros en el fungicida sintético azoxystrobin 200 g/l y difenoconazole 125 g/l (β-metoxiacrílico y difenoconazole) a una concentración de 0,3 l/ha de acuerdo a las dosis recomendadas por el fabricante. Los frutos serán almacenados en cámaras de almacenamiento a  $14 \pm 2$  °C y otros a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C). Para cada uno de los tratamientos se utilizarán tres repeticiones con 10 frutos. El porcentaje de incidencia y severidad se evaluó a los 17 días, después en frutos almacenados a  $14 \pm 2$  °C y a los 2 días en frutos almacenados a temperatura ambiente. El porcentaje de incidencia se determinó dividiendo el número de frutos enfermos entre los frutos evaluados y multiplicados por 100. La severidad se evaluó con una escala de 5 clases: 1:0 %, 2:1-25 %, 3:26-50 %, 4:51-75 %, y 5:76-100 % de la superficie del fruto con síntomas de *Colletotrichum spp* (Hernández et al., 2018).

**Figura 5.**

*Diagrama para cuantificar la severidad en Solanum betaceum*



**Nota:** con una escala de 5 clases: 1:0 %, 2:1-25 %, 3:26-50 %, 4:51-75 %, y 5:76-100 %.  
Adaptado de Hernández et al., (2018).

## CAPÍTULO V

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. Resultados y Discusión

##### 5.1.1. Caracterización del hongo *Colletotrichum spp.*

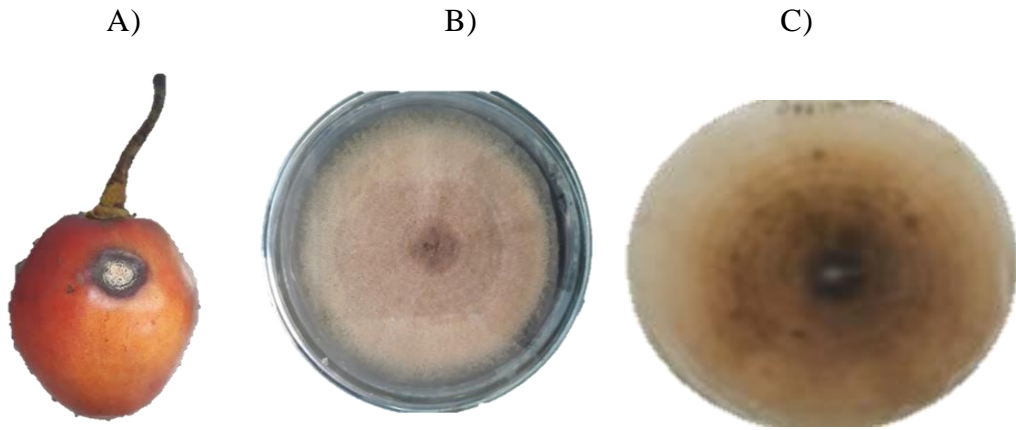
Se recolectaron cinco frutos con sintomatología típica de la enfermedad del ejemplar *Solanum betaceum* Cav., de los cuales se obtuvieron cuatro fragmentos de cada órgano, que fueron sembrados en cuatro cajas Petri con agar PDA. Transcurridos el tiempo a temperatura ambiente se identificó la posible presencia de *Colletotrichum spp.*

##### 5.1.2. Pruebas macro y microscópicas

Para la identificación macroscópica se tomó en cuenta las estructuras que se pueden observar a simple vista y que permiten la diferenciación de otros microorganismos. El análisis se llevó a cabo de acuerdo a Falconí et al., (2013) sostiene que todos los aislamientos expresan pigmentación blanco grisáceo. El desarrollo de los aislamientos es regular y progresivo en el agar PDA y posteriormente de diez días a  $17 \pm 2$  ° C a la luz del día, en el área de la caja Petri es cubierta. También, los aislados de la fruta de tomate de árbol se forma micelio aéreo blanco ligeramente pálido, algodonoso y a menudo denso cerca del centro. En resumen, el color de la colonia de los aislamientos de la fruta cambia su pigmentación con en el transcurso del tiempo de blanco a oscuro y los conidios de color salmón rosado. El porcentaje de crecimiento es más uniforme entre aislamientos a 25 ° C, mientras que a 30 ° C la tasa de crecimiento de los hongos se reduce.

**Figura 6.**

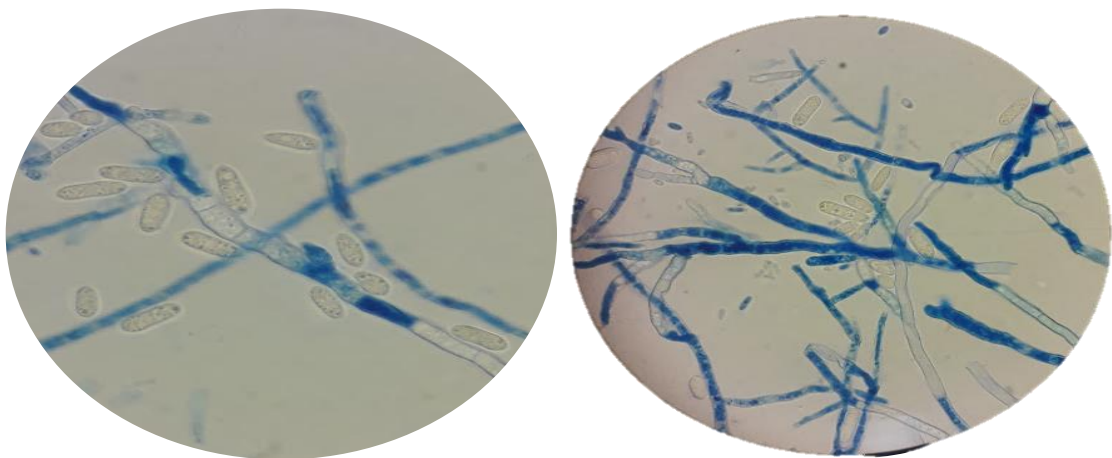
*Aislamiento del hongo Colletotrichum spp del fruto de tomate de árbol*



Las características de la Figura 6 son similares a las reportadas por Falconí et al., (2013); Caicedo et al., (2017) y Castro et al., (2019). Las coloraciones claras son asociadas con *C. acutatum* y para el conjunto de aislados la morfología de la colonia (superficie B y C) fue consistente con descripciones publicadas para las especies del complejo *C. acutatum*.

**Figura 7.**

*Observación microscópica de Colletotrichum spp (a partir del sustrato de Solanum betaceum)*



El desarrollo de los distintos aislados fue semejante y progresivo en medio PDA y después de 13 días a temperatura ambiente la caja Petri estuvo casi completamente recubierta por los aislados.

Según Oliveira et al., (2005) y Damm et al., (2012) menciona que el tipo de conidios presentan un extremo redondeado como se muestra en la Figura 7 y un extremo agudo correspondientes al tipo *C. acutatum*.

Sin embargo, Castro et al., (2019) y Caicedo et al., (2017) menciona que esta enfermedad es a menudo poco confiable para determinar adecuadamente la especie a la que corresponde un aislado, para estar seguros de la especie que se está trabajando es necesario regirse de un análisis molecular para su identificación. En el género *Colletotrichum*, la especie *C. acutatum* puede manifestarse o no como patógena (Sreenivasaprasad y Talhinhos, 2005). Mientras que *C. acutatum*, *C. asianum*, *C. boninense*, *C. tamarilloi* y *C. theobromicola* no son específicos y pueden desarrollarse en otros hospederos (Cabrera et al., 2018).

### ***5.1.3. Comparación de la actividad antifúngica del EEP mediante prueba de antibiograma con sensidiscos humedecidos***

Se realizó el conteo de esporas para preparación del inóculo según lo descrito en el apartado 4.9.2. (Conteo de UFC), obteniendo como resultado una concentración de  $10^5$  esporas/ml equivalente a 3 600 000 células.

