

Universidad de Cundinamarca  
Extensión Facatativá



---

Facultad de Ciencias Agropecuarias

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA (*Citrus sinensis* L.) Y LIMÓN (*Citrus latifolia*), FRENTE A *Sclerotinia* sp., AGENTE CAUSAL DEL MOHO BLANCO EN LEHUGA.**

**LEIDY LORENA DELGADO TELLEZ**  
Cod. 460213220

**YULI LISSET ESPITIA PRADA**  
Asesor.

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA.**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS.**  
**INGENIERIA AGRONOMICA.**  
**FACATATIVÁ.**  
**2019.**

EVALUACIÓN *in vitro* DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA (*Citrus sinensis* L.) Y LIMÓN (*Citrus latifolia*), FRENTE A *Sclerotinia* -sp., AGENTE CAUSAL DEL MOHO BLANCO EN LEHUGA.

**LEIDY LORENA DELGADO TELLEZ**  
Cod. 460213220

Trabajo de grado opción investigación para optar por el título de:  
Ingeniero Agrónomo

Asesor externo  
Licenciada en Química, Yuli Lisset Espitia Prada,  
M. Sc. En Ciencias Farmacéuticas

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA.**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS.**  
**INGENIERIA AGRONOMICA.**  
**FACATATIVÁ.**  
**2019.**

**Nota de Aceptación:**

---

---

---

---

---

---

**Firma del presidente del Jurado**

---

**Firma del Jurado**

---

**Firma del Jurado**

**DEDICATORIA.**

A Dios, por ser mi guía y sustento en cada paso, que he ido dando en la vida.

A aquellos que, aunque no están, siempre son parte de mi impulso para seguir avanzando.

A mi familia, por ser mi apoyo y confianza puesta en mí para impulsarme en cada etapa de mi vida.

A mis amistades más cercanas, que confiaron en mí y me brindaron su apoyo y ánimo en momentos difíciles.

### AGRADECIMIENTOS

A mis padres María Inés Téllez Ramírez y Rodolfo Delgado Olarte, quienes aportaron a mi vida valores y principios, para continuar en el camino correcto, junto a su apoyo y guía en cada paso

A mi hermana María Fernanda Delgado, por su apoyo y respaldo.

A mi compañero de vida, Sebastián Atuesta por su apoyo incondicional e impulso, para culminar esta etapa de mi vida. A mis amistades más cercanas, que confiaron en mí y me brindaron su apoyo y animo en momentos difíciles.

A la directora de tesis, Yuli Lisset Espitia Prada Lic. en Química, quien dispuso de su tiempo y conocimiento para la realización orientación en la elaboración de este trabajo.

Al microbiólogo Diego Fajardo Gómez, Gestor de la Línea de Biotecnología y nano tecnología del Tecnoparque- Nodo Bogotá, por su apoyo y orientación en las fases de este trabajo, hasta su culminación.

A la Bacterióloga, Jenifer Gutiérrez, por su aporte y contribución en las bases de este trabajo de investigación.

A Todo el equipo de trabajo del Tecnoparque – Nodo Bogotá, de la Línea de Biotecnología y nano tecnología por su aporte y apoyo, en el desarrollo de este trabajo. Además de la orientación y disposición de los equipos para la ejecución del mismo.

A los todas las personas que hacen parte de la facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Cundinamarca, por su aporte y comprensión.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	5
AGRADECIMIENTOS .....	6
INDICE DE FIGURAS.....	9
INDICE TABLAS .....	11
INDICE GRAFICOS.....	11
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN .....	15
CAPÍTULO 1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA: .....	17
1.4. Formulación del problema:.....	21
1.5. OBJETIVOS .....	22
1.5.1. Objetivo general: .....	22
1.5.2. Objetivos específicos:.....	22
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	23
2.1. Fungicidas Biológicos.....	23
2.1.1. Generalidades de los Aceites esenciales (AE).....	23
2.2. Enfermedades causadas por hongos, cultivos hortícolas.....	24
2.3. Control biológico con aceites esenciales de cítricos.....	26
2.3.1. Aceite esencial de Naranja ( <i>Citrus sinensis</i> ).....	27
2.3.2. Aceite esencial de Limón ( <i>Citrus latifolia</i> ).....	28
2.4. Generalidades del cultivo de lechuga.....	29
2.5. Principales enfermedades del cultivo de lechuga .....	30
2.5.1. Moho blanco por <i>Sclerotinia sp.</i> .....	31
2.5.2. Mecanismos de control .....	34
CAPÍTULO 3. MARCO DE REFERENCIA.....	37
3.1. Enfoque: .....	37
3.2. Tipo de investigación:.....	37
3.3. Procedimiento y materiales:.....	37
3.3.1. Localización .....	37
CAPITULO 4. MARCO METODOLÓGICO .....	38

4.1. Métodos.....	38
4.1.1. Recolección de la muestra del material vegetal .....	38
4.1.2. Aislamiento hongo fitopatógeno .....	39
4.1.3. Desinfección de esclerocios.....	39
4.1.4. Extracción del aceite .....	40
4.1.4.1. Obtención de aceite, por hidrodestilación .....	42
4.1.5. Evaluación de la inhibición del crecimiento de micelio .....	43
4.1.6. Análisis estadístico .....	45
<b>CAPITULO 5. ANÁLISIS Y DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS. ....</b>	<b>47</b>
5.1. Aislamiento e identificación del hongo fitopatógeno .....	47
5.2. Extracción de aceites.....	49
5.3. Pruebas <i>in vitro</i> .....	50
5.3.1. Pruebas preliminares de Inhibición del crecimiento radial.....	50
5.4. Efecto del AEN y AEL, en la inhibición del crecimiento de micelio .....	52
6. CONCLUSIONES. ....	66
7. RECOMENDACIONES .....	67
8. BIBLIOGRAFIA .....	68
9. ANEXOS .....	74

## INDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1:</b> Ciclo de infección de <i>S. sclerotiorum</i> , en cultivos hortícolas.....	31
<b>Figura 2:</b> Presencia de micelio de <i>S. sclerotiorum</i> , sobre hoja de Lechuga.....	32
<b>Figura 3:</b> (a) Zona de cultivo, delimitada para la toma de muestras, (b) Hojas de lechuga con signos del patógeno ( <i>Sclerotinia sp.</i> ), observándose la presencia de micelio tipo algodonoso.....	36
<b>Figura 4:</b> (a) Hoja externa de lechuga, con síntoma de marchitez y signo que muestra la presencia de micelio algodonoso, (b) Cámara húmeda con presencia de <i>Sclerotinia sp.</i> , (recuadro azul), se observa color café en el tejido vegetal luego de 5 días.....	37
<b>Figura 5:</b> (a) proceso de Hidrodestilación asistida por microondas, (b) balón esmerilado con parte de material y agua en igual proporción.....	40
<b>Figura 6:</b> Esquema con las cuatro concentraciones definidas para el tercer rango de concentraciones, del diseño experimental.....	41
<b>Figura 7:</b> Técnica de pozos, para la prueba de inhibición del crecimiento radial, según cada concentración. (a) Caja de petri, con pozos, (b) Adición de la concentración en los pozos y (c) tubos ependorff con las concentraciones.....	42
<b>Figura 8:</b> (izquierda) Visualización en campo, planta de lechuga con presencia de esclerocios, (derecha) Hoja con presencia de micelio (recuadro rojo) en un extremo de la hoja. Fuente: Delgado, 2017.....	45
<b>Figura 9:</b> (a) Vista de las hifas de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> a 40x. (b) cepa de <i>S. sclerotiorum</i> , de donde se realizó la lámina.....	46
<b>Figura 10:</b> (a) Crecimiento de <i>S. sclerotiorum</i> , desinfección de esclerocios 2,5% por 2min, (b) Crecimiento de <i>S. sclerotiorum</i> , desinfección de esclerocios 5% por 2min.....	46
<b>Figura 11:</b> Ensayo preliminar por técnica de difusión en agar del AEN-Esclerocio en concentraciones (a) de 10%, 25% y 50%. (b) de 5%, 10% y 15% y (c) de 4%, 2% y 1%, donde esta última evidencia crecimiento del hongo entre el 6 y 7 día, las	

