



Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleo contra *Mycosphaerella fijiensis*: un estudio *in vitro*

Antifungal activity of ethanolic extracts of propolis against *Mycosphaerella fijiensis*: an *in vitro* study

Gilberto Manzo-Sánchez¹, Roberto Pérez-Ocón¹, Wilberth Chan-Cupul¹, Elvira Silva-Jiménez¹,
Juan Carlos Sánchez-Rangel¹, Miguel Ángel Ayala-Zermeño², Edelmira Galindo-Velasco³

¹Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, A. P. 36, Autopista Colima-Manzanillo Km 40, C. P. 28934, Tecomán, Colima, México. ²Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Km 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC, Col. Tepeyac, C.P. 28110, Tecomán, Colima, México. ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Colima, A. P. 36, Autopista Colima-Manzanillo Km 40, C. P. 28934, Tecomán, Colima, México.

Wilberth Chan-Cupul, email: wchan@ucol.mx

RESUMEN

Antecedentes: El agente causal de la Sigatoka Negra, *Mycosphaerella fijiensis*, es el principal problema fitosanitario en la producción de banano y plátano en el continente Americano.

Objetivos: Evaluar la actividad antifúngica de tres extractos etanólicos de propóleo sobre el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis*.

Métodos: Se estableció un bioensayo dosis respuesta con tres extractos etanólicos de propóleo (EEP: PTeco1, PTeco2 y PYuc) empleando cuatro concentraciones (1.25, 2.5, 5.0 y 10.0% v/v). Se determinaron la tasa de crecimiento diaria (TCD), porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%ICM), concentración efectiva media (CE₅₀) y contenido de fenoles totales.

Resultados y conclusiones: El EEP PYuc redujo la TCD y presentó los %ICM más altos en *M. fijiensis*. La CE₅₀ más baja fue para PYuc (0.24%) seguida de PTeco1 (0.86%) y PTeco2 (3.34%). PYuc (140.47 µg/mL) mostró mayor contenido de fenoles totales al compararlo con PTeco1 (100.94 µg/mL) y PTeco2 (105.82 µg/mL). En conclusión, por su baja CE₅₀ el propóleo PYuc posee mayor actividad antifúngica en comparación a los dos propóleos locales estudiados.

Palabras clave: CE₅₀, fenoles totales, inhibición, Sigatoka Negra

ABSTRACT

Background: The causal agent of Black Sigatoka, *Mycosphaerella fijiensis*, is the main phytosanitary problem in the production of banana and plantain in the American continent.

Objectives: To evaluate the antifungal activity of three ethanol extracts of propolis on the *in vitro* growth of *M. fijiensis*.

Methods: A dose response bioassay was established with three ethanol extracts of propolis (EEP: PTeco1, PTeco2 and PYuc) using four concentrations (1.25, 2.5, 5.0 and 10.0% v/v). The daily growth rate (DGR), percentage of mycelial growth inhibition (%MGI), mean effective concentration (EC₅₀) and total phenol content were determined.

Results and conclusions: EEP PYuc reduced the DGR and achieved the highest %MGI in *M. fijiensis*. PYuc (0.24%) achieved the lowest EC₅₀ followed by PTeco1 (0.86%) and PTeco2 (3.34%). PYuc (140.47 µg/mL) showed the highest content of total phenols in comparison to PTeco1 (100.94 µg/mL) and PTeco2 (105.82 µg/mL). In conclusion, by its low EC₅₀ the PYuc propolis has higher antifungal activity than the two local propolis studied.

Keywords: EC₅₀, total phenols, inhibition, Black Sigatoka

Recibido / Received: 25/01/2018

Aceptado / Accepted: 15/03/2018

INTRODUCCIÓN

La Sigatoka Negra (SN) es la enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [Ascomycota: Mycosphaerellaceae, anamorfo *Pseudocercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton], y es el principal problema fitosanitario del cultivo del banano y el plátano en América, Asia y África (Hidalgo *et al.*, 2006). Desde su primer reporte al sur de Chiapas, en la década de los 80, *M. fijiensis* se ha diseminado rápidamente en casi todas las zonas productoras de banano en los últimos 15 años (Aguilar-Barragán *et al.*, 2014). El hongo causa lesiones foliares necróticas que se expanden y destruyen los tejidos, reduciendo la capacidad fotosintética, afectando la maduración temprana del fruto y el volumen de producción (Martínez-Bolaños *et al.*, 2012).

El manejo de la SN constituye uno de los principales rubros para la industria bananera, ya que puede alcanzar entre 27 y 50% del costo total de la producción (Sagratzki-Cavero *et al.*, 2015). De forma tradicional, el control de la SN se apoya en un programa de manejo integrado del cultivo que considera mejorar el drenaje del suelo, una baja densidad de plantación (2000 plantas/ha), balance nutricional de N, P y K (inducción de resistencia fisiológica), control de malezas, eliminación de tejido enfermo (reducción de inóculo) y control químico. Siendo este último el más usado a pesar de ser costoso y comprometer el agroecosistema.

Algunos de los fungicidas más empleados contra *M. fijiensis* son mancozeb y clorotalonil (que actúan de forma preventiva), además de ingredientes sistémicos de los grupos bencimidazoles, triazoles, estrobilurinas y anilopirimidinas (Martínez-Bolaños *et al.*, 2012).

La resistencia a fungicidas es un factor crítico que limita la eficiencia de los programas de manejo integrado de *M. fijiensis*, debido al incremento de dosis o frecuencias de aspersiones, principalmente a fungicidas sistémicos de los grupos bencimidazoles, triazoles y estrobilurinas (Martínez-Bolaños *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior, el uso de productos químicos para el manejo de SN ha ocasionado diversos problemas ecológicos. Ante esta situación, una alternativa podría consistir en el uso de propóleo como antifúngico, ya que este puede actuar de forma equilibrada y eficaz con el ambiente, debido a su origen natural (Pineda *et al.*, 2010).

El propóleo es un conjunto de sustancias gomosas y resinosas que varía de acuerdo con su origen, y el cual se compone de resinas y bálsamos (50-55%), cera de abeja (30 a 40%), aceites esenciales o volátiles (5 a 10%), polen (5%) y otros materiales orgánicos (5%). En este producto natural se han identificado más de 240 sustancias, de las cuales 50% son compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas y triglicéridos fenólicos) con acción farmacológica (Shuai *et al.*, 2014).