#### **5.1.3.1. Porcentaje de Inhibición (%I)**

Las mediciones de los halos de inhibición se realizaron durante tres días en un periodo de siete días, en la Tabla 6 se detallan los halos de inhibición generados por los diferentes tratamientos, teniendo en cuenta también los halos de inhibición formados por el control positivo, considerando que previamente se calculó el promedio de los halos formados por cada tratamiento.

Para conocer la efectividad de los tratamientos evaluados sobre el crecimiento *in-vitro* de *Colletotrichum spp* se calculó el porcentaje de inhibición de cada uno de los tratamientos mediante la ecuación 1. En la Tabla 6, los tratamientos poseen una actividad antifúngica significativa contra *Colletotrichum spp*.

El tratamiento T3 generó un mayor halo de inhibición con un diámetro promedio de 15,80 mm y presenta un porcentaje de inhibición medio del 27,34 % en la dosis alta de EEP, también cabe mencionar que el tratamiento positivo TQ es aquel que tiene mayor halo de inhibición de 20,59 mm con el porcentaje de inhibición del 100%.

**Tabla 6.**

*Porcentaje de inhibición del hongo Colletotrichum spp.*

<b>Extracto</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Halos de inhibición (mm)</b>	<b>Control positivo (mm)</b>	<b>Porcentaje de inhibición (%)</b>
EEP 10 g 100/ml (Dosis baja)	T1 1	12,69	24,17	17,06
	T1 2	12,59		13,12
	T1 3	12,44		11,56
EEP 20 g 100/ml (Dosis media)	T2 1	15,83	24,17	30,04
	T2 2	13,02		14,91
	T2 3	12,50		11,83
EEP 30 g 100/ml (Dosis alta)	T3 1	15,59	24,17	29,03
	T3 2	15,65		15,79
	T3 3	16,14		26,88

El porcentaje de inhibición frente a otros estudios como menciona Campo et al., (2018) la mejor dosis del EEP fue al 10 % en una localidad de Oripaya (18,82%), seguida del EEP de los Patios (20%) con el 13,01% y de la localidad de San Cayetano no presentó efecto frente al crecimiento del hongo, los sensidiscos fueron cubiertos por el micelio de *C. gloeosporoides*. Otro estudio, realizados por González et al., (2016) quienes afirman que el extracto preparado al 10% es efectivo para inhibir a *C. gloeosporoides* agente causal de antracnosis en plantas cultivadas.

Otros ensayos similares, demuestran que el EEP a concentraciones de 500 y 1.000 mg/ml fue moderada, teniendo como mayor efecto de inhibición del crecimiento micelial sobre el hongo *C. acutatum* superior al 34 %, luego de 4 días de incubación; en estas mismas condiciones, el crecimiento micelial fue reducido para las especies *C. gloeosporioides* y *Penicillium spp* entre 20 y 30 %. (Palomino et al., 2010). También, Pineda et al., (2010) menciona en su estudio que las diluciones del propóleo al 15 %, 20 % y 30% ejercieron un efecto similar sobre *C. gloeosporioides*, considerando que resultaron iguales en su acción sobre el patógeno.

En general, la actividad antimicrobiana de los propóleos se atribuye a la diferencia entre los distintos perfiles del contenido ácidos fenólicos, flavonoides que presenta el propóleo que son los responsables de la bioactividad Chaillou y Nazareno (2009); es decir, la efectividad está relacionada con el origen geográfico y botánico del propóleo (Ahn et al., 2007), incluso Manrique (2006) afirma que puede influir el tiempo de recolección del mismo para su mejor inhibición.

### **5.1.3.2. Comparación de la actividad antifúngica del EEP**

Con la finalidad de comparar la eficacia de los tratamientos aplicados sobre el crecimiento *in-vitro* de *Colletotrichum spp* se procede a realizar el análisis estadístico en R studio, empleando un Test de Normalidad para determinar se utilizó la herramienta Shapiro-Wilk, en donde el valor p-valor = 0,05941, el resultado es mayor al valor de significancia 0,05; por ende, el supuesto de normalidad se cumple e indica una distribución normal de los diferentes datos, lo que permite realizar el análisis de varianza ADEVA aplicando un Diseño Completamente al Azar. En la Tabla 7 se puede observar los resultados obtenidos del análisis de varianza, en donde el valor p-valor =  $9,33 \cdot 10^{-12}$  es menor que el F calculado ( $F_0$ ). Por ende, los diferentes tratamientos se comportan de diferente manera. El análisis mencionado nos muestra un coeficiente de variación muy bajo de 2,38 % lo que lo que nos quiere decir que los datos de diámetro de inhibición son más homogéneos y por ende vamos a tener mejor manejo de la variación de los mismo.

**Tabla 7.**

*Análisis ADEVA sobre el diámetro de inhibición de EEP sobre Colletotrichum spp.*

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>MC</b>	<b>Fo</b>	<b>p-valor</b>	<b>Sig.</b>
<b>Tratamientos</b>	4	246,30	61,5	572	9,33 e <sup>-12</sup>	**
<b>Residuales</b>	10	1,08	0,11			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ); \*\* Diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ); ns No existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ )

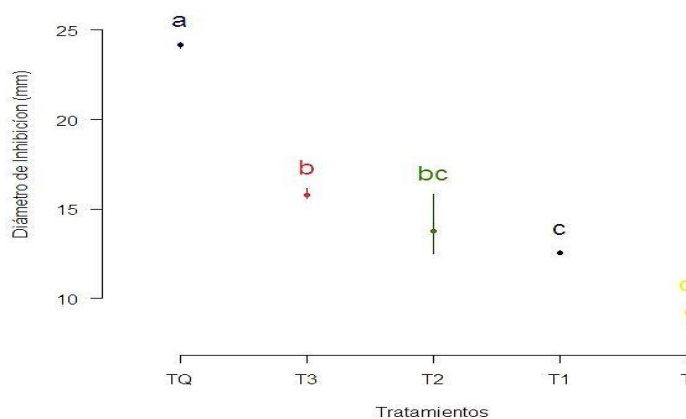
**Nota:** F.V.=Fuentes de Variación, GL= Grados de Libertad, SC= Suma de Cuadrados, CM= Cuadrados Medios, F= Valor F, Sig.= Significancia.

Al realizar la prueba Tukey al 5%, en la Figura 8 se puede apreciar los rangos de significancia en los diferentes tratamientos correspondientes al diámetro de inhibición y nos lleva a concluir que las disoluciones de EEP el tratamiento T3 es superior a las otras disoluciones de EEP, además de que el primer cuartil del tratamiento T3 es superior al tercer cuartil del siguiente tratamiento con mejores resultados que fue el tratamiento T2.

Además, se realizó una prueba Tukey para establecer el tratamiento que presenta mayor significancia para la inhibición del hongo *Colletotrichum spp.* En donde se puede comparar las medias y rangos (Figura 8) de la variable diámetro de inhibición frente a los diferentes grupos de tratamientos. Donde nos indica la que el T2-T1 es similar al igual del grupo de tratamientos T3-T2. Es decir, que el tratamiento con la disolución del tratamiento T2 y al T1 se comportan de la misma manera; del mismo modo se asemejan las disoluciones del tratamiento T3 y el T2, pero difieren entre los tratamientos T3-T1 en las disoluciones de EEP.

**Figura 8.**

*Prueba Tukey al 5% para el diámetro de inhibición.*



**Nota:** T= Alcohol Etilico 96% (Testigo), T1= 10 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96% (Dosis baja), T2= 20 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis media), T3= 30 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis alta), TQ= 0,30 l/ha azoxystrobin y difenoconazole (Control positivo).

El promedio del diámetro del halo de inhibición de los tratamientos T1, T2 y T3 es de 13,75mm. En comparación con otros estudios como menciona Chaillou et al., (2004) el diámetro promedio de halo de inhibición fue 10,68 mm, esto indica la existencia de actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos.

