

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ  
DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE DOS  
ACEITES ESENCIALES CONTRA *Phytophthora infestans*  
EN CHACHAPOYAS, AMAZONAS, 2018**

**Autor: Bach.** Kleyber Alyn Bacalla Chavez

**Asesor: Dr.** Pedro Javier Mansilla Córdova

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ  
DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE DOS  
ACEITES ESENCIALES CONTRA *Phytophthora infestans*  
EN CHACHAPOYAS, AMAZONAS, 2018**

**Autor: Bach. Kleyber Alyn Bacalla Chavez**

**Asesor: Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2019**

## **DEDICATORIA**

A Dios que me ha brindado la sabiduría, paciencia y fuerza de voluntad a lo largo de mi vida para lograr todas mis metas.

A mi alma mater “Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza” y en especial a la “Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias”, a la escuela profesional de “Ingeniería Agrónoma” que me recibió y me formó profesionalmente.

Con mucho amor a mis queridos padres: Edgar Bacalla Oclocho y Blanca Estela Chavez Chavez, porque este trabajo es el resultado del gran esfuerzo y amor que me han entregado.

A mi hermana: Evelyn Bacalla Chavez por su gran apoyo.

A mi tía Mercedes Chavez Chavez por sus consejos permanente para siempre seguir a delante.

A todas aquellas personas que se sienten orgullosos de mis triunfos.

**Kleyber Alyn Bacalla Chavez**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza y en particular a la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma, de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, por los conocimientos técnicos recibidos y la formación profesional.

Al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES).

Al laboratorio de investigación en sanidad vegetal (LABISANV) en especial al doctor Pedro Javier Mansilla Córdova por brindarme siempre su apoyo y comprensión mediante el asesoramiento de este trabajo de investigación.

Al ingeniero Segundo Manuel Oliva Cruz quien como director del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES- CES) accedió a brindarme la disponibilidad de las instalaciones del laboratorio de investigación en sanidad vegetal (LABISANV) para poder ejecutar mi proyecto de tesis.

A todo el personal del laboratorio de investigación en sanidad vegetal (LABISANV).

Al decano facultad de ingeniería y ciencias agrarias Ing. Mg. Sc. Erick Aldo Auquiñivín Silva por facilitarme el laboratorio de ingeniería para el destilado de los aceites esenciales.

Al Biol. Jesús Rascón por brindar mediante el Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova las páginas web para la identificación de las especies vegetales.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ  
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

**RECTOR**

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

**VICERRECTOR ACADÉMICO**

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

**VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

Ing. Mg. Sc. ERICK ALDO AUQUIÑIVÍN SILVA

**DECANO DE LA FACULTAD**

**DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

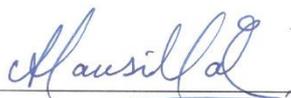
## VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS

El docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Dr. MANSILLA CÓRDOVA, Pedro Javier, profesor contratado de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma que suscribe, hace constar que ha asesorado la tesis titulada:

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE DOS ACEITES ESENCIALES CONTRA *Phytophthora infestans* EN CHACHAPOYAS, AMAZONAS, 2018** del tesista Bach. BACALLA CHAVEZ, Kleyber Alyn egresado de la carrera profesional de Ingeniería Agrónoma de la UNTRM.

El docente de la UNTRM que suscribe da su visto bueno para que la tesis mencionada sea presentada al jurado evaluador, manifestando su voluntad de apoyar al tesista en el levantamiento de observaciones y en el acto de sustentación de tesis.

Chachapoyas, abril del 2019.



---

Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova.

**Asesor**

## JURADO EVALUADOR DE TESIS



---

PhD. LIGIA MAGALI GARCÍA ROSERO

**PRESIDENTE**



---

Ing. Mg. Sc. WALTER DANIEL SANCHEZ AGUILAR

**SECRETARIO**



---

Ing. Mg. Sc. SEGUNDO MANUEL OLIVA CRUZ

**VOCAL**



**ANEXO 3-K**

**DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO DE TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL**

Yo Kleyber Alyn Bacalla Chavez  
identificado con DNI N° 72805599 Estudiante( )/Egresado (X) de la Escuela Profesional de  
Ingeniería Agrónoma de la Facultad de:  
Ingeniería y Ciencias Agrarias  
de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

**DECLARO BAJO JURAMENTO QUE:**

1. Soy autor de la Tesis titulada: " Actividad Antimicrobiana in Vitro de  
Dos Aceites Esenciales Contra Phytophthora Infestans en  
Chachapoyas, Amazonas, 2018 "



que presento para  
obtener el Título Profesional de: Ingeniero Agrónomo

2. La Tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, y para su realización se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La Tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
4. La Tesis presentada no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
5. La información presentada es real y no ha sido falsificada, ni duplicada, ni copiada.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la Tesis para obtener el Título Profesional, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la Tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que la Tesis para obtener el Título Profesional haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas, 24 de abril de 2019

Firma del(a) tesista



**ANEXO 2-N**

**ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS**

En la ciudad de Chachapoyas, el día 11 de Abril del año 2019, siendo las 18:00 horas, el aspirante: Kleyber Alyn Bacalla Chavez defiende públicamente la Tesis titulada: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales contra Phytophthora infestans en Chachapoyas, Amazonas, 2018. para optar el Título Profesional en Ingeniería Agrónoma otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado, constituido por:  
 Presidente : Ligia Magali García Roseo  
 Secretario : Walter Daniel Sanchez Aguilar  
 Vocal : Segundo Manuel Oliva Cruz



Procedió el (los) aspirante (s) a hacer la exposición de los antecedentes, contenido de la tesis y conclusiones obtenidas de la misma, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la tesis presentada, los miembros del jurado pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones u objeciones consideran oportunas, las cuales fueron contestadas por el los aspirante (s).

Tras la intervención de los miembros del jurado y las oportunas contestaciones del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los miembros del jurado presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el jurado determinará la calificación global concedida a la tesis, en términos de:

Notable o sobresaliente ( )      Aprobado (  )      No apto ( )

Otorgada la calificación el presidente del Jurado comunica, en sesión pública, la calificación concedida. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las horas 19:10 del mismo día, el jurado concluye el acto de sustentación del Trabajo de Investigación.

[Signature]  
PRESIDENTE

[Signature]  
SECRETARIO

[Signature]  
VOCAL

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS.....	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	vi
JURADO EVALUADOR DE TESIS.....	vii
ÍNDICE.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	17
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
2.1. Lugar de ejecución.....	19
2.2. Diseño de la investigación.....	20
2.2.1. Descripción de los tratamientos.....	20
2.2.2. Tratamientos.....	21
2.2.3. Testigo.....	21
2.3. Características de la unidad experimental.....	22
2.4. Población y muestra.....	22
2.4.1. Población.....	22
2.4.2. Muestra.....	22
2.4.3. Muestreo.....	22
2.5. Análisis de datos.....	22
2.5.1. Diseño experimental.....	22

2.5.2. Esquema de análisis de varianza.....	23
2.6. Variables de estudio y su metodología de evaluación.....	24
2.6.1. Crecimiento micelial.....	24
2.6.2. Concentración mínima inhibitoria.....	24
2.6.3. Efecto fungicida.....	24
2.6.4. Efecto fungistático.....	24
2.7. Equipos, insumos y materiales de laboratorio y escritorio.....	25
2.7.1. Equipos.....	25
2.7.2. Materiales.....	25
2.7.3. Material biológico.....	26
2.7.4. Insumos.....	26
2.8. Preparación de experimentos.....	27
2.8.1. Recolección de material vegetal.....	27
2.8.2. Destilado de aceites esenciales.....	27
2.8.3. Determinación y cálculo de la densidad de los aceites esenciales.....	27
2.8.4. Aislamiento y cultivo de <i>Phytophthora infestans</i> .....	28
2.8.5. Preparación de medio de cultivo sólido V8.....	29
2.9. Aplicación de los tratamientos.....	30
2.9.1. Concentraciones de aceites esenciales y su preparación.....	30
2.9.2. Fase de contacto.....	30
2.9.3. Fase volátil.....	31
2.9.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.....	31
2.9.5. Determinación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales.....	32

III. RESULTADOS.....	33
3.1. Crecimiento micelial.....	33
3.1.1. Fase de contacto.....	33
3.1.2. Fase volátil.....	36
3.2. Formación de esporangios.....	40
3.3. Actividad fungicida/fungistática.....	40
IV. DISCUSIÓN.....	42
V. CONCLUSIONES.....	45
VI. RECOMENDACIONES.....	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXO 1: Análisis de varianza.....	49
ANEXO 2: Panel fotográfico.....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Descripción de los tratamientos</i> .....	20
<b>Tabla 2.</b> <i>Tratamientos de la investigación</i> .....	21
<b>Tabla 3.</b> <i>Características generales del experimento</i> .....	22
<b>Tabla 4.</b> <i>Cuadro ANVA</i> .....	23
<b>Tabla 5.</b> <i>Actividad fungicida/fungistática de las concentraciones de aceite esencial para la fase de contacto</i> .....	40
<b>Tabla 6.</b> <i>Actividad fungicida/fungistática de las concentraciones de aceite esencial para la fase volátil</i> .....	41
<b>Tabla 7.</b> <i>Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de la fase de contacto del aceite esencial de Lippia sp.</i> .....	49
<b>Tabla 8.</b> <i>Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de la fase de contacto del aceite esencial de Piper aduncum</i> .....	49
<b>Tabla 9.</b> <i>Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de la fase de contacto de Tween 20 + Etanol</i> .....	49
<b>Tabla 10.</b> <i>Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de la fase volátil del aceite esencial de Lippia sp.</i> .....	49
<b>Tabla 11.</b> <i>Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de la fase volátil del aceite esencial de Piper aduncum</i> .....	50
<b>Tabla 12.</b> <i>Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de la fase volátil del aceite esencial de Tween 20 + Etanol</i> .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de ubicación del Laboratorio de Investigación de Sanidad Vegetal (LABISANV), de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM)-Chachapoyas.....	19
<b>Figura 2.</b> Crecimiento micelial de <i>Phytophthora infestans</i> bajo seis concentraciones de aceite esencial de <i>Lippia</i> sp. para la fase de contacto.....	33
<b>Figura 3.</b> Crecimiento micelial de <i>Phytophthora infestans</i> bajo seis concentraciones de aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> para la fase de contacto.....	34
<b>Figura 4.</b> Crecimiento micelial de <i>Phytophthora infestans</i> bajo seis concentraciones de Tween 20 + Etanol para la fase de contacto.....	35
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de inhibición micelial de los dos aceites esenciales para la fase de contacto.....	36
<b>Figura 6.</b> Crecimiento micelial de <i>Phytophthora infestans</i> bajo seis concentraciones de aceite esencial de <i>Lippia</i> sp. para la fase volátil.....	37
<b>Figura 7.</b> Crecimiento micelial de <i>Phytophthora infestans</i> bajo seis concentraciones de aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> para la fase volátil .....	38
<b>Figura 8.</b> Crecimiento micelial de <i>Phytophthora infestans</i> bajo seis concentraciones de Tween 20 + Etanol para la fase volátil .....	39
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de inhibición micelial de los aceites esenciales para la fase volátil.....	39
<b>Figura 10.</b> Aislamiento de <i>Phytophthora infestans</i> .....	51
<b>Figura 11.</b> Destilado de aceites esenciales .....	52
<b>Figura 12.</b> Preparación de medio de cultivo sólido V8.....	53
<b>Figura 13.</b> Aplicación de aceites esenciales y repicaje de <i>Phytophthora infestans</i> .....	54
<b>Figura 14.</b> Test de medios de cultivo.....	55