El propóleo, en forma de extractos etanólicos (EEP), se ha empleado de manera exitosa en estudios de inhibición *in vitro* de diversos hongos fitopatógenos, tales como *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporium* f. sp. *melonis* (Özcan *et al.*, 2004), *Colletotrichum gloeosporioides* (Pineda *et al.*, 2010), *Didymella bryoniae*, *Rhizoctonia solani* (Gallez *et al.*, 2014) y *Alternaria solani* (Vargas-Toledo *et al.*, 2016). Sin embargo, aún no se han explorado los extractos etanólicos de propóleo como posible alternativa de control de *M. fijiensis*. Por lo tanto, la hipótesis de investigación planteada fue que la concentración efectiva media (CE₅₀) difiere entre los extractos etanólicos de propóleo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antifúngica de tres extractos etanólicos de propóleo sobre el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis* aislada de una huerta de banano orgánico del estado de Colima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Mycosphaerella fijiensis*

Se tomaron muestras de tejido foliar con presencia de SN entre los grados de infección 2-5 (Rodríguez-Gaviria y Cayón, 2008), de una huerta orgánica en producción ubicado en la localidad de Armería, Colima, México (19°06'39.32" N y 103°86'46.95" O). Se cortaron fragmentos de tejido foliar de 4 × 4 cm y se desinfectaron con una solución acuosa de hipoclorito de sodio (20% v/v) y Tween 80 (500 µL/L) durante 10 min; después, el tejido se secó en papel filtro estéril (Whatman No. 1). El tejido desinfectado se depositó en cámaras húmedas (caja de Petri con papel filtro estéril húmedo) durante cinco días para inducir la conidiogénesis. Después, con una pinza estéril y en campana de flujo laminar, la superficie abaxial de los fragmentos de tejido foliar se presionaron directamente sobre agar-agua (3%) conte-



nido en cajas de Petri, para la liberación de conidias, con una aguja subdermal en estereoscopio se tomaron las conidias y se depositaron en agar papa dextrosa (APD) suplementado con cloranfenicol (100 mg/L). Los aislados monospóricos de *M. fijiensis* se cultivaron a 25 ± 2 °C con luz constante (Conde-Ferrández *et al.*, 2008). Para los bioensayos se emplearon micelios monospóricos de 3 semanas de edad, con la finalidad de poseer colonias con características homogéneas, tales como velocidad de crecimiento e infectividad (Cortez-Madrigal *et al.*, 2003).

Origen del propóleo

El propóleo crudo provino de dos apiarios; el primero se localizó al suroeste de Tecmán ($18^{\circ}51'17.45''$ N y $103^{\circ}54'58.34''$ O), Colima, México (PTeco1), y el segundo (PTeco2) al noroeste del mismo municipio ($18^{\circ}57'36.88''$ N y $103^{\circ}53'47.51''$ O). El tercero fue un extracto etanólico comercial (Casa del Apicultor®, San Juan, Valladolid, Yucatán, México) adquirido en el estado de Yucatán. Los criterios de selección de los propóleos fueron la disponibilidad y el tipo de vegetación. Los propóleos PTeco1 y PTeco2 provienen de una selva mediana caducifolia y selva baja caducifolia, respectivamente, según el inventario estatal forestal y de suelos del estado de Colima (CONAFOR, 2013a). Mientras que el PYuc proviene de una selva baja caducifolia. Todas estas vegetaciones poseen el mismo tipo de clima Aw_0 (cálido subhúmedo, CONAFOR, 2013a; 2013b).

Obtención de los extractos etanólicos de propóleo

El propóleo se enfrió hasta 5 °C para desmenuzarlo con facilidad (partículas < 0.25 cm), posteriormente, se preparó una mezcla al 50% (p/v) en etanol 96° GL (Eyng *et al.*, 2015; Cerqueira-Sales *et al.*, 2016). La mezcla se incubó en oscuridad, dentro de un agitador orbital (Felisa®, México), a 150 rpm a 20 °C durante siete días. Después, el extracto se filtró en papel Whatman No. 1 con una bomba de vacío. La concentración obtenida se consideró 100%, a partir de este último se obtuvieron las diluciones a evaluar en los ensayos con *M. fijiensis*.

Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de fenoles totales de los tres extractos etanólicos de propóleo se determinó a través del método Folin-Ciocalteu

(Sigma-Aldrich®, EE.UU., Sánchez-Rangel *et al.*, 2013). Para ello, se desarrolló una curva estándar de ácido gálico (0, 10, 20, 40, 60, 90 y 120 µg/mL) (Sigma-Aldrich®, EE.UU.), con tres repeticiones por concentración. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 725 nm en un espectrofotómetro (Luzeren L6S, México). El contenido de fenoles se expresó como microgramos de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mililitro de EEP.

Bioensayos dosis-respuesta

La adición del EEP a diferentes concentraciones al APD se efectuó una vez que este último, previamente esterilizado, alcanzó 40 °C. Posteriormente, el medio se agitó manualmente y se vació en cajas de Petri de 90 x 15 mm. Como control negativo se usó APD sin EEP y como control positivo se empleó APD con 10% (v/v) de etanol 96 °GL. El etanol posee actividad inhibitoria en organismos fúngicos (Paschos *et al.*, 2015), por lo tanto, se estableció el control positivo para conocer este efecto en *M. fijiensis*, a pesar de que las inhibiciones fueron calculadas en función del control negativo. Las concentraciones de EEP evaluadas fueron: 0, 1.25, 2.5, 5 y 10% (v/v), las cuales fueron seleccionadas con base a estudios previos de actividad antifúngica (Pineda *et al.*, 2010; Guginski-Piva *et al.*, 2015). Se emplearon cinco repeticiones por concentración y control evaluado.

Preparación del inóculo

A partir de los cultivos de *M. fijiensis*, de 21 días de edad, se tomaron dos discos de micelio con un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro, los cuales se depositaron en el centro de la caja de Petri con APD + EEP. Posteriormente, las cajas de Petri se incubaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C, $75 \pm 5\%$ de humedad relativa, con 12 h luz/oscuridad). A los 5, 15, 22, 34 y 54 días, al reverso de las placas se tomaron fotografías a las colonias con una cámara digital Kodak® (Easyshare M350, New York, EE.UU.) a una distancia de 20 cm entre la caja de Petri y la cámara. A partir de las imágenes digitales se calculó el área de crecimiento del micelio con el programa ImageJ® 1.44 (Rasband, 2011). Los periodos de evaluación mencionados, fueron establecidos debido a la particularidad de las colonias de *M. fijiensis*, los cuales poseen lento crecimiento (6.3 mm en 14 días aproximadamente, Manzo-Sánchez *et al.*, 2001).

Variables de respuesta

Se evaluó la tasa de crecimiento diaria del micelio (TCD), determinada con el área de los micelios durante 54 días. La TCD se calculó con la fórmula: $TCD = \bar{X}\Sigma(C_{t1} - C_{t1-1} \dots n)$, donde, n = fue el número de evaluaciones y C_t = el número de días de crecimiento (Poprawski & Majchrowicz, 1995). El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%ICM) se calculó con la ecuación: $\%ICM = [(C - T)/C] \times 100$, donde C fue el área del micelio en la caja de Petri del tratamiento testigo (sin EEP) y T el área del micelio en la caja del tratamiento con el EEP (Zamora-Natera *et al.*, 2008). La concentración efectiva media (CE_{50}) se calculó empleando los porcentajes de inhibición en cada concentración del EEP, por medio de un análisis Probit, a través del software Statistical Analysis System (SAS) ver. 8 para Windows (SAS Institute Inc., 2000).