Otros ensayos demuestran que tienen fuertes propiedades anti-fungistáticas como menciona Dudoit et al., (2020) contra *C. musae* ( $81 \pm 1$  % de inhibición a 1,6 g) y otras fracciones aisladas muestran porcentajes de inhibición de  $35 \pm 4$  y  $42 \pm 1$  %, respectivamente, en el crecimiento micelial.

Las diferencias entre el diámetro de inhibición observadas en este estudio en comparación con otros ensayos de EEP frente al hongo *Colletotrichum spp*, posiblemente se deba a la actividad sinérgica entre sus componentes biológicos, principalmente entre los compuestos como indica Dudoit et al., (2020) la medicarpina, el (3S)-vestitol y el (3S)-neovestitol fueron

los principales compuestos identificados en un tipo de EEP y gracias a estos tiene un gran potencial inhibitorio.

#### 5.1.4. Incidencia y severidad en cámaras húmedas

##### 5.1.4.1. Incidencia

Con la finalidad de comparar la eficacia de los tratamientos aplicados sobre el crecimiento *in-vitro* de *Colletotrichum spp* se procede a realizar el análisis estadístico en R studio, empleando un Test de Normalidad para determinar se utilizó la herramienta Shapiro-Willk, en donde el valor p-valor = 0,152, el resultado es mayor al valor de significancia 0,05; por ende, el supuesto de normalidad se cumple e indica una distribución normal de los diferentes datos, lo que permite realizar el análisis de varianza ADEVA aplicando un Diseño Completamente al Azar. En la Tabla 8 se puede observar los resultados obtenidos del análisis de varianza, en donde el valor p-valor =  $2,27 \times 10^{-7}$  es menor que el F calculado (Fo). Por ende, los diferentes tratamientos se comportan de diferente manera. El análisis mencionado nos muestra un coeficiente de variación bajo del 13,12 %, lo que nos quiere decir que los datos de incidencia son homogéneos y por ende vamos a tener un manejo adecuado de la variación de los mismo.

**Tabla 8.**

*Análisis ADEVA sobre el porcentaje de incidencia de EEP sobre Colletotrichum spp.*

F.V.	GL	SC	MC	Fo	p-valor	Sig.
Tratamientos	4	7827	1956,7	73,38	$2,27 \times 10^{-7}$	**
Residual	10	267	26,7			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ); \*\* Diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ); ns No existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ )

**Nota:** F.V.= Fuentes de Variación, GL= Grados de Libertad, SC= Suma de Cuadrados, CM= Cuadrados Medios, F= Valor F, Sig.= Significancia.

Al realizar la prueba Tukey al 5%, en la Figura 9 nos lleva a concluir que las disoluciones de EEP el tratamiento T3 tiene el porcentaje más bajo a las otras disoluciones de EEP,

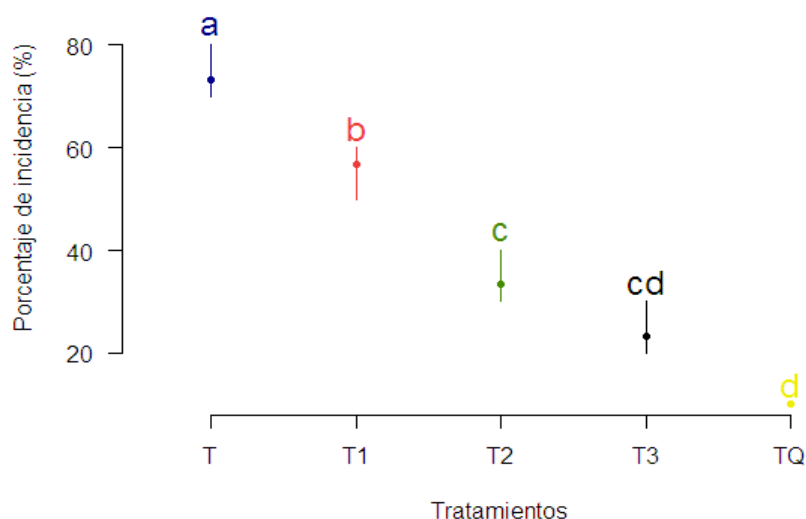
además de que el primer cuartil del tratamiento T3 es inferior al tercer cuartil del siguiente tratamiento con mejores resultados que fue el tratamiento T2.

Además, se realizó una prueba Tukey para establecer el tratamiento que presenta mayor significancia para la inhibición del hongo *Colletotrichum spp* en las cámaras húmedas. En donde se puede comparar las medias y rangos de la variable incidencia frente a los diferentes grupos de tratamientos. Los frutos almacenados a temperatura controlada a los 17 días después de la aplicación de los diferentes grupos de tratamiento, en donde nos indica la Figura 9 la incidencia menor (10,0 %) de la enfermedad de antracnosis se obtuvo con el control positivo (TQ), aunque estadísticamente no se diferencia del tratamiento donde se aplicó la disolución alta (T3), pero difiere de la disolución media (T2). La incidencia media mayor (73,33 %) se registró en el tratamiento testigo que consiste en alcohol etílico 96%.

La incidencia de antracnosis sólo disminuyó ligeramente en los tratamientos T3 y T2 a los 17 días de almacenamiento con 23,33 y 33,33 % respectivamente, comparando con el control que presentó 73,33 %.

### Figura 9.

*Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de incidencia.*



**Nota:** T= Alcohol Etílico 96% (Testigo), T1= 10 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96% (Dosis baja), T2= 20 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis media), T3= 30 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis alta), TQ= 0,30 l/ha azoxystrobin y difenoconazole (Control positivo).

### 5.1.4.2. Índice de Severidad

Con la finalidad de comparar la eficacia de los tratamientos aplicados sobre el crecimiento de *Colletotrichum spp* en cámaras húmedas, se procede a realizar el análisis estadístico en R studio, empleando un Test de Normalidad para determinar se utilizó la herramienta Shapiro-Willk, en donde el valor p-valor = 0,0576, el resultado es mayor al valor de significancia 0,05; por ende, el supuesto de normalidad se cumple e indica una distribución normal de los diferentes datos, lo que permite realizar el análisis de varianza ADEVA aplicando un Diseño Completamente al Azar. En la Tabla 9 se puede observar los resultados obtenidos del análisis de varianza, en donde el valor p-valor =  $9,73e^{-08}$  es menor que el F calculado (Fo). Por ende, los diferentes tratamientos se comportan de diferente manera. El análisis mencionado nos muestra un coeficiente de variación bajo del 10,66 % por ende vamos a tener un manejo adecuado de la variación de los mismos, lo que nos quiere decir que los datos de severidad son homogéneos y por ende vamos a tener un manejo adecuado de la variación de los mismo

**Tabla 9.**

*Análisis ADEVA sobre el índice de severidad de EEP sobre Colletotrichum spp.*

F.V.	GL	S.C.	MC	Fo	p-valor	Sig.
<b>Tratamientos</b>	4	437,1	109,28	87,42	9,73e-08	**
<b>Residuales</b>	10	12,5	1,25			

\* Diferencia significativa (p<0,05); \*\* Diferencia altamente significativa (p<0,01); ns No existe diferencia significativa (p>0,05)

**Nota:** F.V.=Fuentes de Variación, GL= Grados de Libertad, SC= Suma de Cuadrados, CM= Cuadrados Medios, F= Valor F, Sig.= Significancia.

Al realizar la prueba Tukey al 5%, en la Figura 10 nos lleva a concluir que las disoluciones de EEP el tratamiento T3 tiene el porcentaje más bajo a las otras disoluciones de EEP, además de que el primer cuartil del tratamiento T3 es inferior al tercer cuartil del siguiente tratamiento con mejores resultados que fue el tratamiento T2.