## Resumen

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la acción antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Lippia* sp. y *Piper aduncum* L. sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Las pruebas de confrontación entre los aceites esenciales y *Phytophthora infestans* fueron realizadas a 20 °C en ausencia de luz y en medio sólido V8. Se realizaron dos tipos de experimentos: el efecto de contacto y el efecto volátil de cada uno de los aceites esenciales. La variable evaluada fue el crecimiento micelial y, con esta se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). Además, se evaluó la actividad fungicida (muerte) y la actividad fungistática (inhibición del crecimiento) de la CMI para cada uno de los aceites esenciales. Para el efecto de contacto fue encontrada una CMI de 4500 µg/ml y 6000 µg/ml para *Lippia* sp. y *Piper aduncum*, respectivamente. Para la fase volátil, la CMI fue de 47µg/ml de aire del aceite esencial de *Lippia* sp. y 58.7 µg/ml de aire del aceite esencial de *Piper aduncum*. En todos los casos, el efecto fue fungistático. Sin embargo, la concentración máxima de la fase volátil del aceite esencial de *Lippia* sp. presentó un efecto fungicida. Hasta donde se conoce, esta es la primera evaluación de aceites esenciales para el control de fitopatógenos en la región Amazonas, haciéndose necesario evaluar otros aceites esenciales sobre diferentes fitopatógenos, además de validar su efecto bajo diferentes condiciones ambientales.

**Palabras clave:** *Phytophthora infestans*, aceite esencial, efecto fungicida, efecto fungistático, concentración mínima inhibitoria.

## Abstract

The objective of this research was to evaluate the *in vitro* antimicrobial action of the essential oil of *Lippia* sp. and *Piper aduncum* L. on *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. The comparison tests between essential oils and *Phytophthora infestans* were carried out at 20 °C in the absence of light and in solid medium V8. Two types of experiments were carried out: the contact effect and the volatile effect of each of the essential oils. The variable evaluated was mycelial growth and, with this, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. In addition, fungicidal activity (death) and fungistatic activity (inhibition of growth) of the MIC were evaluated for each of the essential oils. For the contact effect, an MIC of 4500 µg / ml and 6000 µg / ml was found for *Lippia* sp. and *Piper aduncum*, respectively. For the volatile phase, the MIC was 47µg / ml of air of *Lippia* sp. essential oil and 58.7 µg / ml of air of *Piper aduncum* essential oil . In all cases, the effect was fungistatic. However, the maximum concentration of the volatile phase of the essential oil of *Lippia* sp. presented a fungicidal effect. As far as is known, this is the first evaluation of essential oils for the control of phytopathogens in the Amazon region, making it necessary to evaluate other essential oils on different phytopathogens, in addition to validating their effect under different environmental conditions.

**Key words:** *Phytophthora infestans*, essential oil, fungicidal effect, fungistatic effect, minimum inhibitory concentration.

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente el uso de fungicidas en la agricultura es cada vez mayor. El uso de productos naturales es considerado como una gran alternativa debido a sus mínimos impactos negativos en el medio ambiente. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary es el causante del tizón tardío o racha de la papa, una enfermedad que causa enormes pérdidas en la cosecha de este importante tubérculo, alcanzando los costos de control y los daños valores superiores a 1 billón de euros en Europa (Erwin y Ribeiro, 1996; Haverkort *et al.*, 2008). Hasta hoy se recuerda el triste capítulo de la destrucción de cultivos de papa en Irlanda que provocó la hambruna y muerte de millares de personas.

La racha o tizón tardío es la enfermedad más importante de la papa en el Perú (Egúsqüiza *et al.*, 2001). Además del cultivo de papa, esta enfermedad se presenta en otros cultivos como tomate, ají, tomate de árbol entre otras solanáceas.

Principalmente el tizón tardío es controlado con aplicaciones periódicas de pesticidas químicos, que además de ser costoso resulta perjudicial para el medio ambiente, debido a la presencia de residuos. Además, el desarrollo de resistencia en los microorganismos puede llevar a una dependencia por más agrotóxicos. Por otro lado, la salud humana es puesta en riesgo debido a su lenta biodegradación (Murillo *et al.*, 2012; Isman, 2000). Debido a la pérdida de eficiencia, el elevado costo y los daños irreparables en el medio ambiente por parte de los fungicidas sintéticos, se tiene la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control y protección de los cultivos.

Se ha demostrado mediante investigaciones que las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales pueden representar nuevas alternativas para el control de fitopatógenos (Kordali *et al.*, 2007; Lee, 2007). Los compuestos químicos contenidos en los aceites esenciales han demostrado tener un efecto antimicrobiano contra un amplio número de patógenos, son productos biodegradables, carecen de toxicidad, demostrando así que pueden ser utilizados en sistemas de manejo integrado de cultivos (Soylu *et al.*, 2006).

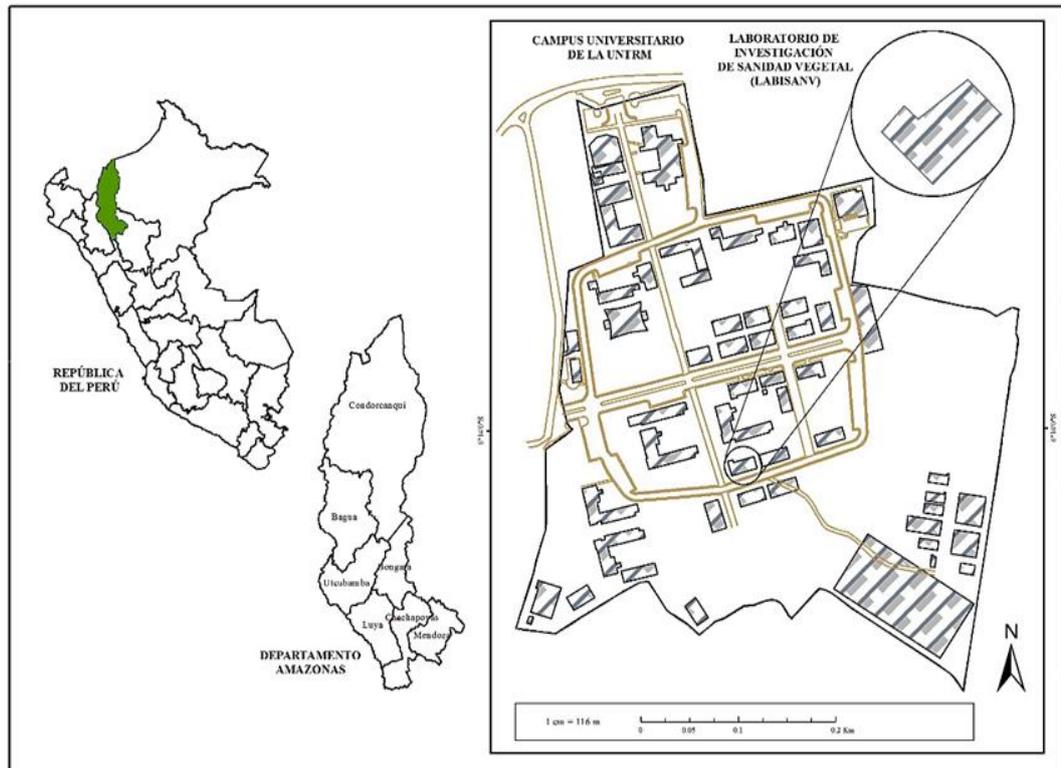
Productos pesticidas de origen botánico permiten la producción de alimentos orgánicos, obteniendo un papel importante en la producción y protección postcosecha de los alimentos en países en vías de desarrollo, razón por la cual en la actualidad se han incrementado la investigación científica sobre este tipo de productos (Gurjar *et al.*, 2012).

Por tal motivo los aceites esenciales se presentan como una alternativa frente al uso de agroquímicos, teniendo en cuenta su poco efecto negativo en el medio ambiente al ser un producto de una fuente natural, además de poseer resultados satisfactorios como un antimicrobiano. En este contexto, en la presente investigación se buscó determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Lippia* sp. y *Piper aduncum* sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Lugar de ejecución

El proceso de la ejecución y evaluación de la actividad antimicrobiana de dos aceites esenciales contra *Phytophthora infestans*, se llevó a cabo durante los meses de junio a diciembre de 2018, en los ambientes del Laboratorio de Investigación de Sanidad Vegetal (LABISANV) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas - Ciudad Universitaria Chachapoyas.



**Figura 1.** Mapa de ubicación del Laboratorio de Investigación de Sanidad Vegetal (LABISANV), de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM)-Chachapoyas.

*Fuente.* (Ramires ,2018)

## 2.2. Diseño de la investigación

### 2.2.1. Descripción de los tratamientos

**Tabla 1**

*Descripción de los tratamientos*

Experimento: 01 fase de contacto			Experimento 02: fase volátil		
Aceite esencial	Concentraciones	Descripción	Aceite esencial	Concentraciones	Descripción
<i>A=Lippia</i> sp.	C1= 0 µg/ml	T1= AC1	<i>A=Lippia</i> sp.	C1= 0µg/ml de aire	T1= AC1
	C2= 1500µg/ml	T2= AC2		C2= 11.7µg/ml de aire	T2= AC2
	C3=3000 µg/ml	T3= AC3		C3= 23.5µg/ml de aire	T3= AC3
	C4= 4500µg/ml	T4= AC4		C4= 35.2µg/ml de aire	T4= AC4
	C5= 6000µg/ml	T5= AC5		C5=47 µg/ml de aire	T5= AC5
	C6= 6500µg/ml	T6= AC6		C6= 58.7µg/ml de aire	T6= AC6
Experimento: 03 fase de contacto			Experimento 04: fase volátil		
Aceite esencial	Concentraciones	Descripción	Aceite esencial	Concentraciones	Descripción
<i>B=Piper</i> <i>aduncum</i>	C1= 0µg/ml	T1= BC1	<i>B=Piper</i> <i>aduncum</i>	C1= 0µg/ml de aire	T1= BC1
	C2= 1500µg/ml	T2= BC2		C2= 11.7µg/ml de aire	T2= BC2
	C3= 3000µg/ml	T3= BC3		C3= 23.5µg/ml de aire	T3= BC3
	C4= 4500µg/ml	T4= BC4		C4= 35.2µg/ml de aire	T4= BC4
	C5= 6000µg/ml	T5= BC5		C5= 47µg/ml de aire	T5= BC5
	C6= 6500µg/ml	T6= BC6		C6= 58.7µg/ml de aire	T6= BC6

En la tabla 1 se observa que en la presente investigación se tiene 4 experimentos independientes donde para los aceites esenciales de *Lippia* sp. Y *Piper aduncum* se probaron su actividad antimicrobiana contra *Phytophthora infestans*. En la descripción de los tratamientos se tiene que: A= aceite esencial de *Lippia* sp., B= aceite esencial de *Piper aduncum*, Cn= concentraciones y Tn= tratamientos, donde en este último cada tratamiento está conformado por un aceite esencial y una respectiva concentración tanto para la fase de contacto como para la fase volátil.