Análisis de datos

La TCD, el %ICM y el contenido de fenoles se sometieron a un análisis de varianza y una comparación de medias empleando la diferencia mínima significativa (DMS) al 0.05 de probabilidad. Los datos del %ICM se transformaron con la ecuación $\arcsen\sqrt{(inhibición/100)}$ para su posterior análisis. Además, se realizó un análisis de regresión lineal ($Y=mX+b$) entre la concentración de propóleo (X) y los porcentajes de inhibición (Y), para conocer la relación directa. Todos los análisis se realizaron con el software StatGraphics Plus 4.0.

RESULTADOS

Tasa de crecimiento diaria (TCD)

Extracto etanólico de propóleo PTeco1

A los 5, 15 y 22 días de cultivo, el EEP PTeco1 no mostró reducción en la TCD de *M. fijiensis*. Por el contrario, algunas concentraciones significativamente incrementaron su biomasa en comparación con el control positivo (PDA + etanol 10% v/v), p. e. 1.25 y 2.5% a los 5 ($F=18.81$, $P=0.00001$), 15 ($F=43.21$, $P=0.0001$) y 22 ($F=42.56$, $P=0.0035$) días. Por el contrario, la concentración de EEP PTeco1 al 10% significativamente redujo la TCD de *M. fijiensis* a los 34 ($F=39.89$, $P=0.0035$) y 54 ($F=40.10$, $P=0.0153$) días de evaluación (Tabla 1). Las reduccio-

nes fueron de 0.104 (control positivo) a 0.009 cm²/día y de 0.198 (control positivo) a 0.044 cm²/día a los 34 y 54 días, respectivamente.

Extracto etanólico de propóleo PTeco2

La concentración de 1.25% no mostró efecto en la reducción del crecimiento de *M. fijiensis*; por el contrario, incrementó significativamente ($P<0.05$) la biomasa del patógeno en todos los días evaluados. Las reducciones significativamente notables en la TCD de *M. fijiensis* se encontraron a los 34 y 54 días de evaluación en las concentraciones de 5 ($F=14.27$, $P=0.00001$) y 10% ($F=3.66$, $P=0.0215$), respectivamente (Tabla 1).

Extracto etanólico de propóleo PYuc

A partir de la segunda (15 días) y hasta la última evaluación (54 días), las cuatro concentraciones del extracto PYuc redujeron significativamente la TCD del fitopatógeno. En el último muestreo la TCD en el control positivo (PDA+OH) se redujo significativamente ($F=6.18$, $P=0.0021$) de 0.198 a 0.039, 0.020, 0.004 y 0.002 cm²/día, en las concentraciones de 1.25, 2.5, 5.0 y 10.0% (v/v), respectivamente.

Inhibición del crecimiento micelial

Extracto etanólico de propóleo PTeco1

En el día 5, la concentración de 1.25% inhibió el crecimiento micelial de *M. fijiensis* significativamente ($F=32.22$, $P=0.00001$) en menor proporción (27.6%) que las otras concentraciones evaluadas (44.2-44.8%). Por otra parte, al 10% significativamente inhibió en mayor medida el crecimiento micelial del patógeno a los 15 (45.1%, $F=10.35$, $P=0.0001$), 22 (49.9%, $F=9.23$, $P=0.0002$), 34 (59.2%, $F=11.48$, $P=0.0001$) y 54 (57.8%, $F=6.23$, $P=0.0020$) días (Tabla 2, Figura 1). Sin embargo, en esas mismas evaluaciones, las concentraciones de 1.25 y 2.5% (v/v) no fueron capaces de inhibir el crecimiento del hongo. Asimismo, se encontró que el etanol a 96 °GL, empleado para los extractos etanólicos, también inhibió (24.3 - 41.8%) la cepa estudiada de *M. fijiensis*.

La regresión lineal entre la inhibición del crecimiento micelial y las concentraciones del PTeco1 mostró un coeficiente de determinación (r^2) alto con un valor de $r^2=0.9468$, sugiriendo que existe una fuerte relación entre la concentración de propóleo



Tabla 1. Tasa de crecimiento diaria ($\text{cm}^2/\text{día}$) *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* en medio de cultivo APD con concentraciones de extractos etanólicos de propóleo

Propóleo	Concentración (%)	Días de crecimiento				
		5	15	22	34	54
PTeco1	PDA+OH	0.014 ± 0.002 b	0.050 ± 0.025 b	0.033 ± 0.019 b	0.104 ± 0.037 b	0.198 ± 0.069 ab
	1.25	0.060 ± 0.009 a	0.179 ± 0.014 a	0.083 ± 0.130 a	0.192 ± 0.027 a	0.304 ± 0.039 a
	2.50	0.015 ± 0.002 b	0.142 ± 0.033 a	0.083 ± 0.014 a	0.147 ± 0.039 ab	0.210 ± 0.066 ab
	5.00	0.013 ± 0.003 b	0.048 ± 0.022 b	0.038 ± 0.018 b	0.084 ± 0.022 bc	0.098 ± 0.025 bc
	10.00	0.007 ± 0.002 b	0.003 ± 0.002 b	0.003 ± 0.003 b	0.009 ± 0.009 c	0.044 ± 0.042 c
	CV (%)	18.81	43.21	42.56	39.89	40.10
	P	0.00001	0.0001	0.0035	0.0035	0.0153
	F	22.51	11.22	5.56	5.58	4.00
PTeco2	Concentración (%)	Días de crecimiento				
		5	15	22	34	54
	PDA+OH	0.014 ± 0.002 b	0.050 ± 0.025 b	0.033 ± 0.019 b	0.104 ± 0.037 b	0.198 ± 0.069 a
	1.25	0.052 ± 0.008 a	0.143 ± 0.022 a	0.098 ± 0.022 a	0.199 ± 0.029 a	0.196 ± 0.067 a
	2.50	0.013 ± 0.001 b	0.008 ± 0.001 bc	0.000 ± 0.000 b	0.042 ± 0.014 bc	0.126 ± 0.044 ab
	5.00	0.004 ± 0.002 b	0.001 ± 0.000 c	0.000 ± 0.000 b	0.001 ± 0.000 c	0.025 ± 0.024 b
	10.00	0.005 ± 0.001 b	0.002 ± 0.001 c	0.000 ± 0.000 b	0.000 ± 0.000 c	0.001 ± 0.000 b
	CV (%)	18.73	30.63	75.82	40.83	43.65
P	0.00001	0.00001	0.0001	0.00001	0.0215	
F	25.19	16.76	10.96	14.27	3.66	
PYuc	Concentración (%)	Días de crecimiento				
		5	15	22	34	54
	PDA+OH	0.014 ± 0.002 a	0.050 ± 0.025 a	0.033 ± 0.019 a	0.104 ± 0.037 a	0.198 ± 0.069 a
	1.25	0.010 ± 0.001 ab	0.004 ± 0.000 b	0.000 ± 0.000 b	0.014 ± 0.003 b	0.039 ± 0.022 b
	2.50	0.009 ± 0.002 b	0.003 ± 0.001 b	0.000 ± 0.000 b	0.002 ± 0.001 b	0.020 ± 0.016 b
	5.00	0.008 ± 0.002 b	0.003 ± 0.000 b	0.000 ± 0.000 b	0.000 ± 0.000 b	0.004 ± 0.003 b
	10.00	0.009 ± 0.001 b	0.003 ± 0.000 b	0.000 ± 0.000 b	0.000 ± 0.000 b	0.002 ± 0.000 b
	CV (%)	14.60	22.51	50.56	38.76	53.62
P	0.0945	0.0255	0.0414	0.0009	0.0021	
F	2.30	3.50	3.04	7.20	6.18	

Medias con literales diferentes entre columnas son significativamente diferentes entre sí ($n=5$, DMS, $P=0.05$), CV= coeficiente de variación. Las cajas de Petri se incubaron a 25 ± 2 °C, $75 \pm 5\%$ de humedad relativa, con 12 h luz/oscuridad.