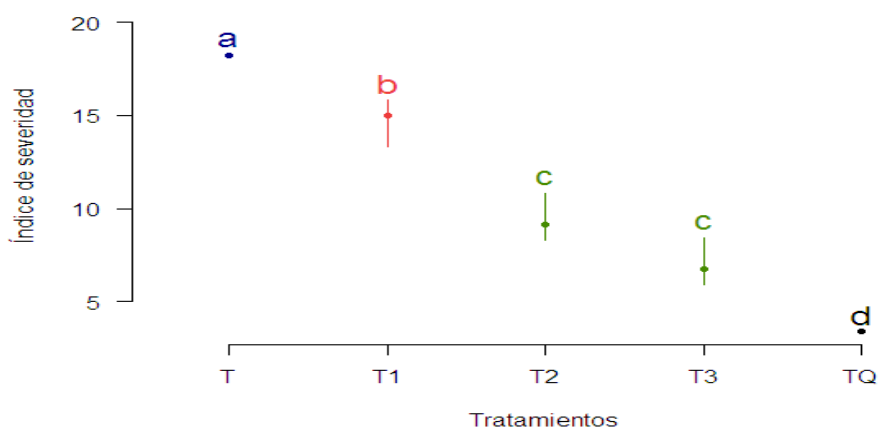
Además, se realizó una prueba Tukey para establecer el tratamiento que presenta mayor significancia para la inhibición del hongo *Colletotrichum spp* en las cámaras húmedas. En donde se puede comparar las medias y rangos de la variable incidencia frente a los diferentes grupos de tratamientos. Los frutos almacenados a temperatura controlada a los 17 días

después de la aplicación de los diferentes grupos de tratamientos, en donde nos indica la Figura 10 el índice de severidad menor (0,65) de la enfermedad de antracnosis se obtuvo con el control positivo (TQ), en los tratamientos donde se aplicó la disolución T3 (1,28) y la disolución T2 (1,74) se comportan de la misma manera o son semejantes entre los tratamientos. La severidad media mayor (3,47) se registró en el tratamiento testigo que consiste en alcohol etílico 96 %.

El índice de severidad de antracnosis sólo disminuyó ligeramente en los tratamientos T3 y T2 a los 17 días de almacenamiento con 2,13 y 2,73 respectivamente, comparando con el control que presentó 4,2.

**Figura 10.**

*Prueba Tukey al 5% para el índice de severidad.*



**Nota:** Alcohol Etílico 96 % (Testigo), T1= 10 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96% (Dosis baja), T2= 20 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis media), T3= 30 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis alta), TQ= 0,30 l/ha azoxystrobin y difenoconazole (Control positivo).

Los tratamientos con diferentes diluciones de propóleo evaluadas en esta investigación no presentan diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos T3 y T2, por lo tanto, las diluciones alta y media de propóleo resultaron similares en su efecto sobre el crecimiento del micelio del patógeno y numéricamente la variación en el porcentaje de inhibición dentro de ellas no fue superior al 8,31 %. Sin embargo, el presente estudio presenta el primer reporte sobre incidencia y severidad en cámaras húmedas con tomate de

árbol con el grupo de tratamientos T3, T2 y T1. Los estudios previos únicamente se han enfocado en la evaluación de fungicidas químicos (Campo et al., 2018; Sripong et al., 2020) botánicos (Pérez et al., 2018; Gómez, 2020) y biológicos (Orozco, 2021).

Por otra parte, son limitados los estudios *in-vivo* e *in-situ* (campo o invernadero) para contrastar información de incidencia y severidad frente al control de fitopatologías causadas por hongos a través de la EEP. Sin embargo, en la presente década se ha prestado bastante interés en la exploración del propóleo, principalmente se ha estudiado su actividad antibacteriana y fungicida (Hashemi, 2016). Incluso buscan las propiedades biológicas del propóleo que ayuden principalmente en el área de pos-cosecha (Dudoit et al., 2020, Sripong et al., 2020)

Particularmente, ensayos muestran similitudes en los diferentes tratamientos como menciona Pineda et al., (2010) en su estudio que las diluciones del propóleo al 15 % 20 % y 30% ejercieron un efecto similar sobre *C. gloeosporioides*, considerando que resultaron iguales en su acción sobre el patógeno. Otros investigadores, como es caso de Campo et al., (2018) demuestran en sus ensayos que el efecto inhibitorio puede ser las disoluciones al 30% con el mayor porcentaje de inhibición. Por otro lado, Dudoit et al., (2020) demuestra muy mínimas las concentraciones de EEP ( $81 \pm 1$  % de inhibición a 1,6 g) y consiguen un alto porcentaje de inhibición. Esta diferencia de eficiencia del propóleo se debe a varios parámetros y características del mismo (Silva-Carvalho et al., 2015).

Por tal motivo sería importante conocer la naturaleza química del EEP, al respecto Ahn et al., (2007) y Silva-Carvalho et al., (2015) mencionan que la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos en el propóleo son componentes significativos y responsables de la inactividad contra numerosos microorganismos fitopatógenos. Asimismo, la naturaleza química de los extractos de propóleo varía de una ubicación a otra, debido a la composición de las flores y de las especies botánicas existentes en cada territorio. Al respecto, Eguaras et al., (1999) y Bankova et al., (2000) reportaron diversos tipos de fenoles, principalmente ácidos fenólicos (benzoico, cafeico, ferúlico y cinámico) y flavonoides. Se han utilizado técnicas cromatográficas analíticas y de preparación, se han explicado al menos 241 compuestos químicos presentes en el propóleo (Shuai et al., 2014).

Debido a sus valiosas propiedades y a su no toxicidad, el propóleo debería ser propuesto como un antioxidante natural útil en los alimentos y suplementos para conservar los alimentos, prevenir muchas enfermedades mediadas por los radicales libres y beneficiar la salud de los consumidores (Chaillou y Nazareno, 2009). Una investigación adicional in vivo reveló que el EEP es una alternativa natural potencial para controlar la podredumbre de la corona del plátano sin reducir la pérdida de peso, mantener la firmeza y el cambio de color de la corona del banano, y no afectó el cambio de color de la cáscara ni la firmeza del banano (Dudoit et al., 2020; Sripong et al., 2020).

## CAPÍTULO VI

### 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1. Conclusiones

- En base a los resultados obtenidos de la evaluación de las variables en estudio se puede determinar que el tratamiento con la dilución que se desempeñó mejor para inhibir el hongo *Colletotrichum spp*, fue el tratamiento T3 con valores de 15,24 mm de diámetro que corresponde un porcentaje de 27,24 % en promedio de inhibición.
- Se pudo determinar por medio de la observación a los 17 días, que el porcentaje de incidencia en cámaras húmedas tratadas con las diferentes disoluciones de EEP el tratamiento T3 tuvo un porcentaje promedio bajó del 23,33 %, aunque estadísticamente son similares al tratamiento T2 con una diferencia del 10 % mayor al T3.
- También, se pudo determinar por medio de la observación a los 17 días, que el índice de severidad en cámaras húmedas tratadas con las diferentes disoluciones de EEP el tratamiento T3 tiene el índice más bajo de 1,28 mientras tanto el T2 se comporta similar de 1,74.
- El propóleo es un compuesto bioactivo que puede ser aprovechado por grandes y pequeños agricultores incluso después de su pos-cosecha sin afectar o exponer la salud humana y brindar una seguridad alimentaria. Los apicultores, son los principales comercializadores de ofrecer el material principal por ende tienen otro ingreso económico a parte de la producción de miel incluso de otros beneficios que genera la abeja. El apicultor tiene nuevas oportunidades económicas de crear productos bioactivos para el control de patógenos de manera segura.