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

demás concentraciones no mostraron crecimiento al 5 y 7 día del ensayo.....48

**Figura 12:** Ensayo preliminar por técnica de difusión en agar del AEL-Esclerocio en concentraciones (a) de 10%, 25% y 50%. (b) de 5%, 10% y 15% y (c) de 4%, 2% y 1%, donde esta última evidencia crecimiento del hongo entre el 6 y 7 día, las demás concentraciones no mostraron crecimiento al 5 y 7 día del ensayo.....49

**Figura 13:** Ensayo de AEN por esclerocio, en las concentraciones de 0,5%, 1% y 2%.....52

**Figura 14:** Crecimiento de *S. sclerotiorum.*, a partir de esclerocio, para el 7mo día de ensayo con las concentraciones de AEN.....52

**Figura 15:** Ensayo de AEN por micelio, en las concentraciones de 0,5%, 1% y 2%.....55

**Figura 16:** Crecimiento de *S. sclerotiorum.*, a partir de esclerocio, para el 7mo día de ensayo con las concentraciones de AEN.....55

**Figura 17:** Ensayo de AEL por esclerocio, en las concentraciones de 0,5%, 1% y 2%.....59

**Figura 18:** Crecimiento de *S. sclerotiorum*, a partir de esclerocio en el 7mo día de ensayo, con las concentraciones de AEL.....59

**Figura 19:** Ensayo de AEL por micelio, en las concentraciones de 0,5%, 1% y 2%.....51

**Figura 20:** Crecimiento de *S. sclerotiorum*, a partir de micelio en el 7mo día de ensayo, con las concentraciones de AEL.....62

## INDICE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Aceites esenciales evaluados sobre <i>S. sclerotiorum</i> , a diferentes concentraciones.....	45
<b>Tabla 2:</b> Composición química de los aceites esenciales de Naranja y Limón.....	49
<b>Tabla 3:</b> Porcentajes de efectividad, para el control de <i>S. sclerotiorum</i> .....	52

## INDICE GRAFICOS

<b>Grafica 1:</b> Promedio de crecimiento (cm) de <i>S. sclerotiorum</i> . Por técnica de pozos con AEN a diferente concentración evaluada (2%, 1% y 0,5%), en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).....	53
<b>Grafica 2:</b> Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (%IMC) de <i>S. sclerotiorum</i> , con respecto a cada concentración evaluada, en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).....	54
<b>Grafica 3:</b> Promedio de crecimiento (cm) de <i>S. sclerotiorum</i> . Por técnica de pozos con AEN a diferente concentración evaluada (2%, 1% y 0,5%), en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).....	57
<b>Grafica 4:</b> Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (%IMC) de <i>S. sclerotiorum</i> , con respecto a cada concentración evaluada, en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).....	58
<b>Grafica 5:</b> Promedio de crecimiento (cm), de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . Por técnica de pozos con AEL a diferente concentración evaluada (2%, 1% y 0,5%), en	

comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).....60

**Grafica 6:** Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (%IMC) de *S. sclerotiorum*, con respecto a cada concentración evaluada, en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).....62

**Grafica 7:** Promedio de crecimiento (cm), de *S. sclerotiorum*, Por técnica de pozos con AEL a diferente concentración evaluada (2%, 1% y 0,5%), en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).....64

**Grafica 8:** Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (%IMC) de *S. sclerotiorum*, con respecto a cada concentración evaluada, en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).....66

## RESUMEN.

El moho blanco *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, es uno de los principales fitopatógenos causales de muerte en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*), causando pudrición en la parte baja de la planta, evidenciándose marchitez en las hojas más externas de la planta, lo cual generalmente ocurre cuando el cultivo se acerca a la madurez, al avanzar la infección la corona desarrolla una pudrición acuosa, seguida de un crecimiento blanco algodonoso que destruye el tejido y provoca la muerte de la planta, en grandes infestaciones se pierde gran parte del cultivo. El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad de aceites esenciales de Limón (*Citrus latifolia*) y Naranja (*Citrus sinensis* L.), determinando cual es la concentración más eficiente para la inhibición en el crecimiento de este fitopatógeno, mediante la implementación de ensayos *in vitro*, con concentraciones de 0.5%, 1% y 2% de cada aceite, en el laboratorio de la Línea de Biotecnología y Nanotecnología, el cual se encuentra ubicado en el Tecnoparque Nodo-Bogotá - SENA (Servicio Nacional de Aprendizaje).

Se midió el crecimiento radial del hongo al cuarto, séptimo y décimo día en las tres repeticiones de cada concentración o tratamiento. Se encontró que la concentración de 2% de ambos aceites esenciales (limón y naranja) al séptimo día presentaron los más altos porcentajes de inhibición.

**Palabras clave:** aceites esenciales, moho blanco, concentración, porcentaje de inhibición, *in vitro*.

### ABSTRACT

The white mold *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Of Bary, is one of the main phytopathogens causes of death in lettuce plants (*Lactuca sativa*), causing rot in the lower part of the plant evidencing wilts on the outermost leaves of the plant, which usually occurs when the crop approaches maturity, as the infection progresses, the crown develops an aqueous rot, followed by a cottony white growth that destroys the tissue and causes the death of the plant, in large infestations much is lost of the crop. The objective of this work is to evaluate the activity of essential oils of Limón (*Citrus latifolia*) and Orange (*Citrus sinensis* L.), determining which is the most efficient concentration for the inhibition in the growth of this phytopathogen, by means of the implementation of essays in vitro, with concentrations of 0.5%, 1% and 2% of each oil, in the laboratory of the Biotechnology and Nanotechnology Line, which is located in the Tecnoparque Nodo-Bogotá - SENA (National Service of Learning).

The radial growth of the fungus was measured on the fourth, seventh and tenth day in the three repetitions of each concentration or treatment. It was found that the concentration of 2% of both essential oils (lemon and orange) on the seventh day had the highest percentages of inhibition.

**Key words:** essential oils, white mold, concentration, percentage of inhibition, in vitro.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de pudrición blanda o moho blanco, se presenta en el cultivo de lechuga asociada a dos patógenos, como lo son *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum*. En ambos casos la parte afectada son las hojas, lo cual muestra inicialmente lesiones que van desde las hojas viejas y luego llega a las nuevas, seguido por una muerte celular en el área afectada y posterior desarrollo de un micelio blanco, seguido de la formación de esclerocios (Purdy, 1979). Ya que las hojas representan el producto de interés comercial, su afectación a causa de esta enfermedad, resulta en pérdidas a nivel mundial (Purdy, 1979; Saharan y Mehta 2008) y nacional, significativas (Arias y Tautiva, 2006).