## 2.2.2. Tratamientos

**Tabla 2**

*Tratamientos de la investigación*

Experimento 01: fase de contacto, aceite esencial de <i>Lippia</i> sp.	Experimento 02: fase volátil, aceite esencial de <i>Lippia</i> sp.
Tratamientos	Tratamientos
T1	T1
T2	T2
T3	T3
T4	T4
T5	T5
T6	T6

Experimento 03: fase de contacto aceite esencial de <i>Piper aduncum</i>	Experimento 04: fase volátil aceite esencial de <i>Piper aduncum</i>
Tratamientos	Tratamientos
T1	T1
T2	T2
T3	T3
T4	T4
T5	T5
T6	T6

En la tabla 2 se tienen los seis tratamientos para los 4 experimentos de los aceites esenciales de *Lippia* sp. y *Piper aduncum* tanto para la fase volátil como para la fase de contacto.

## 2.2.3. Testigo

El testigo estuvo conformado solamente por medio de cultivo sólido V8 y fue incluido en cada uno de los ensayos. Para descartar que el Tween 20 + Etanol no tienen un efecto en el crecimiento de *Phytophthora infestans*, se realizó un ensayo utilizando una solución de Tween 20 + Etanol en las mismas concentraciones utilizadas en los aceites esenciales.

## 2.3. Características de la unidad experimental

**Tabla 3**

*Características generales del experimento*

Diseño completo al azar	
Repeticiones (placas de Petri)	4
Tratamientos	6
N° de unidades experimentales	24
Número total de placas de Petri a evaluar	24

## 2.4. Población y muestra

### 2.4.1. Población

La población estudiada estuvo conformada por 24 placas de Petri que contienen cultivos de *Phytophthora. infestans*.

### 2.4.2. Muestra

La muestra estuvo conformada por cada una de las unidades experimentales.

### 2.4.3. Muestreo

El muestreo fue de tipo probabilístico.

## 2.5. Análisis de datos

### 2.5.1. Diseño experimental

Se trabajó con un diseño completamente al azar (DCA) para cada uno de los ensayos independientes (aceites esenciales), dando un total de 4. En cada uno de ellos se evaluaron dos efectos: el de contacto y el volátil; con seis concentraciones cada uno, incluyendo el control.

Por lo tanto, se contó con 6 tratamientos y cuatro repeticiones, donde cada unidad experimental estuvo conformada por una placa Petri de 90 mm de diámetro. Además, los ensayos fueron replicados una vez, con un total de 4 diseños experimentales.

### Modelo aditivo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

#### Donde:

$Y_{ij}$ : Control de *Phytophthora infestans* en la i-ésima dosis de aceite esencial y j-ésima repetición.

$\mu$ : Efecto de la media general

$T_i$ : Efecto del i-ésimo tratamiento

$E_{ij}$ : Efecto aleatorio (error experimental) que pertenece a la  $Y_{ij}$  observación de la variable respuesta con i-ésimo tratamiento, j-ésimo tratamiento.

### 2.5.2. Esquema del análisis de varianza

#### Prueba de hipótesis

La hipótesis para tratamientos

**H<sub>0</sub>:**  $T_1 = T_2 = T_3 = \dots = T_6$

**H<sub>a</sub>:**  $T_1 \neq T_2 \neq T_3 \neq \dots \neq T_6$  para  $i = 1, 2, 3, \dots, 6$  tratamientos.

**Nivel de significación:**  $\alpha = 5\%$

**Tabla 4**

*Cuadro ANVA*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Fc
Tratamiento	$SC_{\text{tratamientos}}$	$t-1$	$CM_{\text{tratamiento}}$	$CM_{\text{tratamientos}}/$ $CME$
Error	$SC_{\text{error}}$	$\sum_{i=1}^t (n_i - 1)$	CME	
Total	$SC_{\text{total}}$	$\sum_{j=1}^t (n_j - 1)$		

## **2.6. Variables de estudio y su metodología de evaluación**

### **2.6.1. Crecimiento micelial**

Corresponde a la media de crecimiento micelial radial del patógeno que se determinó midiendo el diámetro de la colonia en dos direcciones perpendiculares el día en que el medio nutritivo de la placa de Petri del control fue completamente cubierta por *Phytophthora infestans* en las placas Petri que correspondían al testigo (sin presencia de aceite esencial). Esto se realizó 7 días después de la siembra.

### **2.6.2. Concentración mínima inhibitoria**

De una serie de concentraciones evaluadas de los aceites esenciales, la concentración mínima inhibitoria (CMI) es aquella a partir de la cual no se observa crecimiento radial desde el disco con micelio del microorganismo evaluado, indicando completa inhibición. Esta CMI puede ser refinada hasta encontrar un valor más preciso, o próximo al real, o ser aproximada, dependiendo del rigor de las evaluaciones. La ausencia de crecimiento puede deberse a la muerte del microorganismo, por un efecto fungicida del tratamiento, o a una inhibición temporal, denominado efecto fungistático.

### **2.6.3. Efecto fungicida**

Los discos de medio sólido sembrados en las placas de Petri donde no se observó crecimiento de *Phytophthora infestans* después de siete días, fueron repicados en placas de Petri con medio de cultivo sólido V8 sin aceites esenciales. Cinco días después fueron realizadas las evaluaciones. La concentración fue considerada fungicida si no se observó el crecimiento del patógeno.

### **2.6.4. Efecto fungistático**

Siguiendo el mismo procedimiento anterior, cuando el crecimiento micelial fue reiniciado, el efecto del aceite esencial para una determinada concentración fue considerado fungistático si el crecimiento del patógeno fue retomado.

## **2.7. Equipos, insumos y materiales de laboratorio**

### **2.7.1. Equipos**

- Agitador vórtex
- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza gramera
- Baño maría
- Cámara de flujo laminar
- Cocina eléctrica
- Equipo industrial de destilación
- Incubadora
- Microondas
- Microscopio de disección
- Microscopio de luz
- Refrigerador

### **2.7.2. Materiales**

- Algodón
- Asa de siembra de platina
- Calibre de Vernier digital
- Cinta adhesiva
- Espátula de Drigalski
- Espátula para pesado
- Estilete artesanal
- Frascos ámbar y de vidrio transparente
- Frascos de vidrio con tapa rosca autoclavables de 250, 500 y 1000 ml
- Gradillas o racks
- Guantes de nitrilo o látex
- Hilo pabilo
- Hornilla eléctrica
- Láminas cubre objeto
- Láminas de bisturí
- Láminas porta objeto
- Mascarillas

- Matraz de Erlenmeyer de 500 ml y 250 ml
- Mechero de alcohol
- Micropipetas de 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 1000  $\mu$ l
- Papel de aluminio
- Papel kraft
- Papel toalla
- Parafilm o plástico transparente de PVC
- Pinzas de acero inoxidable
- Pissetas
- Placas de Petri
- Plumón indeleble
- Probeta de 1000 ml de vidrio
- Probeta de 25 ml de plástico
- Puntas de pipeta de diferentes tamaños, sin filtro
- Recipientes plásticos para cámara húmeda
- Saca bocado de 5 mm de diámetro de abertura
- Tubos de ensayo
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Vasos de precipitado de 200 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml

### **2.7.3. Material biológico**

- Aislado de *Phytophthora infestans*.
- Material vegetal de *Lippia sp.*
- Material vegetal de *Pippier aduncum*

### **2.7.4. Insumos**

- Agar-agar
- Agua destilada
- Alcohol etílico comercial de 96°
- Azul de lactofenol
- Carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>)
- Jugo V8®
- Lejía comercial
- Papa dextrosa agar (PDA)
- Tween 20

## **2.8. Preparación de los experimentos**

### **2.8.1. Recolección del material vegetal**

Las muestras de *Lippia* sp. y *Piper aduncum* fueron recolectadas en el distrito de Magdalena (1980 m.s.n.m), provincia de Chachapoyas, región Amazonas. El material vegetal consistió en hojas y ramas completamente desarrolladas, ni muy tiernas, ni en estado de senescencia. El material vegetal inmediatamente fue empacado, sellado y trasladado al laboratorio de ingeniería de la UNTRM-A donde se almacenó a temperatura ambiente durante un día antes de ser realizada la extracción de su aceite esencial por destilación.

### **2.8.2. Destilado de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales fueron obtenidos mediante destilación por arrastre de vapor de las especies de orégano silvestre (*Lippia* sp.) y matico (*Piper aduncum*) mediante el procedimiento descrito por Ventura (2017): Se montó el equipo de destilación. Se pesó 10 kg de material vegetal. Seguidamente se colocó 15 litros de agua destilada en el tanque generador de vapor y en el tanque superior el material vegetal a destilar. Se calentó con una cocina industrial el tanque generador de vapor hasta la ebullición. Después de un tiempo aproximado de cinco horas se suspendió el proceso de extracción el aceite esencial, cuando se observó que el líquido (agua + aceite) producto del destilado ya no presentaba aceite. En seguida se separó el aceite esencial por decantación. Se colocó el aceite en botella ámbar de 10 ml con tapa, se selló con parafilm y se etiquetó. Inmediatamente los frascos fueron almacenados a una temperatura de -22°C hasta su utilización.

### **2.8.3. Determinación y cálculo de la densidad de los aceites esenciales.**

En una balanza analítica se pesaron 10 µl de los aceites esenciales, repitiendo 10 veces el procedimiento. Se procedió de la misma manera con agua destilada. Se obtuvieron los siguientes promedios de peso.

- *Lippia* sp.  
10  $\mu$ l:  $\tilde{X} = 0.00867 \text{ g} \pm 0.00010952$
- *Piper aduncum*  
10  $\mu$ l:  $\tilde{X} = 0.00888 \text{ g} \pm 0.00012668$
- H<sub>2</sub>O  
10  $\mu$ l:  $\tilde{X} = 0.00992 \text{ g} \pm 3.91993\text{E-}05$

El agua destilada, bajo ciertas condiciones ambientales y de altitud, tiene teóricamente una densidad de 1 g/ml. Sin embargo, se comprobó que el peso obtenido no corresponde a ese valor, probablemente también por cuestiones asociadas con el pipeteo y la retención de película de líquido en las puntas de las pipetas. De cualquier forma, el valor obtenido es el considerado como real. Teniendo en cuenta los datos obtenidos se calculó la densidad aparente de los aceites esenciales.