## 6.2. Recomendaciones

- Este hecho sugiere, que cualquiera de las dos disoluciones pueden ser utilizada en pruebas para el control de la enfermedad en frutos pos-cosecha, recomendándole por supuesto la de menor concentración, sin embargo, es probable que concentraciones del propóleo inferiores a 1 g/ml también pudieran tener el mismo efecto supresor sobre el crecimiento de *Colletotrichum spp.* Por lo cual, deberían ser probadas para tratar de bajar la concentración a utilizar en estudios de control de antracnosis en otros frutos de la localidad, con miras a una mayor eficiencia del producto.
- Continuar esta investigación con propóleos de diferentes localidades (provincial o nacional) para evaluar las propiedades bioactivas del propóleo de forma más específica, ya que la diversidad vegetativa donde están ubicados los apicultores influyen en las propiedades del mismo.
- Se propone para futuras investigaciones adoptar las teorías relacionadas de la presente investigación a fin de canalizar los estudios orientados tal vez a otros tipos de fitopatógenos de pos-cosecha de frutas o verduras de importancia socioeconómica a nivel nacional.
- Con base en los resultados obtenidos, autores recomiendan el uso de estos propóleos como aditivos de origen natural para la conservación de alimentos. Al encontrar nuevas alternativas antifúngicas como es el caso del poder del propóleo que tiene beneficios para contrarrestar la propagación del hongo en frutos como es en el caso del tomate de árbol.

## CAPÍTULO VII

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. (2008). Enfermedades de las plantas causadas por hongos: Hongos superiores. J. G. Horsfall y E. B. Cowling, (Ed.), *Fitopatología*. (2ª ed., Vol. 5. pp. 280-281). Limusa, México.
- Aguiar, S. C., Zeoula, L. M., Franco, S. L., Peres, L. P., Arcuri, P. B. y Forano, E. (2013). Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria *in-vitro*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(10), 1951-1959.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1361-x>
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. y Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101(4), 1383-1392.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.045>
- Ávila Vélez, J. M. (2009). *Caracterización de cuatro genotipos de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.) cultivados en Ecuador y estudio del efecto del estrés hídrico y luminoso sobre las propiedades físico-químicas en la postcosecha y estimación de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos del genotipo anaranjado gigante* (Master's thesis, Quito: EPN, 2009).  
<http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/8232>
- Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring R. J. y Nash, C. (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey JA, Jeger MJ (Eds) *Biology, Pathology and Control*. CAB, International Press, Wallingford, 88–120.  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19932334981>

- Bankova, V. S., De Castro, S. L. y Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3–15.  
<https://doi.org/10.1051/apido:2000102>
- Becerra Miranda, M. P. y Rendón Londoño, T. M. (2020). Actividad antifúngica de extractos de propóleos sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*: alerta fitosanitaria en la industria del Banano. <http://hdl.handle.net/10946/4978>
- Cabrera, L., Rojas, P., Rojas, S., Pardo-De la Hoz, C.J., Mideros, M.F., Danies, G., Lopez-Kleine, L., Jiménez, P. y Restrepo, S. (2018). Most *Colletotrichum* species associated with tree tomato (*Solanum betaceum*) and mango (*Mangifera indica*) crops are not host-specific. *Plant Pathology*, 67(5), 1022-1030.  
<https://doi.org/10.1111/ppa.12829>
- Caicedo, J. D., Lalangui, K.P., Pozo, A.N., Cevallos, P.A., Arahana, A.S. y Méndez, K.S. (2017). Mul-tilocus molecular identification and phylogenetic analysis of *Colletotrichum tamarilloi* as the causal agent of Tamarillo (*Solanum betaceum*) anthracnose in the Ecuadorian highlands. *European Journal of Plant Pathology*, 148(4), 983-996. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1155-3>
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., y Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in mycology*, 73(1), 181–213.  
<https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Campo, Y., Muñoz, Y., Lopez, A., Contreras-Velásquez, J., Martínez, M. y Bermúdez, V. (2018). Evaluación de la capacidad antifúngica de los extractos etanólicos de propóleo ante la antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 35, 435-462.  
<http://bonga.unisimon.edu.co/handle/20.500.12442/2458>

- Cárdenas, O., Silva, E., Morales, L. y Ortiz, J. (2005). Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica*. 25(2):170-180.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572005000200003](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572005000200003)
- Castro-Quezada, P., Bravo-Zúñiga, C., Cabrera-Cabrera, A., Quillay-Curay, N., Ramón-Montoya, M., Belesaca-Morocho, I. y Diaz-Granda, L. (2019). Caracterización morfológica y molecular del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol en Azuay y Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 1-15.  
<https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/579>
- Chacin, C., Blanco, M. y Sánchez, S. (2013). Evaluación a nivel de laboratorio del efecto de 7 extractos vegetales para el control de *Colletotrichum* sp. agente causal de antracnosis en el cultivo de tomate de árbol. *Innovaciencia*. 1(1):30-35.  
<http://hdl.handle.net/20.500.12442/2458>
- Chaillou, L. L., Herrera, H. A. y Maidana, J. F. (2004). Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Food Science and Technology*, 24, 11-15.  
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000100003>
- Chaillou, L. L. y Nazareno, M. A. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT-Food Science and Technology*, 42(8), 1422-1427. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.002>
- Contreras, I. y Almeida, J. (2003). Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.) Solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forestal Venezolana*, 47(2), 9-13.

- Corrêa, J. L., Veiga, F. F., Jarros, I. C., Costa, M. I., Castilho, P. F., de Oliveira, K. M. P., ... Negri, M. (2020). Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 256, 112791.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112791>
- Dota, K. F. D., Consolaro, M. E. L., Svidzinski, T. I. E. y Bruschi, M. L. (2011). Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, Article ID 201953, 8 pages, 2011.  
<https://doi.org/10.1093/ecam/nej029>
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C. y Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in mycology*, 73, 37-113.  
<https://doi.org/10.3114/sim0010>
- Dudoit, A., Mertz, C., Chillet, M., Cardinault, N. y Brat, P. (2020). Antifungal activity of Brazilian red propolis extract and isolation of bioactive fractions by thin-layer chromatography-bioautography. *Food Chemistry*, 15, 327-127060.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127060>
- Eguaras, M., Del Hoyo, M., Palacio, M. A., Ruffinengo, S. y Bedascarrasbure, E. L. (1999). A new product with formic acid for *Varroa jacobsoni* Oud. control in Argentina I. Efficacy. *Journal of Veterinary Medicine*. 48: 11-14.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2001.00418.x>
- Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC). (2019). Tabulados. Tabulados de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2021. T. 27.  
<https://aplicaciones3.ecuadorencifras.gob.ec/BIINEC-war/index.xhtml>

- Falconí, C. E., Visser, R. G. F., y van Heusden, A. W. (2013). Phenotypic, Molecular, and Pathological Characterization of *Colletotrichum acutatum* Associated with Andean Lupine and Tamarillo in the Ecuadorian Andes. *Plant Disease*, 97 (6), 819–827. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0175-RE>
- Gómez, M. D. (2020). *Actividad antioxidante y antifúngica del extracto de semilla de mango (Mangifera indica L.) en Colletotrichum sp.* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Chapingo). <https://hdl.handle.net/20.500.12098/1034>
- González, S. I., Báez, O. L., Zaragoza, S. E. y Villarreal, A.W. (2016). Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7(8): 1879-1891. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342016000801879&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342016000801879&script=sci_abstract&tlng=pt)
- Hashemi, J.H. (2016). Biological effect of bee propolis: a review. *European Journal of Applied Sciences* 8: 311-318. [https://idosi.org/ejas/8\(5\)16/7.pdf](https://idosi.org/ejas/8(5)16/7.pdf)
- Hernández-López, M., Guillén-Sánchez, J., Bautista-Baños, S. y Guillén-Sánchez, D. (2018). Evaluación de películas biodegradables en el control de hongos postcosecha de la papaya. *Cultivos Tropicales*, 39(1), 52-60. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362018000100006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362018000100006)
- INEC. (2019). *Superficie según producción y ventas de tomate de árbol (Fruta fresca)*. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>.