El control de una enfermedad no depende de un único método, puesto que no provee niveles de manejo satisfactorios de la enfermedad, a diferencia de si se integran varios métodos, en busca de potenciar la acción sobre el patógeno (Arias, et al., 2007). Lo que generalmente se refiere a un manejo únicamente químico, biológico o combinación de ambos. Para el manejo específico de este patógeno, los manejos generalmente empleados son: solarización, aplicación de enmiendas orgánicas, fungicidas de síntesis química, hongos antagonistas como *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Sporidesmium* spp., entre otros (Adams 1979; Saharan y Mehta 2008).

Dentro de las nuevas alternativas de control que se han venido estudiando, como es el uso de aceites esenciales, a los que se atribuye sus efectos antifúngicos, bactericidas y otros, los cuales generan: cambios en la morfología del organismo, daño en estructuras reproductivas y se reduce la producción de toxinas. Ha generado un aporte significativo a las prácticas de innovación dentro de una agricultura sustentable, reduciendo el uso de productos de síntesis química, para el control de agentes patógenos en los cultivos (Ospina et al., 2011).

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, es un hongo fitopatógeno asociado a distintas enfermedades en varios cultivos de interés agrícola (Boland y Hall, 1994). Su fácil diseminación, se debe a las estructuras de resistencia denominadas esclerocios, las cuales caen al suelo por efecto del viento e incluso por labores de mecanización dentro del manejo del cultivo, donde consigue entrar en un periodo de latencia y una vez se halla en condiciones favorables, logra inocular el próximo huésped (Sepúlveda, 2015). Es así, como los mecanismos de control a los cuales se pueda recurrir, deben ser oportunos a fin de minimizar las pérdidas, evitando una mayor afectación, en la zona de cultivo.

El moho blanco se ha reportado en varios cultivos hortícolas como; papa, girasol, soya, canola, entre otros; (Steadman, 1979; Laemmlen, 2003; Koike y Davis, 2009), una vez se identifica los síntomas, se evidencian chancros o llagas en la base del tallo y marchitez en el tejido vegetal (Duncan, 2006). Este fitopatógeno es el agente causal de la enfermedad pudrición blanda, asociada a cultivos como lechuga y crisantemo (Valencia y Arbeláez, 1999).

Tomando en cuenta la problemática del cultivo de Lechuga (*Lactuca sativa* L.) se empleó aceite esencial de Naranja (*Citrus sinensis* L.) y Limón (*Citrus latifolia*), los cuales en la cascara de sus frutos presentan altas cantidades de monoterpenos, las cuales son moléculas representativas de los aceites esenciales en su mayoría (Alrededor de un 90%) (Koul *et al.*, 2008) y que son repelentes e inhibitorias de crecimiento para ciertas especies de plagas y patógenos en plantas, por sus propiedades físico-químicas como la lipofilicidad (afinidad con lípidos y grasas). Las sustancias lipofílicas al ser poco reactivas, se pueden disolver en las membranas celulares alterando sus características físicas (Romina *et al.*, 2013). El limón y la naranja además de esto son plantas reconocidas por el uso comercial de sus aceites para fines terapéuticos y cuyo pericarpio del fruto ha sido estudiado por la presencia de sustancias, con actividad antifúngica.

### 1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, ocasionan una baja en la producción agrícola, es decir, que a causa de estas se afecta el rendimiento en los cultivos. Específicamente los daños que causan patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, pueden llegar a ocasionar la necrosis del tejido y posterior muerte de la planta.

El Moho blanco es causado por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* o *Sclerotinia minor*, un patógeno asociado especialmente en cultivos hortícolas, entre los que se destaca el cultivo de lechuga, este último reporta pérdidas entre un 30% a 50% de pérdidas, según lo reportado por Arias y Tautiva (2007). Esto ha implicado la búsqueda de diferentes alternativas de control para *Sclerotinia sclerotiorum*, como lo son el tipo químico, físico, mecánico y biológico. Este último se caracteriza por antagonistas naturales (hongos y bacterias que son enemigos naturales, y efectúan un control sobre el crecimiento del organismo) de los cuales se reportan alrededor de 30 especies entre hongos y bacterias, para este patógeno (Adams y Ayers, 1979).

En el control biológico no solo se basa en uso de organismos vivos, a parte de estos también se emplean sustancias o extractos naturales, de los cuales se reporta más de 3000 compuestos naturales de origen vegetal que han sido usados para el manejo de diferentes patógenos, mediante un mecanismo que muestra una actividad bactericida, insecticida, nematocida y fungicida (Regnault, 2004; Obledo *et al.*, 2004; Kagale *et al.*, 2004). Dentro de estas sustancias los aceites esenciales (AE) tienen gran variedad de componentes, pero todos volátiles (se evaporan a temperatura ambiente) y actúan como defensas de las plantas contra

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

insectos, bacterias, hongos e incluso herbívoros (Domínguez, s.f.). Sin embargo el control de *Sclerotinia sclerotiorum*, con aceites esenciales de diferentes especies vegetales (*Syzygium aromaticum*, *Pelargonium graveolens*, *L. angustifolia*, *Cupressus sempervirens*, *M. piperita*, *Santolina chamaecyparissus*, *Citrus sinensis*, *Pogostemon patchouli*, *Thymus mastichina*, *Thymus vulgaris*, *Eucalyptus globulus* y *R. officinalis*), de los cuales las especies *Thymus mastichina* y *Eucalyptus globulus*, han sido una alternativa para su manejo, entre estos se conoce algunos aceites de cítricos como: *Citrus sinensis* (Naranja Dulce), con un porcentaje de inhibición del 78,2%, (Diánez, 2018); pero aun así la especie *Citrus latifolia* (Limón Taití), no es mencionada para su control, por lo cual esta investigación propuesta, parte de esta problemática para indicar si el uso de estos cítricos es viable para el control de este hongo patógeno.

## 1.2. ANTECEDENTES

A continuación, se indican algunas investigaciones donde se ha estudiado el control de *Sclerotinia sclerotiorum* en diferentes cultivos de importancia agrícola, que resaltan los factores que han permitido controlar este fitopatógeno.

Las alternativas de control frente a este y otro patógenos de importancia agrícola, se han orientado a mejorar la sostenibilidad de los sistemas productivos, con la implementación de productos biológicos dentro de los planes de manejo integrado. En un trabajo de campo, descriptivo y aplicativo realizado en plantas aromáticas para comercialización, mediante la “Evaluación de un extracto a base de tomillo (*Thymus vulgaris*) para control de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*”, por medio del método de dilución en agar se encontró un 74% de inhibición en el crecimiento de los tres hongos evaluados, con el uso del extracto acuoso a una concentración de 500 gr/L del material. Se resalta en el

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

estudio que el uso de este control es de uso preventivo y no curativo (Lizcano, 2014)

Como otra alternativa de control biológico para organismos patógenos, se ha empleado hongos antagónicos, ya que por su comportamiento natural inhiben el crecimiento de otros organismos, con base en ello en el trabajo de investigación “Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on lettuce: does the efficacy of protection depend on the cultivar and the strain of pathogen”, evaluó que efectos presentaba el control de *S. sclerotiorum* con *Coniothyrium minitans*, por el método de enfrentamiento. La investigación de tipo experimental, y evaluativa encontró que el control con *C. minitans* varía según el tipo de cepa de *S. sclerotiorum*, (Azis, 2015).