Tabla 2. Inhibición (%) del crecimiento micelial *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* en medio de cultivo APD con concentraciones de extractos etanólicos de propóleo

Propóleos	Concentración (%)	Días de crecimiento				
		5	15	22	34	54
PTeco1	PDA+OH	41.8 ± 0.5 a	21.1 ± 8.9 b	25.4 ± 10.5 b	25.6 ± 11.2 b	24.3 ± 11.3 b
	1.25	27.6 ± 2.1 b	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 b
	2.50	41.4 ± 0.7 a	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 b
	5.00	41.8 ± 1.0 a	18.5 ± 9.2 b	20.6 ± 10.8 b	22.7 ± 10.6 b	24.9 ± 10.8 b
	10.00	44.2 ± 0.7 a	45.1 ± 1.7 a	49.9 ± 2.2 a	59.2 ± 4.2 a	57.8 ± 14.4 a
	CV (%)	2.9	19.1	19.6	19.5	22.9
	P	0.00001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0020
	F	32.22	10.35	9.23	11.48	6.23
PTeco2	PDA+OH	41.8 ± 0.5 a	21.1 ± 8.9 b	25.4 ± 10.5 b	25.6 ± 11.2 c	24.3 ± 11.3 b
	1.25	27.4 ± 3.7 b	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 c
	2.50	41.9 ± 0.4 a	39.7 ± 0.5 a	47.4 ± 0.6 a	46.6 ± 4.8 b	34.0 ± 10.6 b
	5.00	44.9 ± 0.5 a	46.7 ± 0.6 a	53.0 ± 0.4 a	63.7 ± 0.2 a	66.8 ± 6.2 a
	10.00	44.7 ± 0.2 a	46.2 ± 0.4 a	53.4 ± 0.1 a	64.2 ± 0.0 a	72.9 ± 0.0 a
	CV (%)	3.5	9.2	8.7	10.9	17.4
	P	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
	F	17.47	25.04	23.75	24.96	16.42
PYuc	PDA+OH	41.8 ± 0.5 a	21.1 ± 8.9 b	25.4 ± 10.5 b	25.6 ± 11.2 b	24.3 ± 11.3 b
	1.25	2.1 ± 2.1 b	43.3 ± 0.4 a	50.0 ± 0.4 a	57.0 ± 0.7 a	59.1 ± 5.5 a
	2.50	5.7 ± 2.8 b	44.0 ± 0.6 a	51.0 ± 0.3 a	61.8 ± 0.3 a	66.4 ± 4.1 a
	5.00	7.5 ± 2.6 b	44.4 ± 0.4 a	52.9 ± 0.4 a	63.8 ± 0.2 a	71.6 ± 1.0 a
	10.00	3.6 ± 2.3 b	43.9 ± 0.3 a	52.7 ± 0.3 a	64.0 ± 0.3 a	72.7 ± 0.2 a
	CV (%)	49.8	9.3	8.9	9.3	12.7
	P	0.00001	0.0017	0.0021	0.0001	0.0001
	F	54.46	6.45	6.18	10.52	11.28

Medias con literales diferentes entre columnas son significativamente diferentes entre sí (n=5, DMS, P=0.05), CV=coeficiente de variación. Las cajas de Petri se incubaron a 25±2 °C, 75±5% de humedad relativa, con 12 h luz/oscuridad.

y la inhibición del patógeno. El modelo lineal resultó significativo ($P=0.0001$, $Y=11.04X-18.27$), el cual describe un 94.68% el pronóstico de la inhibición del *M. fijiensis*, si conocemos la concentración de propóleo (Figura 2A).

Extracto etanólico de propóleo PTeco2

Existió menor inhibición con la concentración al 1.25% al quinto día (27.4%) de evaluación, sin embargo, en los siguientes

muestreos no se observó efecto inhibitorio para esa misma concentración. Por otra parte, las concentraciones 2.5, 5 y 10% inhibieron el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis* a los 15, 22, 34 y 54 días. Las inhibiciones más altas se observaron en el penúltimo (34 días, $F=24.96$, $P=0.00001$) y último muestreo (54 días, $F=16.42$, $P=0.00001$) (Tabla 2, Figura 1) en las concentraciones de 5 y 10% v/v, con inhibiciones de 63.7 (34 días) - 64.2 (54 días) y 66.8 (34 días) - 72.9% (54 días), respectivamente.