- INEC. (2020). *Índice de Precios al Productor de Disponibilidad Nacional*.  
06-2020-IPP-DN, 1-18. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_Economicas/IPP/2020/Enero-2020/BOLETIN\\_TECNICO\\_IPPDN\\_2020\\_01.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Economicas/IPP/2020/Enero-2020/BOLETIN_TECNICO_IPPDN_2020_01.pdf)
- Jayawardena, R.S., Bhunjun, C.S., Hyde K.D., Gentekaki E. y Itthayakorn P. (2021).  
*Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. *Mycosphere* 12(1), 519–669.  
<https://doi.org/10.5943/mycosphere/12/1/7>
- León, J., Viteri, P., y Cevallos, G. (2004). *Manual del cultivo de tomate de árbol*.  
INIAP-PROMSA Quito; Vol.61, 10-13.  
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/827/4/iniapscm61.pdf>
- Landeró, M., Lara, F., Andrade, P., Aguilar, L. y Aguado, R. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum spp.*, 7(5), 1189-1198.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263146723018>
- León Ojeda, J. C. (2002). *Estudio morfológico de cinco cultivares de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.) en dos estados de cosecha y tres periodos de almacenamiento*. (Tesis Ing. Agr. 401 Quito (Ecuador): Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas), pp. 100. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=EC2004000010>
- Lugo, A. C., García, Y. E. M., Rojas, L. A. P., Valverde, A. R., Contreras, R. D. M. y Rojas, J. M. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista colombiana de biotecnología*, 14(2), 147-156.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n2/v14n2a16.pdf>

- Manrique, A. J. (2006). Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Tropical*, 24(1), 43-53.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-72692006000100004&script=sci\\_arttext](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-72692006000100004&script=sci_arttext)
- Maita, S. (2011). *Manejo del “ojo de pollo” o antracnosis (Colletotrichum acutatum Simmonds) en el cultivo del tomate de árbol (Solanum betacea Cav)*. (Cuenca, Ec.: Editorial Universitaria Católica de Cuenca).  
[https://www.researchgate.net/profile/Segundo-Maita-2/publication/317850880\\_Manejo\\_del\\_ojo\\_de\\_pollo\\_o\\_antracnosis\\_Colletotrichum\\_acutatum\\_Simmonds\\_en\\_el\\_cultivo\\_del\\_tomate\\_de\\_arbol\\_Solanum\\_betaceum\\_Cav/links/594ed5850f7e9be7b2da8410/Manejo-del-ojo-de-pollo-o-antracnosis-Colletotrichum-acutatum-Simmonds-en-el-cultivo-del-tomate-de-arbol-Solanum-betaceum-Cav.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Segundo-Maita-2/publication/317850880_Manejo_del_ojo_de_pollo_o_antracnosis_Colletotrichum_acutatum_Simmonds_en_el_cultivo_del_tomate_de_arbol_Solanum_betaceum_Cav/links/594ed5850f7e9be7b2da8410/Manejo-del-ojo-de-pollo-o-antracnosis-Colletotrichum-acutatum-Simmonds-en-el-cultivo-del-tomate-de-arbol-Solanum-betaceum-Cav.pdf).
- Manzo-Sánchez, G., Pérez-Ocón, R., Chan-Cupul, W., Silva-Jiménez, E., Sánchez-Rangel, J. C., Ayala-Zermeño, M. Á. y Galindo-Velasco, E. (2018). Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleo contra *Mycosphaerella fijiensis*: un estudio in vitro. *Scientia fungorum*, 47, 13-24.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2594-13212018000100013](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2594-13212018000100013)
- Martínez, J. P., (2009). *Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño*. Tesis de Maestría. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Colombia. p. 49-81. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/3416>
- Mattiuz, B. H., Ducamp -Collin, M. N., Mattiuz, C. F. M., Vigneault, C., Marques, K. M.,

- Sagoua, W. y Montet, D. (2015). Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of “Kent” mango. *Scientia Horticulturae*. 184: 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.035>
- Mejía, F., Alvarado, E. y Alvarado, B. (2016). Descripción agronómica del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Agroproductividad*: 9(8), pp: 78-86. <https://core.ac.uk/reader/249320590>
- Norma Técnica Ecuatoriana (NTE-INEN 1909). (2015). *Frutas Frescas. Tomate De Árbol. Requisitos*. Quito-Ecuador. [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_1909\\_2r.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1909_2r.pdf)
- Oliveira, R., Moral, J., Bouhmidi, K. y Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum spp.* causantes de la Antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31, 531-548. [https://www.researchgate.net/profile/Antonio-Trapero-Casas/publication/28160676\\_Caracterizacion\\_morfologica\\_y\\_cultural\\_de\\_aislados\\_de\\_Colletotrichum\\_spp\\_causantes\\_de\\_la\\_Antracnosis\\_del\\_olivo/links/02e7e5272afdf11337000000/Caracterizacion-morfologica-y-cultural-de-aislados-de-Colletotrichum-spp-causantes-de-la-Antracnosis-del-olivo.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Antonio-Trapero-Casas/publication/28160676_Caracterizacion_morfologica_y_cultural_de_aislados_de_Colletotrichum_spp_causantes_de_la_Antracnosis_del_olivo/links/02e7e5272afdf11337000000/Caracterizacion-morfologica-y-cultural-de-aislados-de-Colletotrichum-spp-causantes-de-la-Antracnosis-del-olivo.pdf)
- Orozco Vergel, J. P. (2021). *In vivo study: effect of essential oils and lipopeptides from Bacillus tequilensis EACB0015 on the growth of the phytopathogenic fungus Colletotrichum acutatum EAHP-012* (Bachelor's thesis, Universidad EAFIT). [https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/30034/JoanaPaola\\_OrozcoVergel\\_2021.pdf?sequence=2](https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/30034/JoanaPaola_OrozcoVergel_2021.pdf?sequence=2)

- Oryan, A., Alemzadeh, E. y Moshiri, A. (2018). Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 98, 469-483. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.069>
- Pérez Cordero, A., Vitola Romero, D. y Chamorro Anaya, L. (2018). Activity of essential oil of Basil (*Ocimum basilicum*) Against *Colletotrichum gloeosporioides* OF YAM (*Discorea alata*). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 21(1), 99-108. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n1.2018.667>.
- Prusky, D., Kobiler, I., Jacoby, B., Sims, J.J. y Midland, S.L. (1992). Efecto de los inhibidores de la actividad lipoxigenasa y su posible relación con la latencia de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de aguacate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 27 (1), 269-279.
- Palomino García, L. R., Martínez Galán, J. P., García Pajón, C. M., Gil González, J. H. y Durango Restrepo, D. L. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(1), 5373-5383. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-28472010000100013](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472010000100013)
- Parra, L. (2008). *Relación entre infecciones quiescentes de Colletotrichum gloeosporioides y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango Magnifera indica variedad hilacha*. (Trabajo de grado. Facultad Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá), Colombia. 112 p. <http://hdl.handle.net/10554/8311>

- 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*, 28(1), 83-91.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2594-13212018000100013](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2594-13212018000100013)
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G. y Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar type propolis. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 15(4), 235-240.  
<https://doi.org/10.1002/pca.777>
- Popova, M., Silici, S. Í. B. E. L., Kaftanoglu, O. y Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12(3), 221-228.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.007>
- Réblová, M., Gams W. y Seifert K. A. (2011). Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. *Studies in Mycology* 68:163-191. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.07>
- Revelo, J., Pérez, E. y Maila, M. (2004). *Manual Guía de Capacitación Del Cultivo Ecológico De Tomate de Árbol en Ecuador*. Quito: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
- Revelo, J., Mora, E., Gallegos, P. y Garcés, S. (2008). *Enfermedades, nematodos e insectos plaga del tomate de árbol (Solanum betaceum Cav). Una guía para su identificación en el campo*. Quito: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