- *Lippia* sp: 0.87 g/ml
- *Piper aduncum*: 0.89 g/ml

#### **2.8.4. Aislamiento y cultivo de *Phytophthora infestans***

Una muestra foliar de papa con el síntoma característico de la enfermedad causada por *Phytophthora infestans* fue revisada bajo el microscopio de disección y microscopio compuesto, identificando los esporangios típicos de este microorganismo. Se compararon las imágenes con el de las claves taxonómicas, según se describe en el trabajo de Jaramillo (2003).

Muestras de foliolos de papa infectadas con *Phytophthora infestans* de 5 x 5 mm<sup>2</sup> fueron desinfectadas con (legía 10% del producto comercial) durante 2 minutos y luego se enjuagó con agua destilada durante 1 minuto (Zapata *et al.*, 2003).

Los trozos de hojas se sembraron en placas de Petri con medio agar agar. Las placas se incubaron a 20 °C durante 5-7 días para permitir que el micelio crezca en el medio. Pequeños bloques de agar que contienen hifas fueron

retirados con un sacabocado de los márgenes de la colonia y transferidos a una nueva placa de Petri con medio sólido V8 para su crecimiento bajo las mismas condiciones. El repicaje se repitió tres veces, para luego con ayuda de un microscopio confirmar la presencia del oomycete, sin contaminantes. De esta manera se consiguió un cultivo puro de *Phytophthora infestans*.

Se tomó la decisión de trabajar con medio de cultivo sólido V8 ya que luego de realizar un test de medios de alverja, agar papa dextrosa, agar agar y V8, este último fue donde *Phytophthora infestans* se desarrolló mas rápidamente luego de un intervalo de 7 días, tal y como se obserava en la figura 14.

### 2.8.5. Preparación de medio de cultivo sólido V8

Componentes	Cantidad
Jugo V8	200 ml
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Agar	20g
H <sub>2</sub> O destilda (q.s.p)	1000 ml
*q.s.p. cantidad suficiente para...	

#### Procedimiento

- En una balanza gramera se pesó el agar y el CaCO<sub>3</sub>. Para la extracción de estos componentes de su frasco de almacenamiento se utilizaron espátulas diferentes. En una probeta se midió el volumen requerido de jugo V8.
- Una vez medidos los insumos se agregaron a un vaso de precipitado de 1000 ml y se agregó agua destilada hasta completar un volumen de 500 ml aproximadamente. El vaso de precipitado conteniendo la solución se colocó sobre una cocina eléctrica, hasta conseguir que esta hierva durante aproximadamente 1 minuto, esta solución se removió permanentemente con una espátula.

- Una vez retirada la solución de medio de cultivo de la cocina eléctrica aun caliente y con ayuda de guantes aislantes de calor se vertió dicha solución en un a probeta de 1 000 ml, inmediatamente se le adicionó agua destilada hasta completar el volumen de 600 ml, suficiente para un ensayo de evaluación de un aceite esencial.
- Seguidamente se procedió a medir cantidades de 100 ml en una probeta del mismo volumen para ser vertida inmediatamente en un matraz de Erlenmeyer de 200 ml. Se completaron un total de seis matraces, los mismos que fueron cubiertos con algodón en sus respectivas bocas.
- Los matraces fueron introducidos en una autoclave para la esterilización del medio de cultivo a 121 °C durante 15 minutos.

## **2.9. Aplicación de los tratamientos**

### **2.9.1. Concentraciones de los aceites esenciales y su preparación**

Inicialmente se propusieron utilizar las siguientes concentraciones en base a literatura relacionada con el trabajo Soyly *et al.* (2006): 0, 0.1, 0.3, 0.8, 1.6 y 3.2 µg/ml de aire para la fase volátil y 0, 0.4, 1.6, 6.4, 25.6 y 102.4 µg/ml para la fase de contacto. Sin embargo, no se observó efecto inhibitorio total (CMI) contra *Phytophthora infestans*. Al parecer, esas concentraciones eran demasiado bajas. Luego de revisar otro tipo de literatura como el trabajo de Arango *et al.* (2015) se decidió realizar un test preliminar con las siguientes concentraciones: 0, 500, 3 000, 6 000, 8 000, 10 000 µg/ml para la fase de contacto y 0, 3.9, 24.5, 39.1, 58.7, 78.3 µg/ml de aire para la fase volátil. Al concluir el test se ajustaron las concentraciones para valores más próximos de la CMI: 0, 1 500, 3 000, 4 500, 6 000, 6 500 µg/ml para la fase de contacto y 0, 11.7, 23.5, 35.2, 47, 58.7 µg/ml de aire para la fase volátil.

### **2.9.2. Fase de contacto**

El efecto de fase de contacto de los aceites esenciales fue probado por la técnica de medio de cultivo envenenado. El medio de cultivo V8 fue autoclavado y, al finalizar, enfriado en baño maría a 40 °C. Bajo esa condición de temperatura fue adicionado 1 ml del aceite esencial preparado a una

concentración 100x (veces) mayor, de forma que en los 100 ml de medio quedase a la concentración adecuada. Las diferentes concentraciones de los aceites esenciales se prepararon en micro tubos de 1.5 mL. Cada micro tubo contenía Etanol al 0.5% (520.8  $\mu$ l) y Tween 20 al 0.1% (100  $\mu$ l) más la respectiva concentración de aceite esencial. El volumen de 1ml se completó con agua destilada estéril.

El medio de cultivo V8 con aceite esencial fue vertido en placas Petri de vidrio estériles de 90 mm (25 ml/placa). Discos de medio de cultivo sólido V8 de 5 mm de diámetro fueron extraídos con un sacabocado desde el borde de una colonia de *Phytophthora infestans* de 7 días de edad y se sembraron en el centro de las placas de Petri que contenían medio de cultivo más el aceite esencial. Seguidamente, las placas de Petri fueron colocadas en una incubadora a 20 °C.

### **2.9.3. Fase volátil**

Se usaron placas de Petri de vidrio de 90 mm para la determinación del efecto de la fase volátil de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. Diferentes concentraciones de aceites esenciales sin la presencia de coadyuvantes (Tween 20 + Etanol) fueron impregnados en papeles de filtro estériles de 1.5 cm de diámetro y adheridos en la superficie interna de la tapa de las placas de Petri. Después de la siembra con discos con *Phytophthora infestans* sobre el medio, la placa fue bien sellada con parafilm para prevenir la pérdida de aceites esenciales volatilizados de las placas. Las placas de Petri fueron incubadas a 20 °C en posición invertida para evitar la condensación de humedad. La inhibición de la fase volátil del aceite esencial en sus diferentes concentraciones fue determinada por la medición diaria del diámetro de la colonia, de la misma forma que realizado por Soyly *et al.*, (2006).

### **2.9.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales**

La media de crecimiento micelial radial del patógeno se determinó midiendo con la ayuda de un pie de rey digital el diámetro de la colonia en dos

direcciones con ángulos rectos cuando la superficie de la placa del tratamiento control (sin aceites esenciales) se cubrió por completo. Esto sucedió siete días después de la siembra. Para cada concentración se realizaron cuatro réplicas. Los valores de crecimiento radial fueron transformados a porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en relación con el tratamiento de control mediante el uso de la siguiente fórmula (Arango, *et al.*, 2015):

$$ICM (\%) = \frac{Dc - Dt}{Dc} (100)$$

IMC= Inhibición del crecimiento micelial expresado en porcentaje

Dc= Diámetro de crecimiento del control

Dt= Diámetro de crecimiento de los tratamientos

#### **2.9.5. Determinación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales**

La CMI de los aceites esenciales, expresada como µg/ml para la fase de contacto y µg/ml de aire para la fase volátil requeridos para dar control completo se calculó midiendo el crecimiento del patógeno. Esta corresponde a la menor concentración en la cual el microorganismo no presentó crecimiento evidente. El disco de agar conteniendo *Phytophthora infestans* a partir del cual no se verificó crecimiento micelial hacia el medio envenenado, fue transferido a medio de cultivo sólido V8 sin aceite esencial. Se incubaron las placas de Petri durante cinco días. La CMI de cada uno de los aceites esenciales fue clasificada como fungicida o fungistática. Un efecto fungicida fue donde no hubo crecimiento, mientras que un efecto fungistático ocurrió cuando la inhibición del crecimiento microbiano sucedió temporalmente y retomó su crecimiento cuando el medio no tenía aceite esencial (Soylu *et al.*, 2006).

### III. RESULTADOS

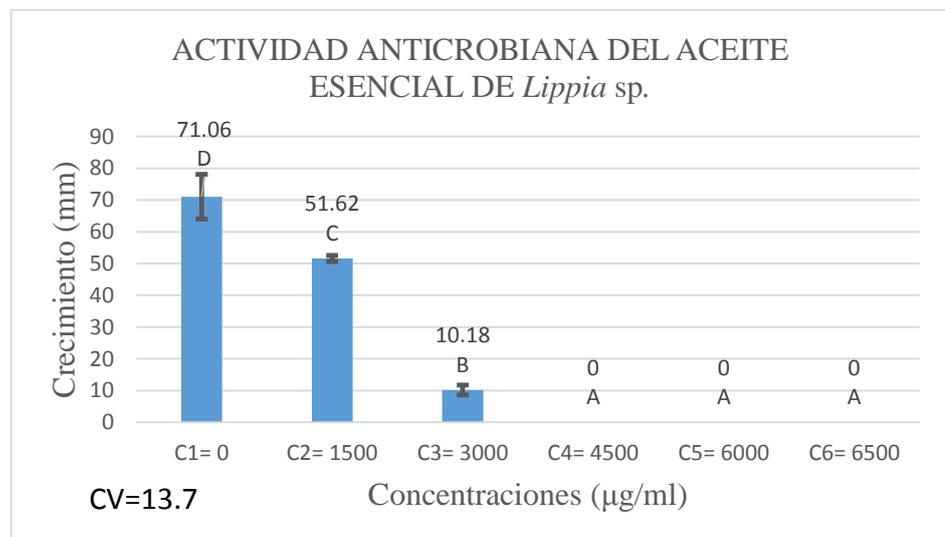
#### 3.1. Crecimiento micelial

##### 3.1.1. Fase de contacto

- **Aceite esencial de *Lippia* sp.**

En la figura 2, se evidencia que existen diferencias significativas en el crecimiento micelial para las concentraciones utilizadas del aceite esencial de *Lippia* sp., según la prueba de Duncan  $p < 0.05$ ; obteniendo cuatro grupos estadísticos donde se observa que el grupo A que va desde 4500  $\mu\text{g/ml}$  (concentración mínima inhibitoria) hasta 6500  $\mu\text{g/ml}$  (concentración máxima) presenta inhibición completa en el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* y el grupo D correspondiente al testigo absoluto sin ninguna concentración de aceite esencial es donde se observa el mayor crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*.

El cuadro ANVA correspondiente para la figura 1 se puede apreciar en el ANEXO 1.