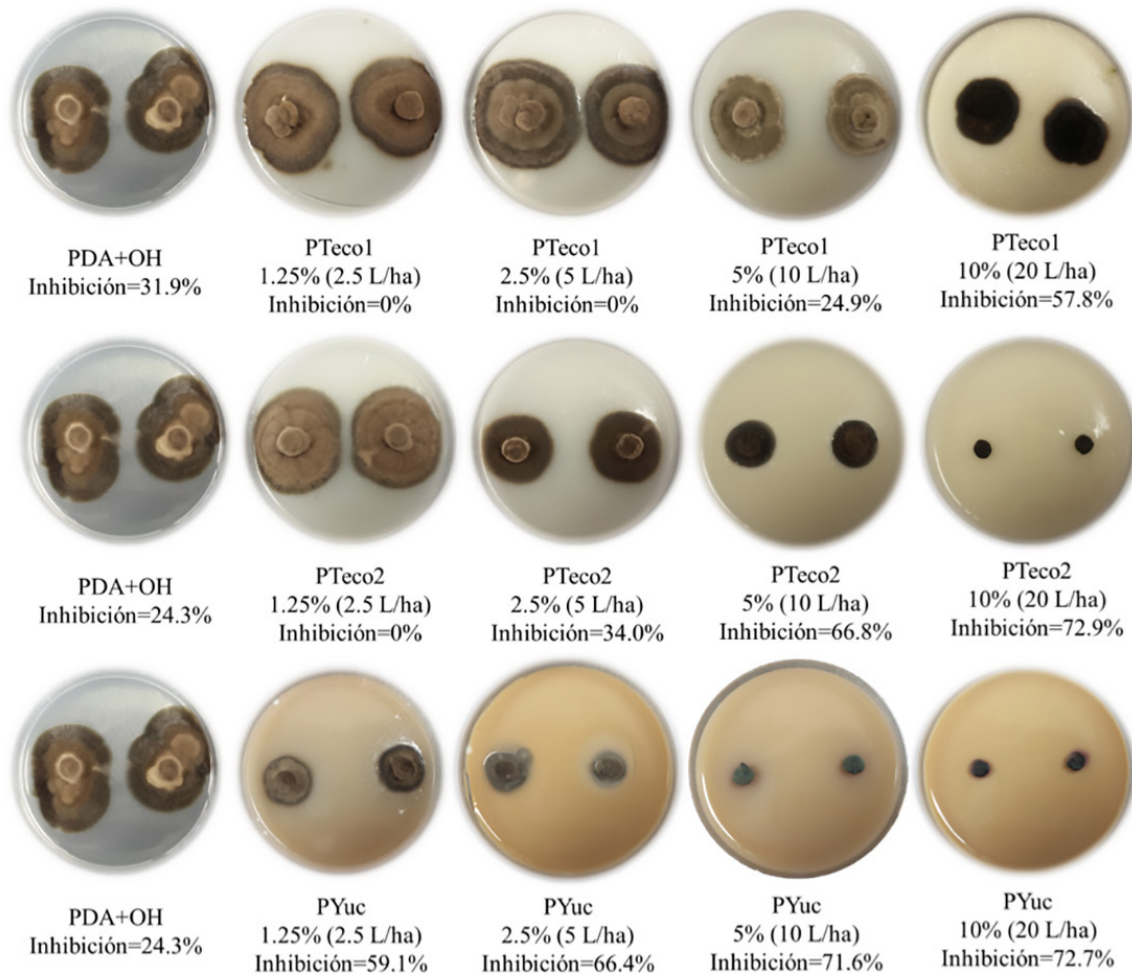


Figura 1. Crecimiento de las colonias de *Mycosphaerella fijiensis* en medio de cultivo APD con cuatro concentraciones (1.25, 2.5, 5.0 y 10.0%) de tres extractos de propóleos (PTeco1, PTeco2 y PYuc).

En análisis de regresión lineal para el extracto PTeco2 mostró un modelo significativo ($P=0.00001$, $Y=9.073X+12.69$) y una $r^2=0.6220$, sugiriendo que no existe una fuerte relación lineal entre el incremento de la concentración de propóleo y el incremento en la inhibición del *M. fijiensis*. Tanto los porcentajes de inhibición (Tabla 2) y la regresión lineal (Figura 2B) sugieren que se obtiene el mismo porcentaje de inhibición al emplear las concentraciones de 5.0 y 10% v/v del extracto PTeco2.

Extracto etanólico de propóleo Pyuc

Todas las concentraciones inhibieron significativamente el crecimiento micelial *in vitro* de *M. fijiensis*, en comparación con el control positivo (APD+OH), a los 15 ($F=6.45$, $P=0.00001$), 22 ($F=6.18$, $P=0.0021$), 34 ($F=10.52$, $P=0.0001$) y 54 ($F=11.28$,

$P=0.0001$) días de evaluación. Las cuatro concentraciones estudiadas inhibieron más de 50% al día 22 de evaluación, finalizando con valores mayores al 70% en las dos concentraciones mayores y una mínima diferencia de 9% con las dos concentraciones menores. En contraste, en la primera evaluación (5 días) no se observó inhibición en el crecimiento micelial del patógeno (Tabla 2, Figura 1).

En cuanto al análisis de regresión, se encontró una baja relación entre la concentración de propóleo y la inhibición del fitopatógeno ($r^2=0.2373$). El modelo lineal resultó significativo ($P=0.0294$, $Y=1.173X+80.79$). Tanto la Tabla 2 como la Figura 2C, sugieren que las cuatro concentraciones de propóleo estudiadas, permiten estadísticamente el mismo porcentaje inhibición.

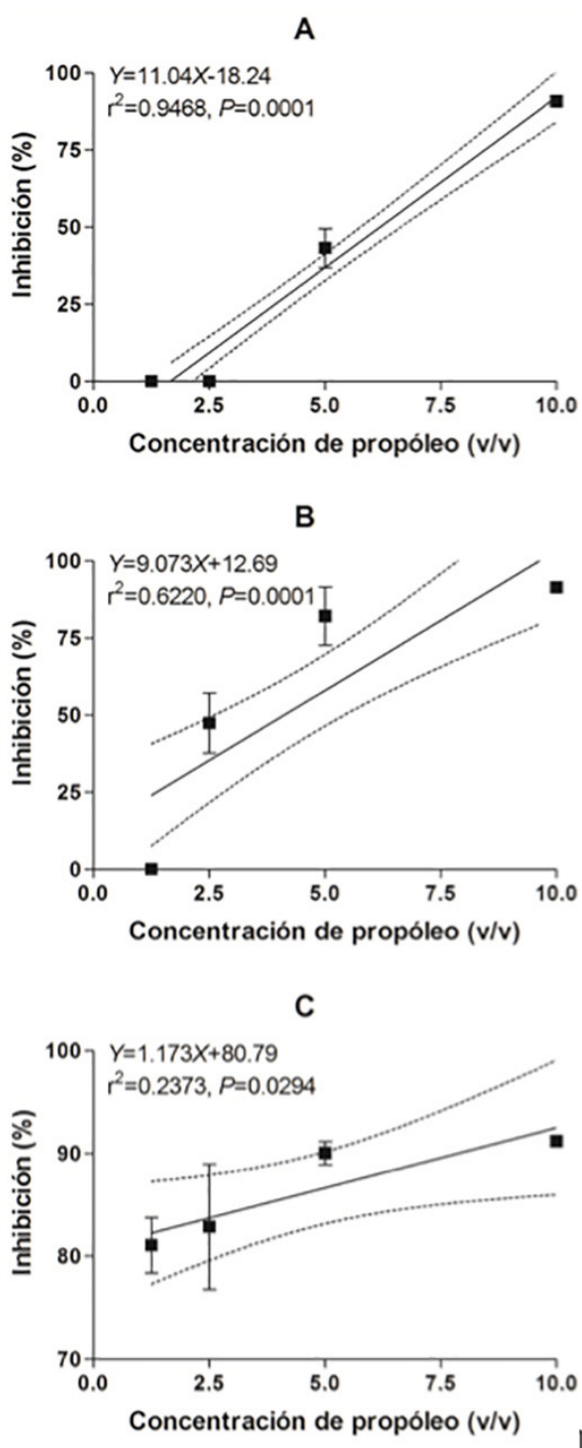


Figura 2. Regresión lineal entre la inhibición (%) del crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* y las concentraciones de extractos etanólicos de propóleo: A) PTeco1, B) PTeco2 y C) PYuc.