- Rodríguez, T. P. D., González, S. I. R., Báez, O. L. y Coronado, A. C. M. (2021).  
Extractos vegetales para el control in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides* P.  
aislado de *Carica papaya* L. *Espacio I+ D, Innovación más desarrollo*, 10(26).  
<https://doi.org/10.31644/IMASD.26.2021.a05>
- Rajo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-  
Barajas, A. y Allende-Molar, R. (2017). Situación actual de *Colletotrichums spp.* en  
México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista mexicana de  
fitopatología*, 35(3), 549-570. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1703-9>
- Sánchez, V., Urrutia, T., Mendoza, W., Vallejo, G., Acedo, F., Sánchez, J., y otros. (2014).  
Mecanismos involucrados en la Actividad Antioxidante y antibacteriana del  
Propóleo. *Biotecnia*, pp: 79-89. <https://doi.org/10.18633/bt.v16i1.31>
- Sendtner, O. (1845). De *Cyphomandra*, novo *Solanacearum* genere tropicae Americae.  
*Flora* 28: 161-176.
- Shuai, H., Cui-Ping, Z., Kai, W., Li, G.Q. y Fu-Liang, H. (2014). Recent advances in the  
chemical composition of propolis. *Molecules* 19(12), 19610-19632.  
<https://doi.org/10.3390/molecules191219610>
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F. y Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: a complex natural  
product with a plethora of biological activities that can be explored for drug  
development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015,  
Article ID 206439, 29 pp. <https://doi.org/10.1155/2015/206439>
- Simmonds, J. H. (1968). Type specimens of *Colletotrichum gloeosporioides* var. minor  
and *Colletotrichum acutatum*. *Qd. J. agric. Anim. Sci.*, 25, 178.  
<https://cir.nii.ac.jp/crid/1571698600552358144>

- Sreenivasaprasad, S. y Talhinas, P. (2005). Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Mol. Plant Pathol*, 6(4),361-378. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00291.x>
- Sripong, K., Srinon, T., Ketkaew, K., Uthairatakij, A. y Jitareerat, P. (2020). Impacts of paraffin wax and propolis on controlling crown rot disease and maintaining postharvest quality of banana. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*,515 (1), p. 012036. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/515/1/012036>
- Than, P. P., Shivas, R. G., Jeewon, R., Pongsupasamit, S., Marney, T. S., Taylor, P. W. J. y Hyde, K. D. (2008). Epitypification and phylogeny of *Colletotrichum acutatum* JH Simmonds. *Fungal Diversity*, 28, 97-108.  
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.653.4300&rep=rep1&type=pdf>
- Wharton, P. y Diéguez, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 61(1), 3-22.  
<https://doi.org/10.3989/ajbm.2004.v61.i1.61>

## ANEXOS

### Anexo 1

**Tabla 10.**

*Plan de Actividades en el periódico académico*

Actividad	MESES															
	1				2				3				4			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Recolección del propóleo																
Extractos de propóleo																
Recolección de las muestras																
Identificación del hongo																
Pruebas de Antibiogramas																
Cámara húmedas																
Recolección de datos																
Análisis de resultados																

## Anexos 2

Recolección del propóleo y extracción del propóleo

**Figura 11.**

*Recolección del propóleo y extracción del propóleo.*

A)



B)



C)



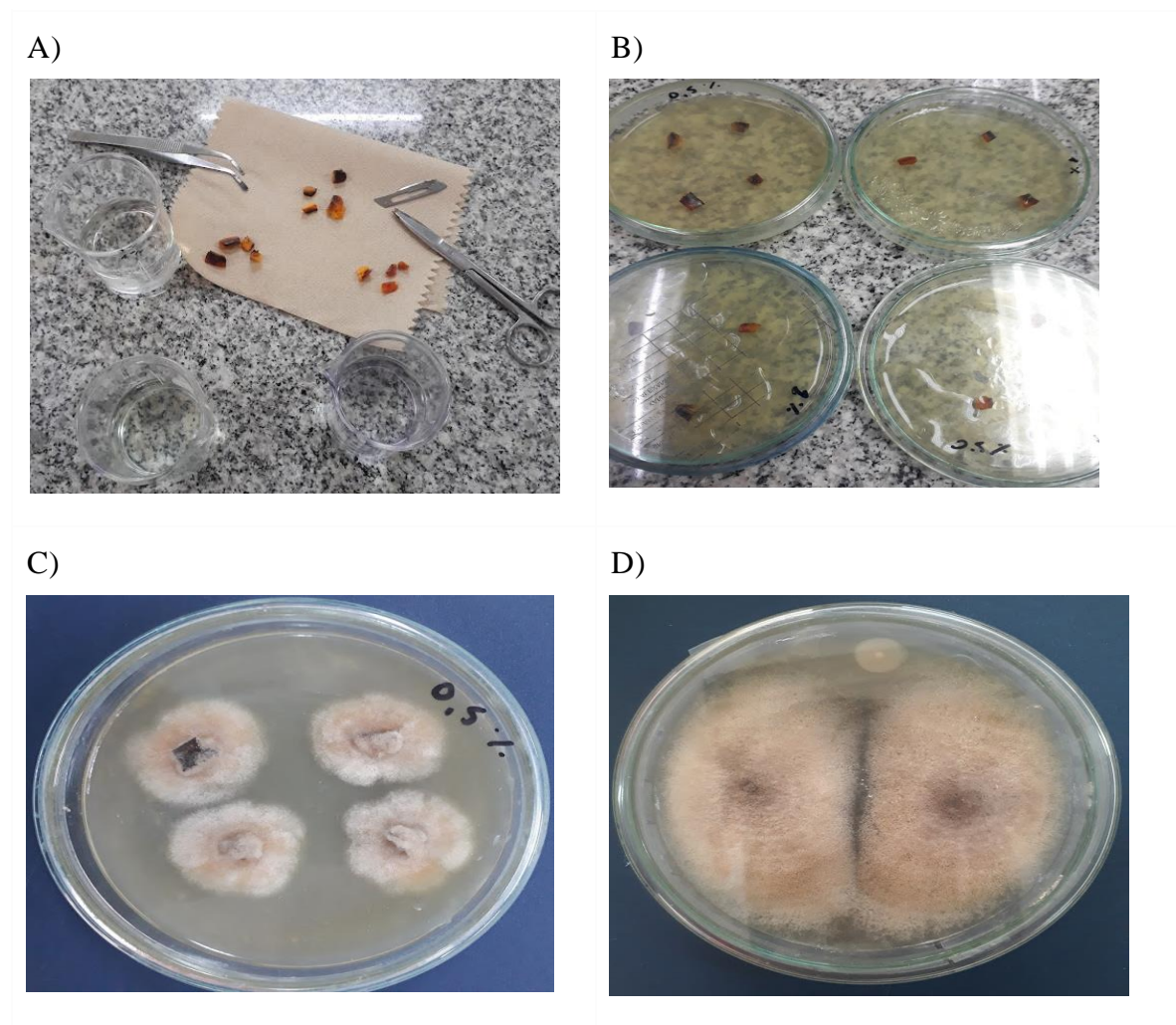
**Nota:** A) Recolección del propóleo y preparación de las diferentes disoluciones (10g, 20g y 30g) de propóleo en etanol al 96%, y precipitación de la cera con la ayuda de la incubadora por un periodo de 72 horas. B) filtración del EEP en tubos de ensayo para realizar los antibiogramas correspondientes. C) obtención del EEP para las cámaras húmedas.

### Anexos 3

Recolección de las muestras y aislamiento del hongo

**Figura 12.**

*Recolección de las muestras y aislamiento del hongo.*



**Nota:** Para el aislamiento del fitopatógeno se procede: A) Selección y tratamiento del tejido enfermo de las muestras del fruto de tomate de árbol; B) y C) Siembra de las muestras en medio nutritivo PDA; D) Resiembra de las colonias aisladas

## Anexo 4

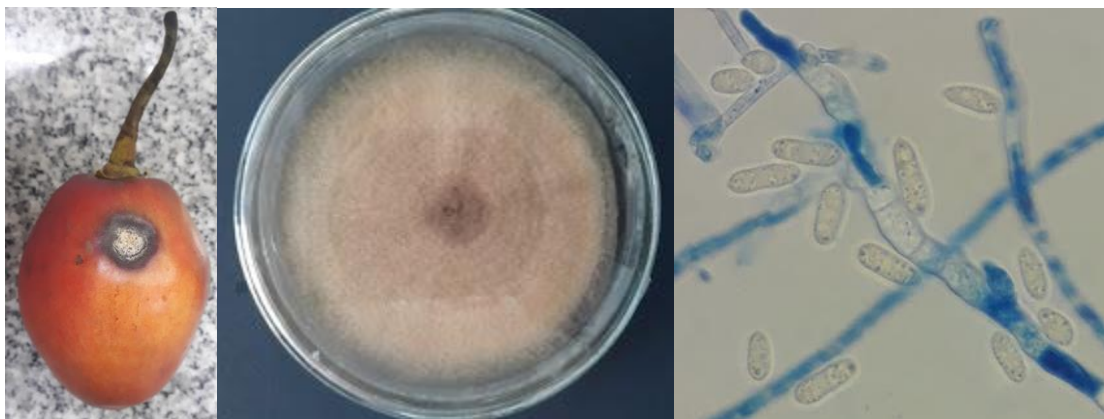
### Figura 13.