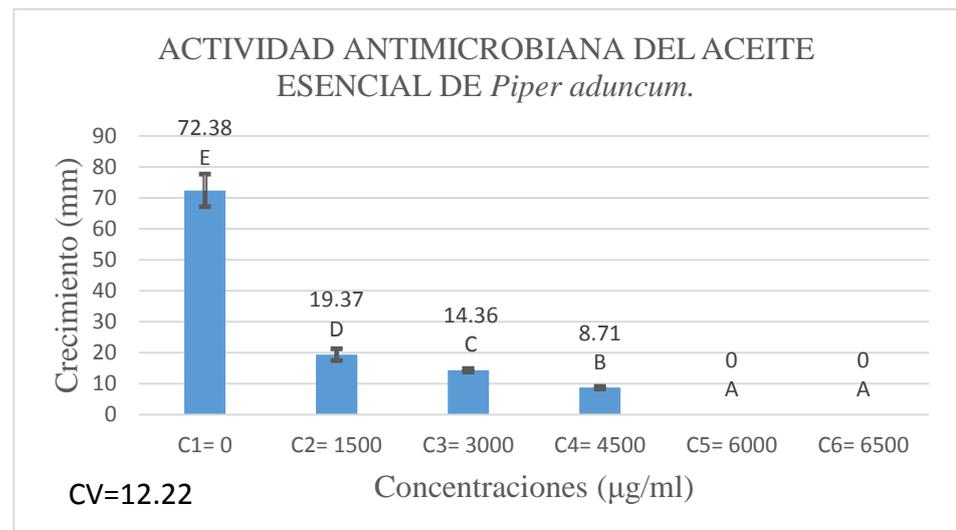
**Figura 2.** Crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* bajo seis concentraciones de aceite esencial de *Lippia* sp. para la fase de contacto.

- **Aceite Esencial de *Piper aduncum***

En la figura 3, se evidencia que existen diferencias significativas en el crecimiento micelial para las concentraciones utilizadas del aceite esencial del *Piper aduncum*, según la prueba de Duncan  $p < 0.05$ ; obteniendo cinco grupos estadísticos donde se observa que el grupo A que va desde 6000  $\mu\text{g/ml}$  (concentración mínima inhibitoria) hasta 6500

$\mu\text{g/ml}$  (concentración máxima) presenta inhibición completa en el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* y el grupo E correspondiente al testigo absoluto sin ninguna concentración de aceite esencial donde se observa el mayor crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*.

El cuadro ANVA correspondiente para la figura 2 se puede apreciar en el ANEXO 1.



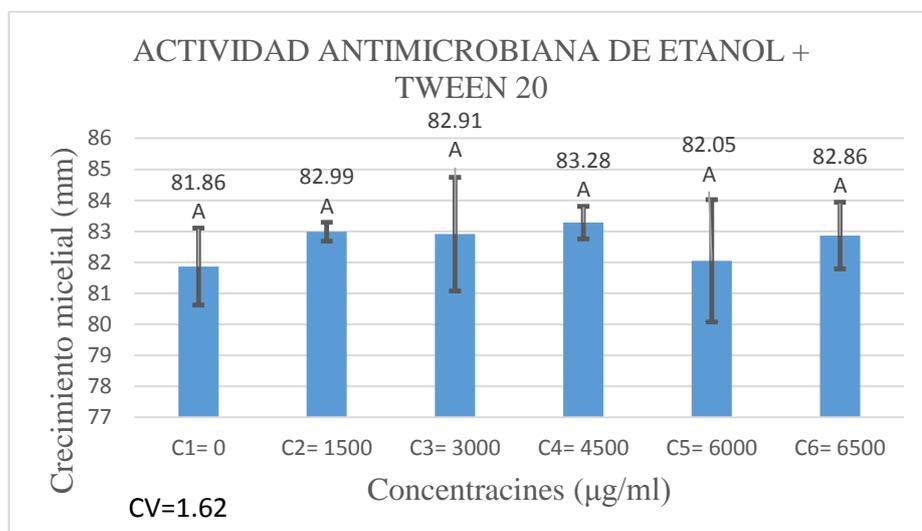
**Figura 3.** Crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* bajo seis concentraciones de aceite esencial de *Piper aduncum* para la fase de contacto.

- **Tween 20 + Etanol**

Los aceites esenciales fueron mezclados con Tween 20 y Etanol para garantizar una emulsión adecuada de estos. Para confirmar la ausencia de un efecto de los coadyuvantes utilizados junto con los aceites esenciales, se realizó una verificación con el mismo número de repeticiones de los ensayos con los aceites esenciales, de la misma forma que realizado por Arango *et al.* (2015).

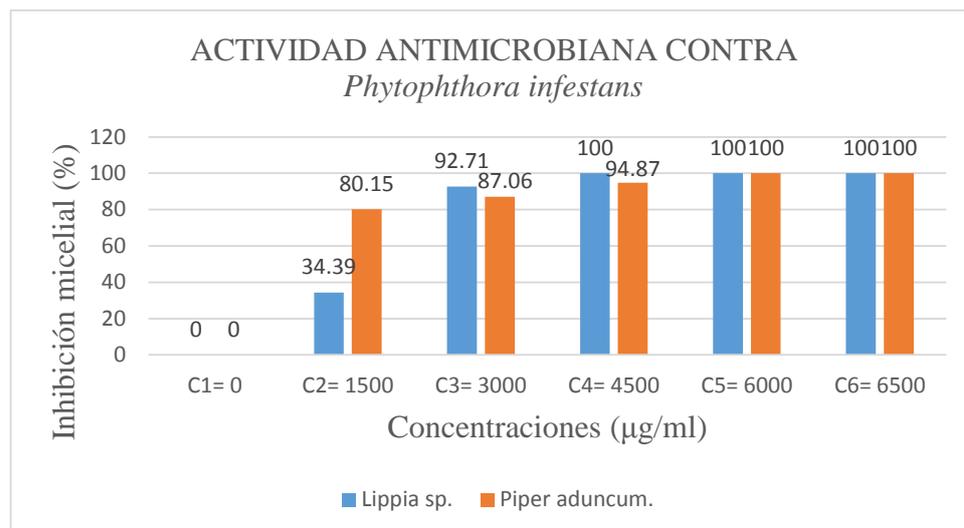
En la figura 4, se evidencia que no existe diferencia significativa en el crecimiento micelial según la prueba de Duncan  $p < 0.05$ ; obteniendo un solo grupo estadístico donde a pesar que los coadyuvantes fueron aplicados a las mismas concentraciones que los aceites esenciales se observa un similar crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*.

El cuadro ANVA correspondiente para la figura 3 se puede apreciar en el ANEXO 1.



**Figura 4.** Crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* a bajo seis concentraciones de Tween 20 + Etanol para la fase de contacto.

En la figura 5 se observa la comparación de la inhibición micelial de los aceites esenciales en términos de porcentaje respecto al testigo absoluto. Se observa una mayor inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* por parte del aceite esencial de *Lippia* sp., alcanzando una inhibición del 100% a partir de la cuarta concentración (4500 µg/ml) que corresponde a la concentración mínima inhibitoria, mientras que por otro lado el aceite esencial de *Piper aduncum* alcanza una inhibición del 100% a partir de la quinta concentración (6000 µg/ml) que corresponde a la concentración mínima inhibitoria.



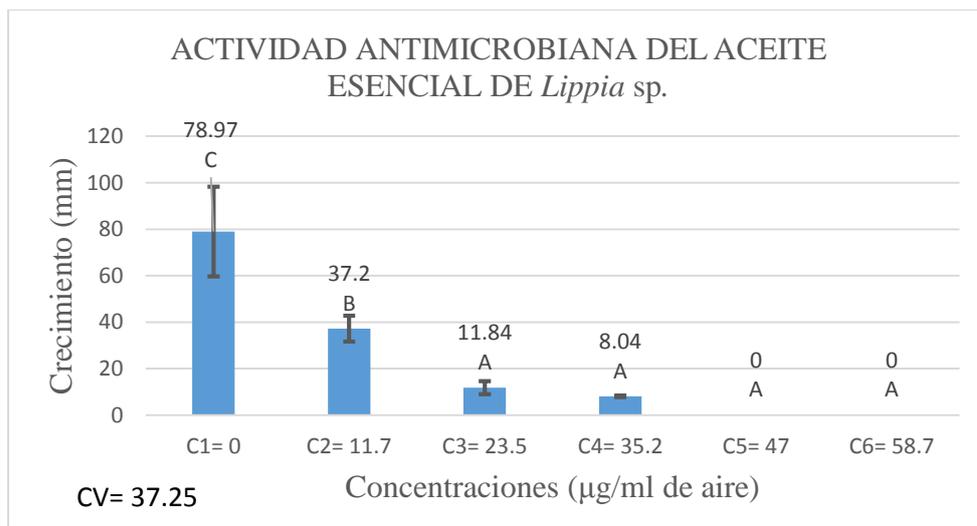
**Figura 5.** Porcentaje de inhibición micelial de los dos aceites esenciales para la fase de contacto.

### 3.1.2. Fase volátil

- **Aceite esencial de *Lippia sp.***

En la figura 6, se evidencia que existen diferencias significativas en el crecimiento micelial para las concentraciones utilizadas del aceite esencial de *Lippia sp.*, según la prueba de Duncan  $p < 0.05$ ; obteniendo tres grupos estadísticos donde se observa que el grupo A que va desde 47 µg/ml de aire (concentración mínima inhibitoria) hasta 58.7 µg/ml de aire (concentración máxima) presenta inhibición completa en el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* y el grupo C correspondiente al testigo absoluto sin ninguna concentración de aceite esencial donde se observa el mayor crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*.

El cuadro ANVA correspondiente para la figura 2 se puede apreciar en el ANEXO 1.

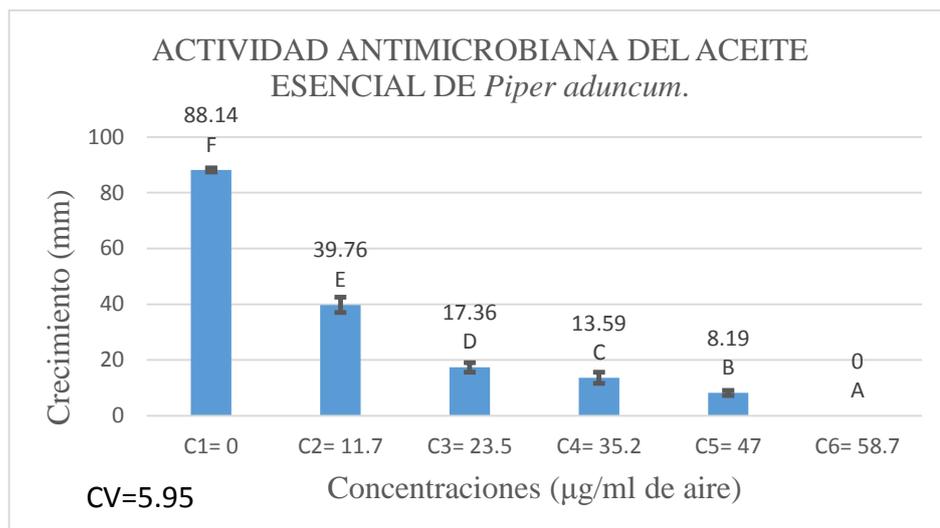


**Figura 6.** Crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* bajo seis concentraciones de aceite esencial de *Lippia* sp. para la fase volátil.