Dentro del manejo integrado para este patógeno, se busca emplear diferentes prácticas y así disminuir el uso de productos de síntesis química para evitar que el organismo genere resistencia. La evaluación de estos planes es importante para definir alternativas de control adecuadas, en relación a esto el trabajo de investigación “Caracterización, análisis espacial y manejo integrado del moho blanco (*S. minor* Jagger y *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary), en lechuga Batavia (*Lactuca sativa* L. var. capitata), en la vereda la moya (Cota-Cundinamarca)”, de tipo experimental, descriptivo en campo, tenía como finalidad identificar la distribución e incidencia en el campo de cultivo de la enfermedad moho blanco. Se encontró que dos extractos a base de ajo y manzanilla en condiciones de laboratorio al ser probadas en campo como práctica de manejo no ayudaron en el control a diferencia de la solarización como método de control mecánico, la cual disminuyó la formación de esclerocios, (Smit, 2007).

El control de *Sclerotinia sclerotiorum* es una de las labores que tiene prioridad dentro de los cultivos afectados por este patógeno, en el trabajo de investigación

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

“Estudio de la actividad antifúngica de aceites esenciales”, mediante el método dilución en agar se probaron cuatro concentraciones de los aceites esenciales a partir de *Cistus ladanifer* L., *Bupleurum gribaltarium* Lam. y *Pistacia terebinthus* L., en varios hongos fitopatógenos, entre los que se destaca *S. sclerotiorum*. En esta investigación de tipo experimental y evaluativa se encontró que en las medidas del halo de inhibición tomadas a los 2, 5 y 10 días de crecimiento presentó un porcentaje de inhibición del 84% y 89%, con el AE de *Bupleurum gribaltarium* Lam., en concentraciones de 100µl/L y 2000µl/L, respectivamente (Avila, 2016).

### **1.3. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad se cuentan con diferentes alternativas para el control de *Sclerotinia sp.*, e incluso algunas de estas buscan disminuir el impacto en el medio ambiente y la salud humana; lo que atañe a el manejo sostenible de los sistemas productivos.

Este fitopatógeno es el agente causal de varias enfermedades en cultivos de interés agrícola, entre estas se destaca el moho blanco que afecta el cultivo de lechuga, generando pérdidas económicas significativas entre el 80% y 100% (Falta CITA). Al ser un organismo polífago, indica que tiene un rango de hospederos amplio, que se estima es de 500 especies de plantas de 75 familias (Saharan y Mehta, 2008). Su patogenicidad se debe a que puede permanecer en el suelo por largos periodos, por medio de unas estructuras de resistencia denominadas esclerocios, a partir de las cuales genera micelio bajo las condiciones de un humedad y temperatura adecuadas, y así desarrollarse en el huésped.

Encontrando que esta enfermedad es de importancia dentro del cultivo de Lechuga (*Lactuca sativa* L.), lo que incide en la disminución de la productividad en

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

forma significativa, nos lleva a evaluar que es una problemática en los sistemas productivos que se dedican a producir esta hortaliza en nuestro país.

La necesidad de buscar alternativas que sean viables para los productores dentro del manejo integrado, nos da la pauta para evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de dos especies de cítricos, como lo son Naranja (*Citrus sinensis*) y Limón (*Citrus latifolia*), lo que representa un beneficio para la producción de este cultivo, al ser un método para el control del agente causal del moho blanco en el cultivo de Lechuga (*Lactuca sativa* L.), además de ser una contribución en el manejo sostenible de este fitopatógeno.

En este caso la importancia de esta investigación, va en busca de aportar a nuevas alternativas de control, que partan de productos biológicos para un beneficio económico dentro del cultivo, que genere un menor efecto negativo en el ambiente a diferencia de los productos de síntesis química.

**1.4. Formulación del problema:**

¿Tendrán acción antifúngica los aceites esenciales obtenidos de las especies *Citrus sinensis* L. y *Citrus latifolia*, para inhibir el crecimiento de *Sclerotinia* sp., agente causal del moho blanco en Lechuga?

**1.5. OBJETIVOS**

**1.5.1. Objetivo general:**

Evaluar *in vitro* la actividad de aceites esenciales de Limón (*Citrus latifolia*) y naranja (*Citrus sinensis*) sobre el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sp.*

**1.5.2. Objetivos específicos:**

Obtener aceites esenciales a partir de cascaras de limón y naranja, comparando su rendimiento mediante el método de destilación seleccionado

Identificar la técnica *in vitro* más apropiada para evaluación del efecto de los aceites esenciales de limón y naranja sobre *Sclerotinia sp.*

Evaluar la actividad de los aceites esenciales de limón y naranja a distintas concentraciones frente al hongo fitopatógeno de *Sclerotinia sp.*

### **2.1. Fungicidas Biológicos**

Los Fungicidas biológicos, son compuestos que se especializan en inhibir o controlar el desarrollo de los hongos (Martínez, 2012). Estos generalmente se derivan de organismos vivos como bacterias u hongos, que consiguen ser enemigos naturales de otros organismos, pero también pueden estar constituidos por una sustancia extraída (generalmente biomoléculas, que tienen alguna acción de interés) con función de controlar el desarrollo de otro organismo, y que al estar concentrada o diluida producida por algún organismo, se complementa o no con coadyuvantes necesarios (Liñan, 2015).

En la actualidad se producen en el mercado una gran variedad de productos a base de estos organismos, que pueden encontrarse en el suelo, o en la superficie de las plantas, de los cuales la gran mayoría están aprobados para su uso en la agricultura orgánica. Los modos de acción de los fungicidas biológicos, funcionan de forma diferente a los fungicidas sintéticos, algunos de estos mecanismos incluyen: Competencia, debido a que el agente de control biológico es más eficiente en obtener nutrientes y espacio que el patógeno, por lo tanto, es recomendable que este ya haya sido aplicado antes de la llegada del patógeno, (Liñan, 2015).

#### **2.1.1. Generalidades de los Aceites esenciales (AE)**

Los aceites esenciales (AE) son sustancias altamente volátiles que son sintetizadas en las plantas y almacenadas en distintas partes de estas, son generalmente volátiles a altas temperaturas (Martínez, 2011). Muchas especies de plantas producen aceites esenciales, que pueden llegar a ser usados para el control de hongos, debido a que éstos se integran por componentes que juegan un rol importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra el patógeno.

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

Se ha demostrado a través de investigaciones que estos aceites son inocuos para con el medio ambiente y tienen un efecto fungicida (Gogoi *et al.*, 1997; Pitarokili *et al.*, 1999; Mepagala *et al.*, 2002).

De acuerdo a estudios, se ha determinado que entre los componentes que mayor representación tienen en los frutos cítricos, se tiene el Limoneno, citral y linalool, (Moufida y Marzouk 2003), el limoneno como componente mayoritario que al ser un monoterpeno, se le asocia la función de inactivar la membrana citoplasmática lo que resultan en afectar la síntesis de proteínas intracelulares y extracelulares, encargadas de mediar distintos procesos en el funcionamiento de la célula (Cowan, 1999); en cuanto a los dos consiguientes, se han identificado por su actividad antimicrobiana (Caccioni *et al.*, 1998). Estos compuestos son reconocidos, en su mayoría por su acción antifúngica natural, por lo que logran inhibir a varios patógenos (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2008 y 2011).