Concentración efectiva media (CE₅₀)

La CE₅₀ para PTeco1, PTeco2 y PYuc fue de 0.86, 3.34 y 0.24%, respectivamente (Tabla 3). De acuerdo al traslape de los intervalos de confianza, la menor CE₅₀ (0.24%) correspondió al EEP PYuc. Por el contrario, la mayor CE₅₀ (3.34%) correspondió al EEP PTeco2. La CE₅₀ representa la dosis de propóleo que se requiere para inhibir el 50% del crecimiento del patógeno bajo las condiciones de estudio. Tomando este valor como parámetro para establecer una dosis en campo, se requiere 0.480 L/ha del EEP PYuc para un efecto significativo (visual). Por el contrario, para el EEP PTeco2 se requiere una dosis de 6.68 L/ha para ver un efecto significativo ($\text{Chi-X}^2=788.23, P<0.0001$) en la reducción del patógeno.

La CE₉₀ para PTeco1, PTeco2 y PYuc fue de 1.13, 7.24 y 0.81% respectivamente (Tabla 3). Conforme al traslape de los intervalos de confianza, la menor CE₉₀ (0.81%) correspondió al EEP PYuc, mientras que la mayor (7.24%) correspondió al EEP PTeco2. La CE₉₀ corresponde a la dosis de propóleo requerida para inhibir el 90% del crecimiento del patógeno bajo las condiciones de estudio. Al tomar este valor como parámetro en campo para establecer una dosis, se requiere 1.62 L/ha del EEP PYuc para obtener un efecto significativo comparado con 14.48 L/ha del EEP PTeco2 para observar el mismo efecto.

Contenido de fenoles totales

La concentración de fenoles más alta se encontró en el EEP PYuc con 140.47 μg EAG/mL, el cual fue estadísticamente mayor a los propóleos locales PTeco1 y PTeco2 con 100.94 y 105.82 μg EAG/mL, respectivamente (Figura 3).

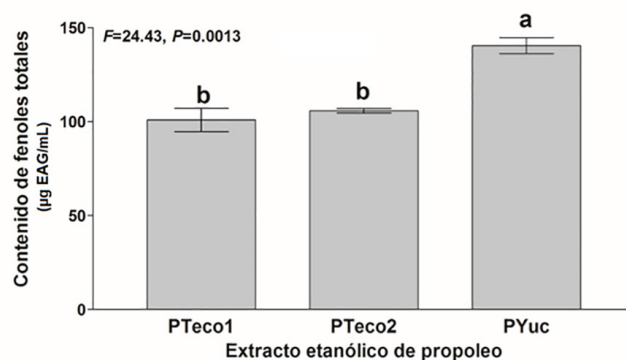


Figura 3. Contenido de fenoles totales en los extractos etanólicos de propóleo a las 168 h de su preparación.

Tabla 3. Concentración efectiva media (CE_{50}) y noventa (CE_{90}) de tres extractos etanólicos de propóleo sobre *Mycosphaerella fijiensis*

EEP	CE_{50} (%)	IC (%)	Pendiente	Ecuación Probit	Chi-X ²	P>Chi-X ²
PTeco1	0.86 b	0.842 - 0.88	4.75	y=4.75x - 4.08	463.79	< 0.0001
PTeco2	3.34 c	3.20 - 3.49	3.82	y=3.82x - 2.00	788.23	< 0.0001
PYuc	0.24 a	0.11 - 0.40	0.89	y=0.89x + 0.55	73.13	< 0.0001
EEP	CE_{90} (%)	IC (%)	Pendiente	Ecuación Probit	Chi-X ²	P>Chi-X ²
PTeco1	1.13 b	1.10 - 1.175	4.75	y=4.75x - 4.08	463.79	< 0.0001
PTeco2	7.24 c	6.81 - 7.77	3.82	y=3.82x - 2.00	788.23	< 0.0001
PYuc	0.81 a	0.72 - 0.94	0.89	y=0.89x + 0.55	73.13	< 0.0001

IC= Intervalo de confianza. Literales diferentes son estadísticamente diferentes entre sí, de acuerdo al traslape de los intervalos de confianza ($P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

Mycosphaerella fijiensis posee un lento crecimiento *in vitro*, de acuerdo con Manzo-Sánchez *et al.* (2001) el diámetro promedio de las colonias de 14 días de edad es de 6.3 mm. Esta medida no se puede comparar con el presente estudio, debido a que el crecimiento de los micelios de *M. fijiensis* fueron calculados en área (cm²), el cual posee valores más bajos; sin embargo, son de mayor precisión, ya que los micelios del fitopatógeno no crecen de manera circular.

El presente estudio representa el primer reporte sobre la habilidad de extractos etanólicos de propóleo para inhibir el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis*. Estudios previos de sensibilidad *in vitro* sobre *M. fijiensis*, únicamente se han enfocado en la evaluación de fungicidas químicos (Pelaéz-Montoya *et al.*, 2006), botánicos (Abiala *et al.*, 2011; Kumakech *et al.*, 2017) y biológicos (Sagratzki-Cavero *et al.*, 2015).

Sin embargo, en la presente década se ha prestado bastante interés en la exploración del propóleo como antimicrobiano, principalmente se ha estudiado su actividad antibacteriana y fungicida (Hashemi, 2016).

Para micopatógenos agrícolas, algunos estudios *in vitro* e *in vivo* han sido realizados. Los extractos etanólicos de propóleo han sido efectivos para reducir el crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* (Pineda *et al.*, 2010), *D. bryoniae*, *R. solani* (Gallez *et al.*, 2014), *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. cepa 21, *Fusarium* sp. cepa 22, *Macrophomina* sp., *Penicillium notatum*, *Phomitopsis* sp. (Quiroga *et al.*, 2006), *Aspergillus versicolor*, *Penicillium aurantiogriseum* (Temiz *et al.*, 2013), *Penicillium digitatum* (Matny, 2015), entre otros.

Sin embargo, no existen estudios similares *in vitro* con *M. fijiensis* para contrastar los resultados obtenidos. Es destacable que los propóleos PTeco2 y PYuc ocasionaron inhibiciones en el crecimiento micelial por arriba del 50% a la concentración de 5% v/v. En otros hongos fitopatógenos como *C. gloeosporioides* se requiere un extracto de propóleo más concentrado (15-30 v/v) para ocasionar una inhibición *in vitro* entre 27 y 30% (Pineda *et al.*, 2010). Esta situación parece ser similar en *A. solani*, ya que se requiere un extracto de propóleo al 17% (p/v) para ocasionarle una inhibición micelial *in vitro* de 25% (Cortés-Rubira, 2008). Por el contrario, *D. bryoniae* es más sensible al extracto etanólico de propóleo, de acuerdo con Gallez *et al.* (2014) el fitopatógeno inhibe su crecimiento micelial *in vitro* entre 69 y 77%, al crecer en PDA con propóleo a una concentración de 10% v/v.