▪ **Aceite esencial de *Piper aduncum***

En la figura 7, se evidencia que existen diferencias significativas en el crecimiento micelial para las concentraciones utilizadas del aceite esencial del *Piper aduncum*, según la prueba de Duncan  $p < 0.05$ ; obteniendo seis grupos estadísticos donde se observa que el grupo A que corresponde a 58.7 µg/ml de aire (concentración mínima inhibitoria) presenta inhibición completa en el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* y el F correspondiente al testigo absoluto sin ninguna concentración de aceite esencial donde se observa el mayor crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*.

El cuadro ANVA correspondiente para la figura 2 se puede apreciar en el ANEXO 1.



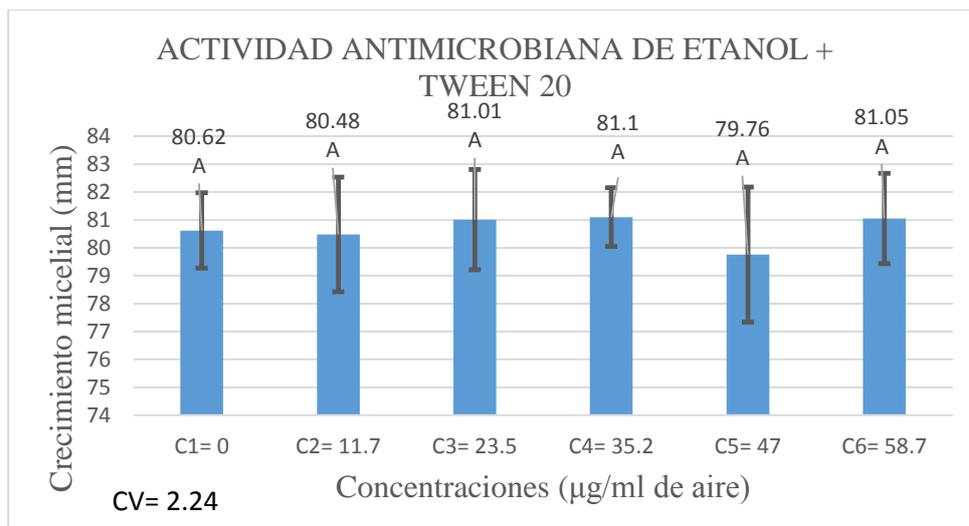
**Figura 7.** Crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* bajo seis concentraciones de aceite esencial de *Piper aduncum* para la fase volátil.

▪ **Tween 20 + Etanol**

Los aceites esenciales fueron mezclados con Tween 20+Etanol para garantizar una emulsión adecuada de estos. Por lo tanto, para confirmar la ausencia de un efecto de los coadyuvantes utilizados junto con los aceites esenciales, se realizó una verificación con el mismo número de repeticiones de los ensayos con los aceites esenciales, de la misma forma que realizado por Arango *et al.* (2015).

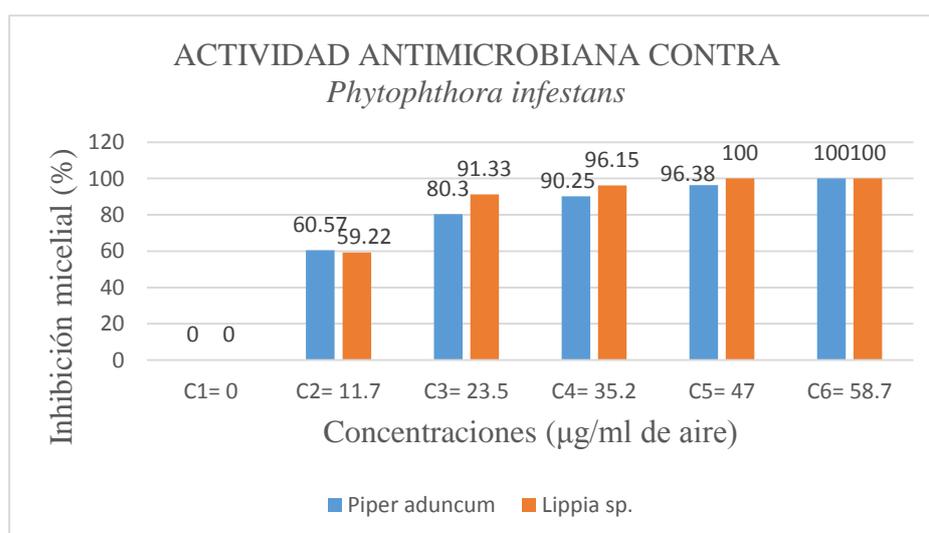
En la figura 8, se evidencia que no existe diferencia significativa en el crecimiento micelial según la prueba de Duncan  $p < 0.05$ ; obteniendo un solo grupo estadístico donde a pesar que los coadyuvantes fueron aplicados a las mismas concentraciones que los aceites esenciales se observa un similar crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*.

El cuadro ANVA correspondiente para la figura 3 se puede apreciar en el ANEXO 1.



**Figura 8.** Crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* bajo seis concentraciones de Tween 20 + Etanol para la fase volátil.

En la figura 9 se observa la comparación de la inhibición micelial de los aceites esenciales en términos de porcentaje respecto al testigo absoluto. Se observa una mejor inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* por parte del aceite esencial de *Lippia* sp., alcanzando una inhibición del 100% a partir de la quinta concentración (47 µg/ml de aire) que corresponde a la concentración mínima inhibitoria, mientras que por otro lado el aceite esencial de *Piper aduncum* alcanza una inhibición del 100% a partir de la sexta concentración (58.7 µg/ml de aire) que corresponde a la concentración mínima inhibitoria.



**Figura 9.** Porcentaje de inhibición micelial de los dos aceites esenciales para la fase volátil.

### 3.2. Formación de esporangios

Durante la ejecución del proyecto de investigación se propuso realizar el conteo de número de esporangios a través de cinco campos al azar a través del método descrito por Simpfendorfer (2001). Sin embargo, después de algunos intentos de inducción para la formación de esporangios con diferentes medios de cultivo y temperaturas, se verificó una incapacidad de microorganismo para esporular.

### 3.3. Actividad fungistática/fungicida

La actividad fungistática/fungicida consistió en determinar si el cultivo de *Phytophthora infestans* a la concentración mínima inhibitoria (CMI) tanto para la fase volátil como para la fase de contacto luego de una exposición de 7 días a esta última y cultivada nuevamente por 5 días en medio de cultivo sólido V8 sin la presencia de ninguna concentración de aceites esenciales. Si el cultivo luego de los 5 días conseguía crecer entonces la concentración mínima inhibitoria se consideraba que tenía un efecto fungistático. De lo contrario si el cultivo luego de 5 días no conseguía crecer la CMI se consideraba que tenía un efecto fungicida.

**Tabla 5**

*Actividad fungicida/fungistática de las concentraciones de aceites esenciales para la fase de contacto*

FASE DE CONTACTO	
Aceite esencial de <i>Lippia</i> sp.	
C.M.I.* = 4500 µg/ml	Actividad fungistática
Aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> .	
C.M.I. = 6000 µg/ml	Actividad fungistática

\*CMI = Concentración mínima inhibitoria.

Se observa que la CMI del aceite esencial de *Lippia* sp. correspondiente a 4500 µg/ml para la fase de contacto posee una actividad fungistática. Por otro lado, también se observa que la CMI del aceite esencial de *Piper aduncum* correspondiente a 6000 µg/ml también posee una actividad fungistática.

**Tabla 6**

*Actividad fungicida/fungistática de las concentraciones de aceites esenciales para la fase volátil*

FASE VOLÁTIL	
Aceite esencial de <i>Lippia</i> sp.	
CMI* = 47 µg/ml de aire	Actividad fungistática
Aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> .	
CMI = 58.7 µg/ml de aire	Actividad fungistática
Concentración inhibitoria = 58.7 µg/ml de aire de aceite de <i>Lippia</i> sp.	Actividad fungicida

\*CMI = Concentración mínima inhibitoria.

Se observa que la CMI del aceite esencial de *Lippia* sp. correspondiente a 47 µg/ml de aire para la fase volátil posee una actividad fungistática. Por otro lado, también se observa que la CMI del aceite esencial de *Piper aduncum* correspondiente a 58.7 µg/ml de aire también posee una actividad fungistática. Sin embargo, adicionalmente se corroboró que la máxima concentración del aceite esencial de *Lippia* sp. correspondiente a 58.7 µg/ml de aire posee una actividad fungicida.

#### IV. DISCUSIÓN

Evaluando la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales de *Lippia* sp. Y *Piper aduncum* contra *Phytophthora infestans* se encontraron diferencias significativas en las diferentes concentraciones de aceite esencial tanto para la fase volátil como para la fase de contacto respecto al testigo absoluto, para el caso del control no se encontraron diferencias significativas respecto al testigo absoluto. Los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial alcanzaron el 100% respecto al testigo absoluto dependientes de la dosis a partir de la concentración mínima inhibitoria, cuyas concentraciones para la fase contacto y el aceite esencial de *Lippia* sp. fueron de 4500 µg/ml mientras que para el aceite esencial de matico fue de 6000 µg/ml, obteniendo un efecto fungistático para estas concentraciones. En el experimento de la fase volátil las concentraciones mínimas inhibitorias para los aceites esenciales de *Lippia* sp. y *Piper aduncum* fueron de 47 µg/ml de aire y 58.7µg/ml de aire respectivamente, obteniendo un efecto fungistático para estas concentraciones a excepción de la última concentración del aceite esencial de *Lippia* sp. En cuanto al testigo control para ambas fases que consistió en una solución de Tween 20 + Etanol, aplicada en las mismas concentraciones que los aceites esenciales contra *Phytophthora infestans* no hubo un efecto significativo.

Lo encontrado en este trabajo acerca del crecimiento micelial para la fase de contacto también se puede evidenciar en la investigación de Arango *et al.* (2015) acerca de la actividad inhibitoria del aceite de *Lippia origanoides* sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* donde a partir de la concentración de 150 µg/ml (concentración mínima inhibitoria) de aceite de *Lippia origanoides* se observó una inhibición del 100% del crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*. Además, mostró que el coadyuvante para el aceite esencial de *Lippia origanoides*, en este caso Tween 20 aplicado a las mismas concentraciones que el aceite esencial no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. El mismo resultado se encontró en el presente trabajo donde no se encontraron diferencias significativas por parte de los coadyuvantes (Tween 20+ Etanol) aplicado a las mismas concentraciones que los aceites esenciales sobre *Phytophthora infestans*. Sin embargo, estos resultados difieren en que las concentraciones mínimas inhibitorias de la presente investigación no poseen un efecto fungicida en contraste con el trabajo de Arango *et*

al. (2015), además de que estas son menores a las utilizadas en la presente investigación. Es importante recordar que la calidad de los aceites esenciales puede variar en función de la especie, y variedad de planta, condiciones de crecimiento, etapa fenológica, estrés, entre otros factores. En este caso, el orégano utilizado por aquel autor correspondía a la especie *Lippia origanoides* mientras que en el presente trabajo se utilizó una planta del género *Lippia* con especie aún por identificar.