## **2.2. Enfermedades causadas por hongos, cultivos hortícolas**

En el suelo habitan una gran diversidad de hongos, entre estos los patógenos de plantas o fitopatógeno como también se les conoce, estos actúan en el suelo o la rizosfera (Wainwright, 1988; Lodge, 1993), causando varias enfermedades, que afectan de forma significativa la productividad de los cultivos, al ser hospederos en plantas y atacar partes como el tallo, raíz, hojas e incluso el fruto.

Las enfermedades causadas por hongos, se basan en el triángulo de la enfermedad, el cual se compone del ambiente, el hospedero y el patógeno. El aspecto ambiente es el más complejo debido a que se puede manipular las condiciones de este para disminuir o mitigar los efectos de una enfermedad, que en este caso puede ser un patógeno que afecte a la raíz de la planta.

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

El riego juega un papel importante en la aparición de enfermedades, puesto que si no se tiene importancia en la cantidad de agua que se aplica puede generar problemas como *Pythium* y *Phytophthora* son mohos del agua y prefieren un sustrato húmedo. El riego en exceso genera el mejor ambiente para estos agentes patógenos y además estresa las raíces de las plantas, lo que las vuelve susceptibles su ataque. *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Thielaviopsis* también necesitan un medio húmedo, pero no necesariamente un sustrato húmedo para desarrollarse (Buechel, 2017).

El movimiento del aire también entra en juego debido si no hay circulación de este debajo de la parte foliar de la planta, aumenta la humedad en la zona cerca del cuello de la raíz y por lo tanto se disminuye el consumo de agua por parte de las raíces en el suelo, permaneciendo este húmedo por más tiempo, secándose lentamente, lo que facilita que haya exceso de agua y por lo tanto las plantas entran en un estado de estrés y son más susceptibles al ataque de patógenos.

Dentro de las enfermedades más comunes en los cultivos hortícolas se encuentran:

**Antracnosis:** Causada por el hongo *Colletotrichum corda*, el cual afecta principalmente la parte aérea de la planta mostrando manchas de color pardo oscuro que se convierten luego en lesiones cóncavas con una masa gelatinosa de color rojizo o salmón. Este patógeno ataca principalmente a cultivos tales como: Tomate, repollo, arveja, pepino, pimentón, etc.

**Alternaria:** Es una enfermedad que afecta las hojas, tallos, semillas, flores y bulbos de varias especies de hortalizas, que dentro de sus principales síntomas se encuentran la formación de anillos concéntricos de color púrpura, seguido de la

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

muerte del tejido, en el caso de lechuga se presentan puntos necróticos que al desarrollarse generan halos de color amarillo y en el bulbo de la cebolla se presenta pudrición del cuello de la raíz, que luego penetra en el bulbo. Esta enfermedad es causada por el hongo *Alternaria* Ness.

Damping off: Enfermedad conformada por un complejo de hongos que puede estar integrado por *Pythium nees*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium tode*. Esta enfermedad afecta durante la etapa de vivero y en el estado de plántula, causando el amarillamiento de las hojas, el doblamiento del tallo y la muerte de la planta en corto tiempo, esta enfermedad ataca también a una gran variedad de hortalizas tales como: citar el brócoli, la coliflor, la lechuga, la acelga, el calabacín, el apio, la cebolla, el cilantro y la espinaca.

Moho gris: Es una de las enfermedades de mayor ocurrencia en cultivos de hortalizas, causada por el hongo *Botrytis cinerea* Pers, causando el envejecimiento prematuro de los tejidos, formando una capa fructífera de moho color gris sobre el tejido afectado. Esta enfermedad ataca cultivos tales como brócoli, coliflor, lechuga, repollo, acelga, calabacín, apio, cebolla, arveja, pimentón, alcachofa y tomate de mesa, entre otros.

### **2.3. Control biológico con aceites esenciales de cítricos**

Muchas especies de plantas producen aceites esenciales los cuales juegan un rol importante como mecanismos de defensa de las plantas hospedadas contra agentes fitopatógenos como hongos (Mihaliak, *et al.*, 1991).

Los aceites esenciales se han convertido en una alternativa ideal para el cuidado del medio ambiente debido a su inocuidad, sin alterar la biodiversidad ni la salud

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

de los consumidores de los productos tratados. Además de presentar beneficios como el control de hongos en poscosecha y la reducción del uso de agroquímicos para el control de enfermedades provocadas por hongos. Varios autores han demostrado las propiedades antifúngicas que poseen los aceites esenciales (Muller-Riebau *et al.*, 1995, Wilson *et al.*, 1997, Daferera *et al.*, 2003). La actividad antifúngica en estos estudios estuvo fuertemente asociada con fenoles monoterpénicos, especialmente el timol, carvacrol y eugenol.

Los terpenos se denominan como compuestos químicos, los cuales se pueden encontrar en: hormonas, pigmentos o aceites esenciales extraídos de algunos cítricos (Quintana-Obregón *et al.*, 2017). Los aceites esenciales por lo general contienen sustancias denominadas monoterpenos, de estos los más comunes son limoneno y el mentol (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009). Donde se tiene presente que el limoneno es uno de los compuestos comunes en los aceites esenciales de cítricos.

Los aceites esenciales obtenidos a partir de cítricos son una importante alternativa que además de ser segura, se caracteriza por presentar una composición de tres fracciones, las cuales se conocen como: hidrocarburos terpénicos, compuestos oxigenados y compuestos no volátiles; la primera es la mayor proporción (Ong, 2012).

**2.3.1. Aceite esencial de Naranja (*Citrus sinensis*)**

El aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) en su composición presenta en mayor cantidad monoterpenos, de los que se destaca el limoneno (90%-96%), linalol (1%-2%) y cineol (1%), siendo este último el que se encuentra en menor proporción, (Guédez *et al.*, 2014).

### **Facultad de Ciencias Agropecuarias**

Estos componentes han funcionado por su actividad inhibitoria en el crecimiento de diferentes hongos poscosecha como: *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, (Caccioni *et al.*, 1998). En otro estudio inhibieron 100% del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium indicum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*, hongos patógenos del fruto de *Carica papaya* L., bajo las concentraciones 2.5% y 5% de AE de naranja. Lo cual favorece la conservación de frutos en etapa de poscosecha.

Como una alternativa en el manejo integrado de los cultivos, el uso de este aceite esencial ha permitido el control de hongos fitopatógenos como: *Fusarium oxysporum* causante de podredumbre interna del tallo (Alzate *et al.*, 2009), *Alternaria tenuissima* (Quintana-Obregón *et al.*, 2017).

#### **2.3.2. Aceite esencial de Limón (*Citrus latifolia*)**

Su aceite esencial se caracteriza por ser una sustancia volátil, soluble en alcohol o éter y poco soluble en agua, que además tiene como principal constituyente químico el limoneno que representa algo más del 60% (Cadena *et al.*, 2009). Este aceite al igual que el aceite esencial de naranja, presenta limoneno (46,3%, Estevam *et al.*, 2016), linalol (1,4 %) y cineol (0,8 %) aunque varía su proporción, (Kumar *et al.*, 1992; Vélez, 2016).