Particularmente, en este estudio se observó que los extractos de PTeco1 y PTeco2 a la concentración de 1.25% (v/v) estimularon una mayor TCD respecto al control positivo (APD+OH), en ciertos periodos de evaluación. Este comportamiento fúngico depende de la especie en estudio, los organismos fúngicos poseen una versatilidad fisiológica y bioquímica ante la presencia de un estresor, que en este caso fueron los extractos etanólicos de propóleo. Un mecanismo fisiológico para contrarrestar a los estresores es el aumento en la velocidad de crecimiento (Álvarez *et al.*, 1990; Chan-Cupul *et al.*, 2014), otro mecanismo reportado es el incremento de su actividad bioquímica traducida en la producción de enzimas líticas y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como mecanismo de defensa contra el estresor (Maciel *et al.*, 2013). Por ello, es importante

que en estudios de efectividad de moléculas químicas y/o biológicas sobre fitopatógenos sea abordado a través de un bioensayo dosis-respuesta, calculando la CE_{50} . Parámetro idóneo para definir las concentraciones de las moléculas (o extractos) a emplear en estudios *in vivo* o *in situ* (Molina-Vargas y Melo-Martinez, 2010).

Por otra parte, son limitados los estudios *in vivo* e *in situ* (campo o invernadero) para el control de fitopatologías causadas por hongos a través de extractos etanólicos de propóleo, en este tenor, Guginski-Piva *et al.* (2014) reportaron la habilidad de un extracto etanólico de propóleo nativo de Brasil para la reducción del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de Mildiu (*Podosphaera fuliginea*) en pepino (*Cucumis sativus*). Los autores evaluaron cinco concentraciones (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0% v/v) del extracto etanólico de propóleo. Los resultados indicaron que la aplicación del extracto de propóleo al 8% (v/v) redujo el ABCPE entre 31.33 y 43.68%.

Actualmente, en México no existe información sobre la CE_{50} de extractos etanólicos de propóleo sobre patógenos fúngicos, por lo que este trabajo es de suma relevancia. Sin embargo, en este estudio se observó que la CE_{50} fue completamente diferente entre los tres extractos etanólicos de propóleo, con alta diferencia significativa entre ellos ($P < 0.0001$). Por lo tanto, se acepta la hipótesis de investigación planteada. El extracto PYuc obtuvo la menor CE_{50} (0.24%) seguido de PTeco1 (0.86%) y PTeco2 (3.34%), esto significa que si extrapolamos la información a un tratamiento por hectárea necesitaríamos 0.48, 1.72 y 6.68 L del extracto etanólico de propóleo, respectivamente, para tener una inhibición aproximada de 50% en *M. fijiensis*. Este estudio sugiere futuros trabajos *in vivo* e *in situ* (campo o invernadero) para evaluar la efectividad de estas dosis de propóleo por hectárea.

En cuanto al contenido de fenoles totales, el extracto PYuc fue superior a los de Tecmán, Colima; sin embargo, no se determinó el perfil de compuestos fenólicos presentes en la muestra, estudios que podría abordarse en un futuro. Sin embargo, Ramanauskiene *et al.* (2013) reportaron un contenido de fenoles totales de 167.5, 175.6 y 115.4 mg equivalentes de ácido Felúrico (mg AFE)/g de propóleo a concentraciones de 2.5, 5.0 y 10% (p/v), respectivamente. Estos valores son altos en comparación a los del presente estudio (PYuc=140.47,

PTeco1=100.94, PTeco2=105.82 μ g EAG/mL), si comparamos la cantidad de propóleo (50% p/v) empleada para realizar los extractos etanólicos. El propóleo es un material heterogéneo y es dependiente de la composición vegetal de donde proviene (Shuai *et al.*, 2014), razón por la cual denota una heterogeneidad en el contenido de fenoles totales.

Por tal motivo sería importante conocer la naturaleza química de los extractos, al respecto Burdock (1998) menciona que la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos en el propóleo son constituyentes importantes y responsables de la bioactividad contra numerosos microorganismos patógenos. Asimismo, la naturaleza química de los extractos de propóleo varía de una ubicación a otra, debido a la composición florística de las especies botánicas existentes en cada región. Al respecto, Eguaras *et al.* (1999) reportaron diversos tipos de fenoles, principalmente ácidos fenólicos (benzoico, cafeico, ferúlico y cinámico) y flavonoides. Recientemente, empleando técnicas cromatográficas analíticas y de preparación, se han descrito al menos 241 compuestos químicos en el propóleo (Shuai *et al.*, 2014).

Asimismo, es importante evaluar la diversidad vegetativa donde se ubican los distintos apiarios en el estado de Colima y determinar si algún propóleo crudo presenta mayor calidad (Gallez *et al.* 2014), ya que ésta depende de la composición de las especies vegetativas, estudio que se puede abordar en el futuro y que puede incidir sobre la efectividad de los extractos contra patógenos fúngicos agrícolas.

En conclusión, únicamente el propóleo PTeco1 mostró una relación positiva entre la concentración y el porcentaje de inhibición en el crecimiento de *M. fijiensis*, es decir a mayor concentración del EEP, mayor inhibición en el crecimiento micelial del fitopatógeno. Mientras que los extractos PTeco2 y PYuc, no mostraron este comportamiento. El extracto PYuc redujo la TCD *in vitro* de *M. fijiensis* en todas las concentraciones evaluadas, registró el mayor contenido de fenoles totales y presentó los valores menores de CE_{50} y CE_{90} .

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la empresa Tropical Organic Growers (<http://www.togrowers.com/>) por permitir el acceso a sus huertas orgánicas para la obtención de tejidos foliares de banano.