Soylu *et al.* (2006) quien en su investigación acerca de las actividades antimicrobianas de los aceites esenciales de diversas plantas contra agente de la enfermedad del tizón tardío del tomate *Phytophthora infestans* también encontró que la inhibición del crecimiento micelial fue dependiente de la concentración de los aceites esenciales, siendo notoriamente la fase volátil más efectiva que la fase de contacto ya que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron menores, sin embargo a diferencia del trabajo de Soyly *et al.* (2006) las CMI en el presente trabajo sólo tienen un efecto fungistático y son más altas. Las CMI para la investigación de Soyly *et al.* (2006) para la fase volátil fueron: orégano 0,3 µg / ml de aire, por otro lado, hinojo, romero, lavanda, laurel 0,4, 1,2, 1,6 y 2,0 µg/ml de aire respectivamente. Para la fase contacto fueron: orégano, tomillo e hinojo aceites esenciales a 6.4 µg / ml inhibió el crecimiento de *Phytophthora infestans* completamente, mientras que el crecimiento del micelio fue totalmente inhibido por aceites esenciales de romero y de lavanda en 12,8 µg/ml y 25.6 µg/ml respectivamente. De aceite de laurel, sin embargo, causó una inhibición completa a la concentración más alta (51,2 µg/ml) que se utiliza en el estudio.

Por otro lado, Soyly *et al.* (2010) en su investigación acerca de las actividades anti fúngicas *in vitro* y *in vivo* de los aceites esenciales de diversas plantas contra agente causal de la enfermedad moho gris tomate *Botrytis cinerea*, obtuvo resultados similares a su investigación anterior, solamente diferenciándose de esta en que trabajo con otro patógeno y uso otras plantas como fuente de aceites esenciales a excepción del orégano por lo que era de esperarse que las CMI encontradas fueran diferentes. Las CMI para el trabajo de Soyly *et al.* (2010) para la fase volátil fueron de orégano 0.2 µg/ml de aire, romero y lavanda 1.6 µg/ml de aire y para la fase de contacto orégano 12.8 µg/ml, romero y lavanda 25.6 µg/ml.

En ambas investigaciones realizadas por Soyly se encontró un efecto de disminución en la producción de esporas para el caso de *Botrytis cinerea* y esporangios para el caso de *Phytophthora infestans*. En la presente investigación también se propuso evaluar esta variable a través del conteo del número de esporangios sin embargo, no se pudo llevar a cabo debido a la ausencia de esporulación del patógeno en estudio, lo que pudo deberse a la pérdida de la virulencia del microorganismo al ser cultivado repetitivamente en medio de cultivo artificial tal y como lo señalan Hodgson & Sharma (1967).

Las investigaciones realizadas por Soyly, Arango y el presente trabajo se evidencia que las concentraciones de aceite esencial de orégano independiente de la especie y lugar donde se realizaron los trabajos son menores respecto a los demás aceites utilizados quedando así demostrado el gran potencial antimicrobiano de esta planta. Finalmente, este es la primera tesis de la universidad, hasta donde se tiene conocimiento, donde se ha buscado determinar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales y se espera que estas exploraciones básicas continúen y que, en el futuro, se pueda verificar su aplicación en campo, sabiendo que existen algunos desafíos a resolver como, por ejemplo, una mayor persistencia del producto en las plantas.

## V. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluye lo siguiente:

- La inhibición del crecimiento micelial es dependiente de la concentración de aceite esencial.
- El experimento y el aceite esencial que mostraron una mayor inhibición del crecimiento micelial fueron el efecto volátil y el aceite esencial de *Lippia* sp., cuya concentración fue de 47 µg/ml de aire (CMI). Y el experimento y aceite esencial que mostraron una menor inhibición micelial fueron la fase de contacto y el aceite esencial de *Piper aduncum* cuya concentración corresponde a 6000 µg/ml (CMI).
- El testigo control (solución de Tween 20 + Etanol) no presentó diferencias significativas respecto al testigo absoluto, en la variable crecimiento micelial demostrando así que no existe un efecto significativo de este en la acción de los aceites esenciales sobre *Phytophthora infestans*.
- La inhibición del crecimiento micelial es dependiente de la concentración de aceite esencial.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias de los aceites esenciales (*Lippia* sp. y *Piper aduncum*) de ambos experimentos poseen actividad fungistática.
- Se corroboró que *Phytophthora infestans* cultivado en medio de cultivo sólido V8, no produce esporangios aun sin la presencia de aceites esenciales.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Ajustar las concentraciones de aceites esenciales para obtener las concentraciones mínimas inhibitorias lo más próximas a lo real posible.
- Después de probar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales realizar un análisis de espectrofotometría para poder cuantificar la cantidad exacta de los componentes de estos aceites esenciales.
- Realizar un test con otros medios de cultivo para poder identificar el más adecuado para el desarrollo del microorganismo en estudio.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arango, O., Hurtado, A. M., Pantoja, D., Santacruz, L., (2105), Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. *Acta Agronómica*. 64 (2), p 116-124.
- Egusquiza, R., and Apaza, W. (2001). La ranca de la papa (*Phytophthora infestans*) en el Perú. Perfil del país. In Proceedings of the International Workshop on Complementing Resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans*) in the Andes, Cochabamba - Bolivia. Memorias: 29 -39.
- Erwin, D. C. and Ribeiro. O. k. (1996). *Phytophthora Diseases Worl Wide*. Minesota. *The American Phytopathology Society*. 562-pp.
- Gurjar, M.; Ali, S.; Akhtar, M; y Sing, K. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agric. Sci.* 3:425 - 433.
- Haverkort, A.J.; Boonekamp, P.M.; Hutten, R.; Jacobsen, E.; Lotz, L.A.; y Kessel, G.J. (2008). Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Res.* 51:47 - 57.
- Hodgson, W.A. & Sharma, K.P. (1967). Restoration of virulence of stored cultures of *Phytophthora infestans*. *Can. J. Plant Science, Notes*. 1967, vol. 47, 447-449.
- Isman, M. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19:603-608.
- Jaramillo, S. (2003). *Monografía sobre P. infestans (Mont) de Bary*. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Departamento de Ciencias Agronómicas.
- Kordali, S.; Kotan, R.; y Cakir, A. (2007). Screening of in vitro antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes as plant disease control agents. *Allelopathy J.* 19:373 - 392.

- Lee, H. (2007). Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Biores. Techn.* 98:1324 - 1328.
- Murillo, W.; Araque, P.; y Pelaez, C. (2012). Actividad fungicida e insecticida de emulsiones agua/aceite de mezclas de extractos de *nicotina tabacum*, *Azadiractha indica* y *Eucalyptus tereticornis*. *Inform. Technology.* 23(1):139 - 152.
- Ramirez, J. (2018). Potencial de biocontrol de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao nativo fino de aroma, de la provincia de bagua, amazonas - 2018. Tesis inédita. Titulación en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Chachapoyas, Perú.
- Simpfendorfer S, Harden TJ, Murray GM. (2001). Effect of temperature and pH on the growth and sporulation of *Phytophthora clandestine*. *Australas Plant Pathology*; 30: 1–5.
- Soylu, E., Kurt, P., Soyly, S. (2010). *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143: 183–189.
- Soylu, E., Soyly, S., Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*, *Mycopathologia*, 161: 119–128.
- Ventura, A. E. (2017). *Comparación de tres métodos en la extracción de aceite esencial de orégano silvestre (Lippia sp.)*. Tesis inédita. Titulación en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Chachapoyas, Perú.
- Zapata, R.; Sanabria, M.; y Rodríguez, D. (2003). Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardónlefaria (*Cereus deficiens* Otto y Diert). *Interciencia.* 28(5):302 - 306.

## ANEXO 1. Análisis de varianza

**Tabla 7**

*Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de la fase de contacto del aceite esencial de Lippia sp.*

F.V.	S.C.	gl	CM	F	P-valor
Modelo	19505.33	5	3901.07	423.67	<0.0001
concentración	19505.33	5	3901.07	423.67	<0.0001
Error	165.74	18	9.21		
Total	19671.07	23			

**Tabla 8**

*Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de la fase de contacto del aceite esencial de Piper aduncum.*

F.V.	S.C.	gl	CM	F	P-valor
Modelo	14793.98	5	2958.8	541.18	<0.0001
concentración	14793.98	5	2958.8	541.18	<0.0001
Error	98.14	18	5.47		
Total	14892.39	23			

**Tabla 9**

*Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de la fase de contacto de Tween 20 + Etanol.*

F.V.	S.C.	gl	CM	F	P-valor
Modelo	6.42	5	1.28	0.72	<0.6197
concentración	6.42	5	1.28	0.72	<0.6197
Error	32.27	18	1.79		
Total	38.69	23			

**Tabla 10**

*Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial para la fase volátil del aceite esencial de Lippia sp.*

F.V.	S.C.	gl	CM	F	P-valor
Modelo	18958.13	5	3791.63	53.15	<0.0001
concentración	18958.13	5	3791.63	53.15	<0.0001
Error	1284.04	18	71.34		
Total	2042	23			

**Tabla 11**

*Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial para la fase de volátil del aceite esencial de Piper aduncum.*

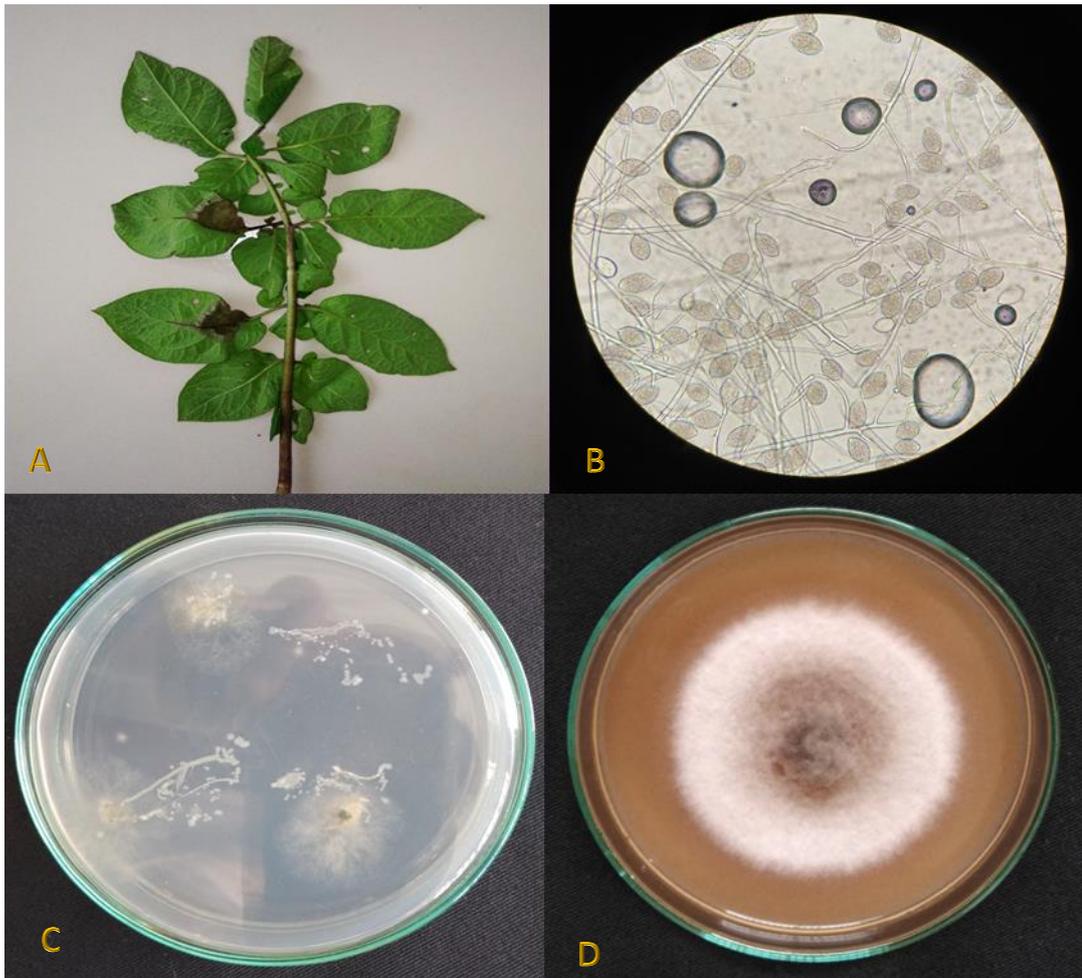
F.V.	S.C.	gl	CM	F	P-valor
Modelo	21010.54	5	4202.11	1529.28	<0.0001
concentración	21010.54	5	4202.11	1529.28	<0.0001
Error	49.46	18	2.75		
Total	21060	23			