En lo que se ha investigado, los aceites de cítricos son generalmente empleados en etapas de poscosecha para conservación de los frutos, ya que estos están expuestos a agentes patógenos como hongos o bacterias. En un estudio se encontró que el aceite esencial de la especie *Citrus lemon*, mostro inhibición frente a *Aspergillus niger* (en concentración de 0,71% y 0,94%. Reduciendo el crecimiento en un 29,5%), *Aspergillus flavus* (en concentración de 0,71% y 0,94%), *Penicillium verrucosum* (en concentración de 0,47% y 0,71%. Reduciendo

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

el crecimiento en un 38,4% y 47,7%, respectivamente) y *Penicillium chrysogenum* (en concentración de 0,41%; 0,71% y 0,94%), (Viuda-Martos *et al*, 2008).

Estos resultados determinaron que las concentraciones, indican una actividad importante de este aceite a una baja concentración, siendo que esta no alcanza ni el 1%. La acción que estos cumplen se refiere a los compuestos fenólicos, que interactúan con la membrana celular, logrando inhibir el crecimiento celular (Knobloch, Pauli, Iberl, Wigand, & Weis, 1989; Sikkema de Bont, & Poolman, 1995).

#### **2.4. Generalidades del cultivo de lechuga**

El cultivo de lechuga es originario de la cuenca del Mediterráneo en la costa meridional, y algunos países de Asia central como la India. En Colombia es un cultivo que tiene no sólo una gran importancia estratégica dentro del sector rural, si no que ocupa un lugar destacado en el suministro urbano de alimentos. Dentro del grupo de hortalizas de hoja, la lechuga es la más importante en el país (Jaramillo, 1989). Gracias a su rápido ritmo de crecimiento, la producción de lechuga puede ser obtenida durante todo el año (Guenkov, 1974).

#### **Clasificación Taxonómica**

Reino: Plantae

División: Espermatofita

Clase: Angiosperma

Familia: Compositae (Asteraceae)

Género: *Lactuca*

Especie: *L. sativa*

La lechuga es una planta anual, dicotiledónea, perteneciente a la familia Compositae, que en su morfología cuenta con una raíz pivotante, corta que puede

### Facultad de Ciencias Agropecuarias

llegar a medir hasta 30 cm de profundidad, con pequeñas ramificaciones, (Granval & Graviola, 1991; Valadez, 1997; Alzate & Loaiza, 2008). Las hojas son de forma lanceolada, oblongas o redondas. Dependiendo de la variedad el borde puede ser ondulado, liso o lobulado de color verde amarillento, rojizo o púrpura, (Granval & Graviola, 1991; Valadez, 1997). El tallo es pequeño, corto, cilíndrico y no se ramifica cuando la planta está en estado óptimo de cosecha, luego de este periodo el tallo puede alcanzar una longitud de 1,2 metros y generar inflorescencias (Valadez, 1997).

#### 2.5. Principales enfermedades del cultivo de lechuga

Debido a las condiciones de humedad y precipitación del cultivo, la presencia de hongos es cada vez más frecuente, lo que genera enfermedades, que afectan principalmente las hojas como parte de la planta que se comercializa.

Entre las enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos, que afectan este cultivo específicamente en sus hojas, tallo y raíz, se encuentran: *Botrytis cinerea* (moho gris, pudrición basal), *Cercospora longissima* (Cercosporiosis), *Michodochium panattonianum* (Antracnosis de la lechuga), *Bremia lactucae* (Mildeo velloso), *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lactucae* (Sacc) (Marchitez vascular) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert.) de Bary o *Sclerotinia minor* Jagger (Pudrición blanda o moho blanco). (Álvarez *et al.*, 2016).

En condiciones de la sabana de Bogotá, se ha encontrado afectación principalmente por *Botrytis* sp. y *Sclerotinia* sp., donde *Lactuca sativa* var. Romana es afectada por esta última en un porcentaje de 86% y en *Lactuca sativa* var. Batavia en un 94%. Sumado a esta afectación, el exceso de humedad en el suelo, es un factor clave para el desarrollo de estos hongos (Piñeros, 2010), De estos el hongo *Sclerotinia* sp., es uno de los principales patógenos en el cultivo de lechuga.

### 2.5.1. Moho blanco por *Sclerotinia* sp.

Esta enfermedad se halla asociada a dos agentes causales, como lo son:  
*Sclerotinia*

*sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger (Steadman, 1979; Subbarao *et al.*, 1997; Subbarao, 1998). Donde básicamente la diferencia entre estas especies es en cuanto a características morfológicas, donde el primero presenta un tamaño de esclerocio más grande a diferencia del segundo. La presencia de los síntomas en las partes afectadas, son similares (Willestts y Wong, 1980) en relación a la observación del daño, esta se manifiesta en una podredumbre basal de la planta que termina muriéndose rápidamente, por lo que la planta se pierde totalmente pocos días antes de la cosecha.

Específicamente *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, se caracteriza por crecer saprofiticamente sobre la materia orgánica del suelo, es así cómo puede entrar en contacto con la planta para luego el micelio penetrar en el tejido y así establecer la infección, al igual puede ocurrir con las ascosporas, las cuales son las responsables de la reproducción sexual del hongo, y tienen como función germinar en condiciones ambientales ideales para desarrollo del hongo, las ascosporas son producidas por medio del apotecio, las cuales entran en contacto con las hojas, para luego generar la infección, (Sommer *et al*, 2011).

#### **Morfología:**

Particularmente *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, es un hongo Ascomycete, que pertenece a la familia Sclerotiniaceae, que causa daños severos a cultivos de importancia agrícola alrededor del mundo. (Duncan, 2003). Por medio de la formación de esclerocios como una estructura de resistencia, que se presenta de manera endurecida y de color negro, o forma apotecios de los cuales emergen ascosporas, que al ser dispersas pueden ocasionar infección en la parte aérea de

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

la planta. En laboratorio su aislamiento se facilita, se diferencia por escasa formación de micelio y reducida formación de esclerocios, los cuales presentan un tamaño de 2 a 10mm de diámetro, estos se forman a partir del micelio algodonoso, que se establece sobre las lesiones en el tejido (Pérez *et al.*, 2009).