LITERATURA CITADA

- Abiala, M.A., A.A. Ogunjobi, A.C. Odebode, M.A. Ayodele, 2011. Evaluation of plant extracts as an antagonist to mycelial growth of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Archives of Phytopathology and Plant Protection 44: 1711-1718.
- Aguilar-Barragán, A., A.E. García-Torres, O. Odriozola-Casas, G. Macedo-Raygoza, T. Ogura, G. Manzo-Sánchez, C.J. Andrew, I. Islas-Flores, M.J. Beltrán-García, 2014. Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in Mexico. Brazilian Journal of Microbiology 45: 359-364.
- Álvarez, D.P., A.G. Luque, M.E. Gamberale, 1990. Resistencia de cepas de *Microsporium fulvum* a herbicidas preemergentes. Ciencia del Suelo 8: 25-29.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and Chemical Toxicology 36: 347-363.
- Cerqueira-Sales, M.D., H. Barcellos-Costa, P.M. Bueno-Fernandes, J. Aires-Ventura, D. Dummer-Meira, 2016. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 6: 26-31.
- Chan-Cupul, W., G. Heredia-Abarca, R. Rodríguez-Vázquez, R.M. Arias-Mota, 2014. Toxicidad *in vitro* de los herbicidas atrazina y paraquat sobre el crecimiento vegetativo y la esporulación de hongos saprobios del suelo. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 30: 393-406.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal), 2013a. Inventario estatal forestal y de suelos - Colima. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) 3: 88-106.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal), 2013b. Inventario estatal forestal y de suelos - Yucatán. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) 7: 94-107.
- Conde-Ferráez, L., R. Grijalva-Arango, N.E. Raigoza-Flores, A.C. James-Kay, 2008. A simple method to obtain single conidium isolates directly from banana (*Musa* sp.) leaves infected with *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Revista Mexicana de Fitopatología 26: 76-78.
- Cortés-Rubira, J., 2008. Evaluación del efecto de extractos etanólicos de própolis sobre el control de *Alternaria solani* en cultivo ecológico de tomate (*Solanum lycopersicum*). Tesis de Ingeniería. Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, Barcelona, España.
- Cortez-Madrugal, H., R. Alatorre-Rosas, G. Mora-Aguilera, H. Bravo-Mojica, C.F. Ortiz-García, L.A. Aceves-Navarro, 2003. Characteristic of multisporic and monosporic isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. Biocontrol 48: 321-334.
- Eguaras, M., M. Del Hoyo, M.A. Palacio, S. Ruffinengo, E.L. Bedascarrasbure, 1999. A new product with formic acid for *Varroa jacobsoni* Oud. control in Argentina I. Efficacy. Journal of Veterinary Medicine 48: 11-14.
- Eyng, C., A.E. Murakami, I.C. Ospina-Rojas, R.B. Pedroso, T.G.V. Silveira, D.A.L. Laurencio, 2015. Efecto de la inclusión dietética del extracto etanólico de propóleos en la inmunidad de pollos de engorde. Archivos de Medicina Veterinaria 47: 185-192.
- Gallez, L., M. Kiehr, L. Fernández, R. Delhey, D. Stikar, 2014. Antifungal activity *in vitro* of propolis solutions from Argentina against two plant pathogenic fungi: *Didymella bryoniae* and *Rhizoctonia solani*. Journal of Apicultural Research 53: 438-440.
- Guginski-Piva, C.A., I. Dos Santos, A. Wagner-Júnior, D. Winter-Heck, M. Faber-Flores, K. Pazolini, 2015. Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber. Idesia (Arica) 33: 39-47.
- Hashemi, J.H., 2016. Biological effect of bee propolis: a review. European Journal of Applied Sciences 8: 311-318.
- Hidalgo, M., A. Tapia, W. Rodríguez, E. Serrano, 2006. Efecto de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA cv. Valery). Agronomía Costarricense 30: 35-41.
- Kumakech, A., H.J.L. Jorgensen, D.B. Collinge, R. Edema, P. Okron, 2017. *Azadirachta indica* reduces Black Sigatoka in East African highland banana by direct antimicrobial effects against *Mycosphaerella fijiensis* without inducing resistance. Journal of Agricultural Science 9: 61-76.
- Maciel, G., F. Dorneles, A. Sá-Nakanichi, C. Haminiuk, R. Castoli, J. Comar, A. Bracht, M. Peralta, 2013. Response of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. to the herbicide picloram: Tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. Pesticide Biochemistry and Physiology 105: 84-92.
- Manzo-Sánchez, G., M. Orozco-Santos, S. Guzmán-González, 2001. Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 66-71.
- Martínez-Bolaños, L., D. Téliz-Ortiz, J.C. Rodríguez-Maciel, J.A. Mora-Aguilera, D. Nieto-Ángel, J.I. Cortés-Flores, D. Mejía-Sánchez, C. Nava-Díaz, G. Silva-Aguayp, 2012. Resistencia a fungicidas en poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* del sureste mexicano. Agrociencia 46: 707-717.
- Matny O.N., 2015. Efficacy evaluation of Iraqi propolis against gray mold of storages orange caused by *Penicillium digitatum*. Plant Pathology Journal 14: 153-157.
- Molina-Vargas, L.F., S.E. Melo-Martínez, 2010. Importancia del método estadístico para el cálculo de la CE₅₀ y CE₉₅ de algunos isotiocianatos evaluados contra *Rhizoctonia solani* Kühn. Agronomía Colombiana 28: 235-244.
- Özcan, M., A. Ünver, D.A. Ceylan, R. Yetisir, 2004. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. Nahrung/Food 48: 188-194.
- Paschos, T., C. Xiros, P. Christakopoulos, 2015. Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. BMC Biotechnology 15: 1-12.
- Peláez-Montoya, J.E., L.E. Vázquez-David, T.J. Díaz-Brito, D.A. Castañeda-Sánchez, E. Rodríguez-Beltrán, R.E. Arando-Isaza, 2006. Use of a micro tittle plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet. Revista Facultad Nacional de Agranomía Medellín 59: 3425-3433.
- Pineda, J., J. Principal, C. Barrios, D. Milla, Y. Solano, E. Gil, 2010. Propiedad fungistática *in vitro* de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Zootecnia Tropical 28: 83-91.
- Poprawski, T.J., I. Majchrowicz, 1995. Effect of herbicides on *in vitro* vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. Crop Protection 14: 81-87.
- Quiroga, E.N., D.A. Sampeiro, J.R. Soberón, M.A. Sgariglia, M.A. Vattuone, 2006. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. Journal of Applied Microbiology 101: 103-110.
- Ramanauskienė, K., A.M. Inkėnienė, V. Petrikaitė, V. Briedis, 2013. Total phenolic content and antimicrobial activity of different Lithuanian propolis solutions. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 842985. Doi: 10.1155/2013/842985.
- Rasband, W.S., 2011. Image J, U.S. National Institutes of Health Bethesda, Maryland, EUA. [en línea]. <http://imagej.nih.gov/ij/05/11/2011>.

- Rodríguez-Gaviria, P.A., G. Cayón, 2008. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana* 26: 256-265.
- Sagratzki-Cavero, P.A., R.E. Hanada, L. Gasparotto, R.A. Coelho-Neto, J.T. Sousa, 2015. Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. *Ciencia Rural*, Santa María 45: 951-957.
- Sánchez-Rangel, J.C., J. Benavides, J.B. Heredia, L. Cisneros-Zevallos, D.A. Jacobo-Velázquez, 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods* 5: 5990-5999.
- SAS Institute, 2000. The SAS system for windows 8e. Cary, N.C., EUA.
- Shuai, H., Z. Cui-Ping, W. Kai, G.Q. Li, H. Fu-Liang, 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19: 19610-19632.
- Temiz, A., A. Sener-Mumcu, A. Ozkok-Tuyulu, K. Sorkun, B. Salih, 2013. Antifungal activity of propolis samples collected from different geographical regions of Turkey against two food-related molds, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium aurantiogriseum*. *The Journal of Food* 38: 135-142.
- Vargas-Toledo, M., J.R. Stangarlin, C.M. Bonato, T.M. Mioranza, M.A. Müller, B.B. Rissato, E. Lorenzetti, S. Coltro-Roncato, C.R. Kosmann, L. Assi, 2016. Fungitoxicity activity of homeopathic medicines on *Alternaria solani*. *African Journal of Agricultural Research* 11: 3824-3838.
- Zamora-Natera, F., P. García-López, M. Ruiz-López, E. Salcedo-Pérez, 2008. Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia* 42: 185-192.