*Cuantificación e identificación del hongo Colletotrichum spp.*

A)



B)



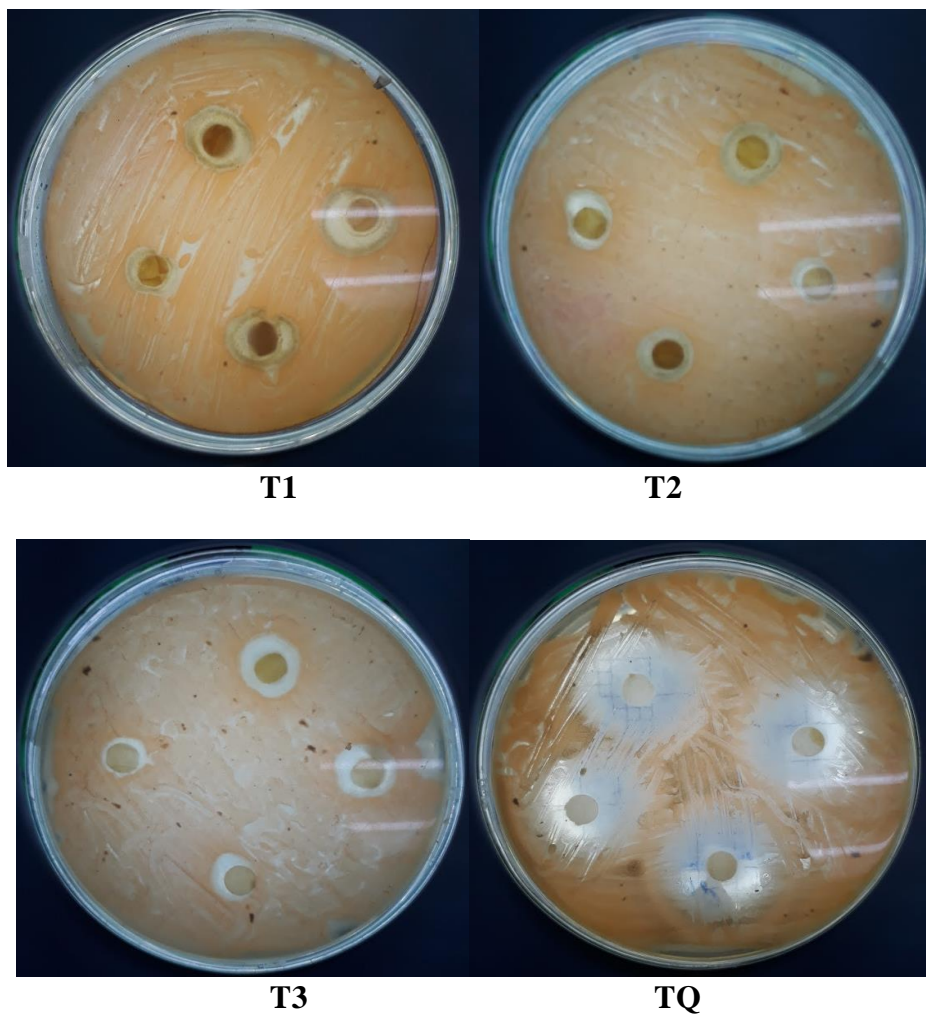
**Nota:** A) Cuantificación del hongo *Colletotrichum spp* en la cámara de Neubauer B) Identificación del hongo

## Anexos 5

### Pruebas de Antibiogramas

#### Figura 14.

*Pruebas de antibiogramas con el fitopatógeno de antracnosis en un periodo de 72 horas.*





**T**

**Nota:** T= Alcohol Etílico 96 % (Testigo), T1= 10 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96% (Dosis baja), T2= 20 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis media), T3= 30 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis alta), TQ= 0,30 l/ha azoxystrobin y difenoconazole (Control positivo), frente al hongo *Colletotrichum spp.*

Anexo 6

Figura 15.

*Cámaras húmedas*

A)



B)



T1

T2



T3



TQ



**T**

**Nota:** T= Alcohol Etfílico 96 % (Testigo), T1= 10 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96% (Dosis baja), T2= 20 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis media), T3= 30 g del propóleo y se diluyen en 100 ml de etanol al 96 % (Dosis alta), TQ= 0,30 l/ha azoxystrobin y difenoconazole (Control positivo), frente al hongo *Colletotrichum spp.*

## Anexo 7

Recolección de datos

**Tabla 11.**

*Recolección de datos del halo de inhibición en (mm)*

Trata.	Halo de inhibición (mm)								
	24 h			72h			144 h		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1	12,03	10,05	12,21	13,85	13,58	11,58	14,44	14,16	14,78
	11,22	9,8	12,02	14,1	13,02	13,52	14,02	14,1	10,5
	13,05	12,81	11,88	11,42	12,46	11,1	12,11	11,07	12,5
	10,95	10,67	11,25	9,82	12,78	10,39	10,2	11,05	11,98
T2	12,42	10,19	10,72	12,5	10,75	13,05	14	13,97	12,85
	11,85	10,83	10,89	11,47	10,9	13,08	14,83	11,11	13,69
	11,83	10,46	12,3	14,33	13,14	10,61	16,3	12,92	10,88
	9,95	12	10,9	10,27	11,78	13,94	18,19	14,11	12,6
T3	15,51	14,74	13,95	16,14	17,56	15,39	17,43	13,51	16,26
	14,35	15,37	14,13	17,62	13,31	16,89	16,48	16,91	15,31
	13,7	14,18	14,48	16,12	16,82	13,42	12,23	16,63	17,08
	14,07	14,76	14,9	12,65	13,01	16,13	16,21	15,58	15,92
TQ	14,75	14,86	15,45	23,88	23,81	21,65	22,69	23,86	23,69
	14,8	15,76	14,81	20,88	21,71	22,57	24,48	25,06	23,45
	16,31	14,92	14,84	22,03	22,62	21,14	25,75	24,81	25,54
	14,82	15,24	16,27	22,19	22,02	23,88	24,33	23,2	23,17
T	8,93	7,53	7,08	6,9	8,01	7,84	7,72	9,69	10,45
	9,47	7,01	7,59	6,94	9,25	7,07	9,06	9,09	8,5
	6,93	8,34	9,04	8,8	7,11	8,87	8,35	10,23	10,08
	6,92	8,36	7,3	9,45	8,11	9,2	9,15	8,69	9,55

**Tabla 12.**

*Recolección de datos de incidencia y severidad*

<b>Trat.</b>	<b>Incidencia (%)</b>		
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
<b>T1</b>	60	50	60
<b>T2</b>	30	30	40
<b>T3</b>	30	20	20
<b>TQ</b>	10	10	10
<b>T</b>	70	70	70

<b>Trat.</b>	<b>Índice de severidad</b>		
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
<b>T1</b>	3,01	2,54	3,01
<b>T2</b>	1,58	1,58	2,06
<b>T3</b>	1,60	1,13	1,13
<b>TQ</b>	0,65	0,65	0,65
<b>T</b>	3,47	3,47	3,47