De acuerdo a Bolton *et al.* (2006), *Sclerotinia sclerotiorum* se encuentra dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Subdivisión (Filum): Ascomycota

Clase: Discomycetes

Orden: Helotiales

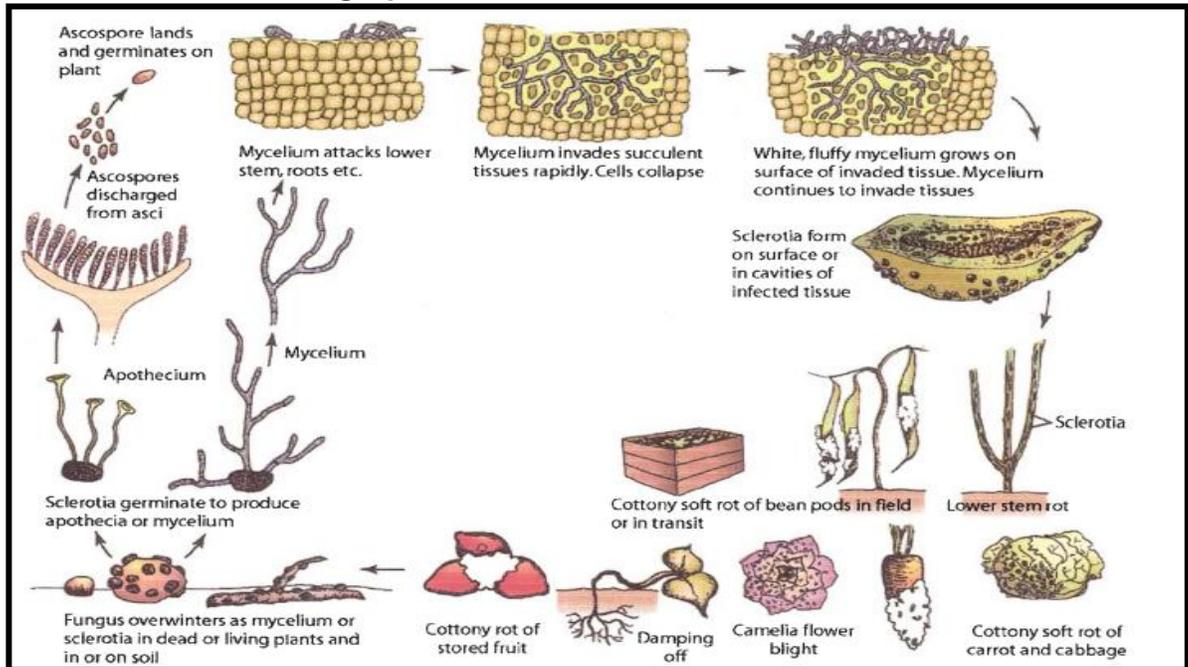
Familia: sclerotiniaceae

Género: *Sclerotinia*

Especie: *S. sclerotiorum*

**Epidemiología y ciclo de vida:**

Se caracteriza por presentar dos fases de crecimiento, que se describen a continuación: **Primera**, representada por formas de resistencia denominadas esclerocios, la cual corresponde al 90% del total, (Adams y Ayers, 1979), su desarrollo requiere de condiciones ambientales apropiadas, como alta humedad y precipitación (Ferreira y Boyle, 1992; y Laemmlen, 2003) y la **Segunda** esta se inicia cuando los esclerocios “germinan” formando micelio algodonoso poco frondoso y de color blanco, (Laemmlen, 2003; Koike y Davis, 2009, ver figura 1). Este patógeno tiene poca especificidad y un amplio rango de cultivos hospedantes, que incluye más de 400 especies de plantas principalmente dicotiledóneas (Boland y Hall, 1994).



**Figura 1:** Ciclo de infección de *S. sclerotiorum*, en cultivos hortícolas.

**Fuente:** (Agrios, 2005).

**Síntomas:**

Estos se asocian a una podredumbre en el cuello y hojas de madurez fisiológica, de acuerdo a los síntomas en plantas de lechuga generalmente se evidencia una marchitez de manera gradual en las hojas externas de la planta (Purdy, 1979; Abawi *et al.*, 1975; Subbarao *et al.*, 1997), a medida que este se extiende y coloniza mayor área de la misma, genera la aparición de unas lesiones de color café, El ciclo se completa en un periodo de 5 a 7 días, luego de afectar las hojas viejas, se llega a las hojas jóvenes (Kokie y Davis, 2012).



**Figura 2:** Presencia de micelio de *S. sclerotiorum*, sobre hoja de Lechuga.  
Fuente: (Delgado, 2017)

### 2.5.2. Mecanismos de control

En el manejo cultural, se sugiere debido a lo reportado en estudios, el uso de labranza mínima o cero, lo que puede restringir la habilidad de supervivencia con respecto al patógeno (Bailey y Lazarovits, 2003), lo que indica que al hacerse esta práctica se intensifique la actividad microbiana del suelo, que pueda ayudar a el control del microorganismo patogénico (Cook, 1990). Con el fin de mantener las condiciones no adecuadas para su desarrollo, el apropiado uso del riego es importante (minimizar condiciones de humedad), y la implementación de un arado profundo, dejando los esclerocios a mayor profundidad en el suelo, (Wu y Subbarao, 2003; Gulya *et al*, 1997; respectivamente), son prácticas que facilitan el control de este microorganismo.

Algunos grupos químicos de fungicidas, empleados para el control de *S. sclerotiorum* (Ss); dicarboxidas, benzimidazoles, (NCIPMC, 2006), este último grupo de fungicidas pertenecen al Grupo B1: donde se relacionan con inhibir la síntesis de ADN, (FRAC, 2018). Siendo el Carbendazim es un fungicida del grupo

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

de los benzimidazoles (0,1%) uno de los productos de síntesis química más común, su aplicación foliar se ajusta a los 65 días después de la siembra (65 dds), de acuerdo a lo reportado por (Ghasolia y Shivpuri, 2008). Entre otros ingredientes activos, empleados para el control de este patógeno en plantas se conoce el Iprodione, Vinclozolin, Procimidona y Benomil, que han mostrado control, al momento de ser aplicado alrededor de las plantas, (Avila y Velandia, 1992). Debido a la degradación de estos compuestos en el suelo se conoce que *S.sclerotiorum*, agente causal del moho blanco muestra resistencia.

En relación al control biológico, se han empleado antagonistas naturales varias especies de hongos del género *Thichoderma sp.*, al presentar un comportamiento de micoparasitismo, lo que indica que este logra alimentarse de *S. sclerotiorum* (Anas y Reeleder 1987; Kim y Knudsen 2008; Knudsen et al.1991), y *Coniothyrium Minitans*, que también actúa por relación de parasitismo (Elsheshtawi et al. 2017).

Sin embargo, el uso de productos químicos es cada vez más frecuente, generando impactos ambientales y sumado a esto la resistencia de los patógenos siendo una amenaza aún presente (Gossen et al, 2001, Wang et al, 2014), haciendo necesario la implementación de nuevas alternativas de control, que permitan rendimientos competitivos, manteniendo como prioridad la salud humana, vegetal y del suelo (Hariprasad y Niranjana, 2009).

Un producto fungicida con la capacidad de controlar *S. sclerotiorum*, es el ingrediente activo Benomyl, del grupo químico benzimidazoles, donde el modo de acción de estos componentes se basa en la inhibición de la mitosis, mediante la anulación de la formación de microtubulos en el citoplasma de la célula, impidiendo la división celular, creando un desorden citoplasmático de tipo general. El Benomyl es un producto sistémico, es decir es absorbido por las hojas y raíces, y cuando el hongo empieza a alimentarse de los fluidos de la planta es afectado,

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

este ingrediente activo actúa contra hongos patógenos del Phylum Ascomycetes y algunos Basidiomicetes, en diversos cultivos de hortalizas, cereales y frutales, en la etapa de poscosecha para el control de hongos en almacenamiento. (UNCR, 2006).

### **3.1. Enfoque:**

Es de carácter cuantitativo y cualitativo, en relación a que la recolección de datos numéricos mediante procedimiento estadístico. Se obtienen datos cuantificables, y los resultados no son afectados por el investigador. Las conclusiones derivadas contribuirán a la generación de nuevo conocimiento.

### **3.2. Tipo de investigación:**

Experimental: Al presentar un diseño experimental, busca analizar el efecto ocasionado por la manipulación de una o más variables independientes sobre otras dependientes.