**Tabla 12**

*Análisis de varianza para la variable crecimiento micelial para la fase volátil de Tween 20 + Etanol.*

F.V.	S.C.	gl	CM	F	P-valor
Modelo	5.22	5	1.04	0.32	<0.8954
concentración	5.22	5	1.04	0.32	<0.8954
Error	58.99	18	3.28		
Total	64.21	23			

## ANEXOS 2. Panel fotográfico



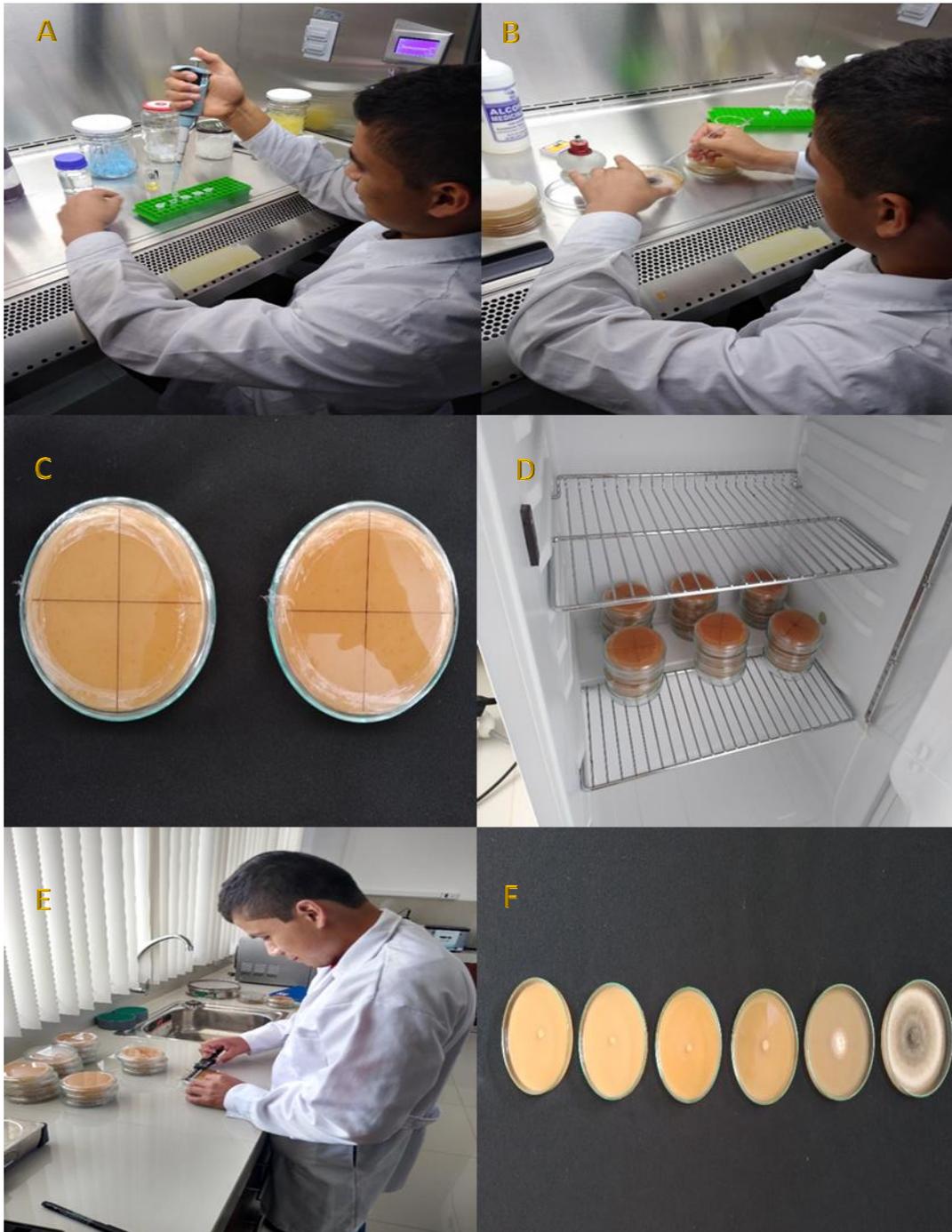
**Figura 10.** Aislamiento de *Phytophthora infestans*: (A) Fuente de inóculo; (B) Muestra esporangios de *Phytophthora infestans*; (C) Placa de Petri con aislados de hoja; (D) Cultivo del patógeno en medio de cultivo sólido V8.



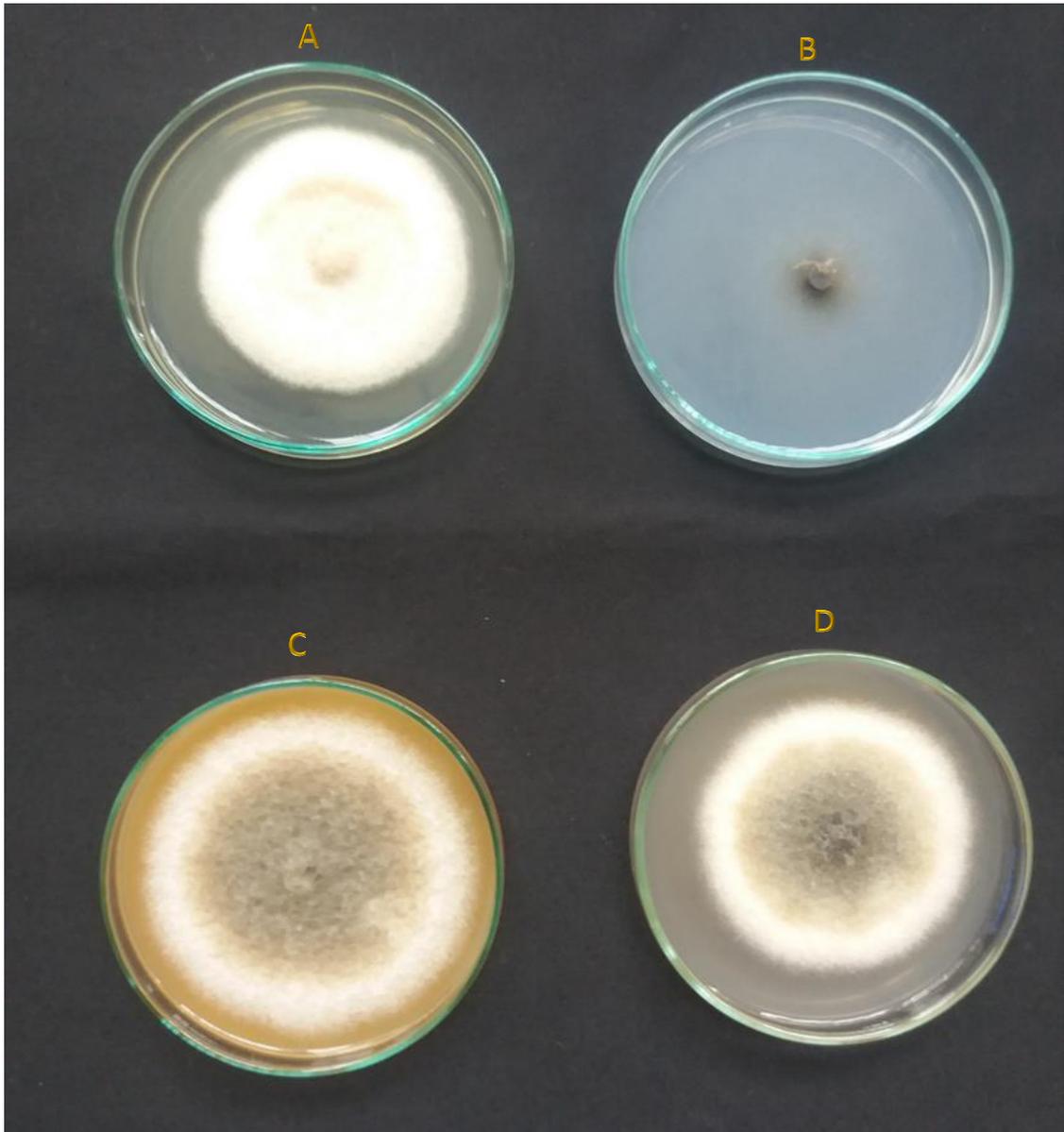
**Figura 11.** Destilado de aceites esenciales. (A) *Lippia* sp.; (B) *Piper aduncum*; (C) Proceso de destilado de arrastre de vapor; (D) Decantado del aceite esencial.



**Figura 12.** Preparación de medio de cultivo sólido V8. (A) Jugo de verduras V8; (B) Agar agar y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ); (C) Pesado de los insumos; (D) Disolución de la solución del medio de cultivo en una cocina eléctrica, (E) Autoclavado del medio de cultivo; (F) servido de las placas Petri con el medio de cultivo V8.



**Figura 13.** Aplicación de aceites esenciales y repicaje de *Phytophthora infestans*. (A) Pipeteado de las concentraciones de los aceites esenciales; (B) Repicaje del patógeno; (C) Trazado de las placas Petri; (D) Placas Petri en la incubadora; (E) Medición del crecimiento micelial; (F) Efecto antimicrobiano de los aceites esenciales.



**Figura 14.** Test de medios de cultivo. (A) medio agar papa dextrosa; (B) medio agar agar; (C) medio V8; (D) medio de alverja.