### **3.3. Procedimiento y materiales:**

#### **3.3.1. Localización**

La etapa *in vitro* fue desarrollada en el laboratorio de la Línea de Biotecnología y Nanotecnología, el cual se halla ubicado en el Tecnoparque Nodo-Bogotá - SENA (Servicio Nacional de Aprendizaje).

El trabajo se ejecutó entre un periodo de año 2017 al 2018 y se llevó a cabo en las instalaciones del Tecnoparque Nodo-Bogotá. Teniendo en cuenta que el lote del cual fueron reservadas las muestras infectadas, se ubica en el Centro de Biotecnología Agropecuario - SENA, Kilometro 7 vía Mosquera, en la Unidad de Agricultura. En un área de 3000mts<sup>2</sup>, con aproximadamente 13.000 plantas sembradas, donde se identificaron síntomas de la enfermedad y signos del patógeno, teniendo en cuenta que el periodo de cosecha se había excedido.

#### 4.1. Métodos

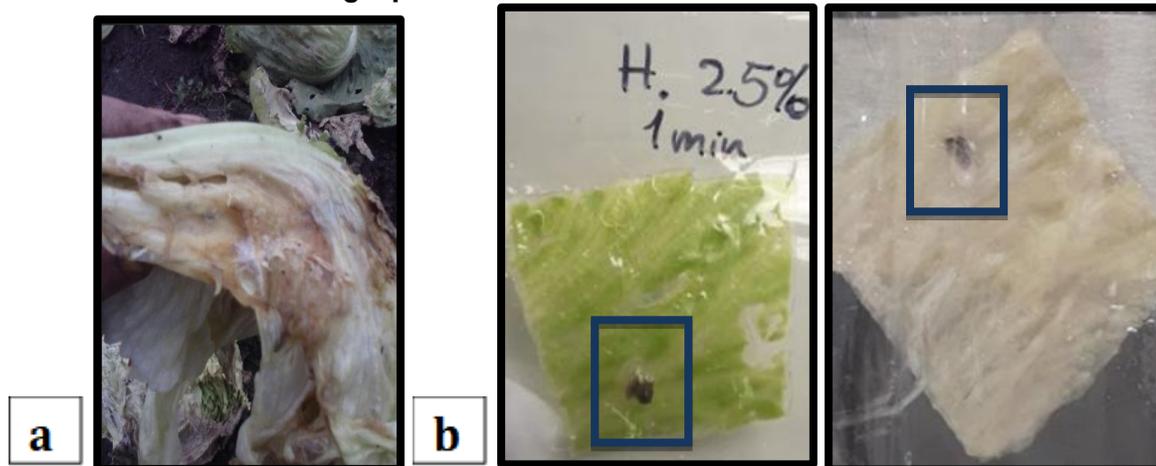
##### 4.1.1. Recolección de la muestra del material vegetal

Las muestras recolectadas de *Sclerotinia sp.*, se tomaron de un surco cultivado con Lechuga (*Lactuca sativa* L.) tipo Batavia var. Grandes lagos, (Figura 3-a) ubicada en la unidad de agricultura del Centro de Biotecnología Agropecuario (CBA), que pertenece al SENA – Seccional Cundinamarca. Para este procedimiento se procede a tomar muestra de varias hojas infectadas, que fueron reservadas en sobres de manila marcados con datos del predio, tipo de cultivo, ubicación y área de siembra, luego se almacenaron en bolsas herméticas para su transporte al laboratorio.

Seguidamente se realizó una identificación previa de la sintomatología en las plantas de acuerdo a lo indicado por Koike y Davis, (2009), para lo cual se realizó selección de hojas afectadas, de las cuales se tomó trozos de tejido que fueron dispuestos en cámara húmeda, para así visualizar el crecimiento del patógeno, (Figura 4-derecha).



**Figura 3:** (a) Zona de cultivo, delimitada para la toma de muestras, (b) Hojas de lechuga con signos del patógeno (*Sclerotinia sp.*), observándose la presencia de micelio tipo algodonoso. Fuente: Delgado, 2017.



**Figura 4:** (a) Hoja externa de lechuga, con síntoma de marchitez y signo que muestra la presencia de micelio algodonoso, (b) Cámara húmeda con presencia de *Sclerotinia sp.*, (recuadro azul), se observa color café en el tejido vegetal luego de 5 días. Fuente: Delgado, 2017.

#### 4.1.2. Aislamiento hongo fitopatígeno

Una vez seleccionadas las hojas de lechuga que presentaban síntomas característicos de la enfermedad, por la presencia del patógeno, se hicieron cortes con dimensiones de 1x1cm, que fueron sembrados en cajas de Petri con medio de cultivo agar PDA (Papa Dextrosa Agar), y finalmente ser llevados a Incubadora por un periodo de 7 días, a 25°C.

#### 4.1.3. Desinfección de esclerocios

Con base a la metodología reportada por Ouhaibi-Ben Abdeljali *et al*, (2016), los esclerocios aislados se desinfectaron con hipoclorito al 5% en un periodo de tiempo de 2min, luego fueron sumergidos en agua estéril por 1min y secados con papel filtro estéril, para posteriormente ser sembrados en cajas de Petri con medio

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

de cultivo agar PDA acidulado, previamente preparado y ser llevados a incubadora por un periodo de 7 días a una temperatura de 25°C.

Luego de la desinfección se realizaron siembras sucesivas, con el uso de un asa micológica se dispuso en placas de Petri con medio de cultivo los esclerocios y micelio formados. Una vez terminado el proceso se debe manejar un cierre de tipo hermético en la caja, para evitar la contaminación.

#### **4.1.4. Extracción del aceite**

Generalmente en el caso de la obtención de aceites derivados de cítricos pueden ser extraídos mediante prensado en frío, hidrodilación, fluidos supercríticos e hidrodifusión con microondas y gravedad, entre otros.

En la obtención de aceites esenciales a partir de cítricos se usan métodos directos de extracción, ya que están presentes en la corteza del fruto. El aceite de los cítricos está contenido en numerosas celdas del epicarpio, y así al momento de ejercer una presión externa estas celdas se rompen y liberan el aceite, el cual se obtiene y recolecta de inmediato antes de que sea nuevamente absorbido por la corteza esponjosa que resulta después de este tipo de procesos de extracción (SENA, 2009). Generalmente en el proceso de extracción ocurren varias etapas:

- ❖ Corte transversal de la epidermis y de las celdas que contienen la esencia.
- ❖ Se presenta una presión mayor que las zonas de alrededor a través de las cuales el aceite fluye al exterior.
- ❖ Fricción en la cáscara, con la formación de pequeñas fisuras.

Los métodos de extracción que han sido más empleados son de tipo directo (compresión de la cascara) e indirecto (arrastre de vapor y hidrodilación

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

asistida por microondas); de igual manera estos métodos han facilitado la extracción de los aceites, (Kingston y Jassie, 1988).

El método de **Comprensión o prensado**, se basa en la presión ejercida por rodillos que buscan extraer por mecanismo de esta fuerza el aceite contenido en el epicarpio de la cascara, aunque su rendimiento no es el más óptimo, a diferencia de otros métodos el extracto no queda con solventes o alguna otra sustancia, (Cerutti Y Neumayer, 2004).

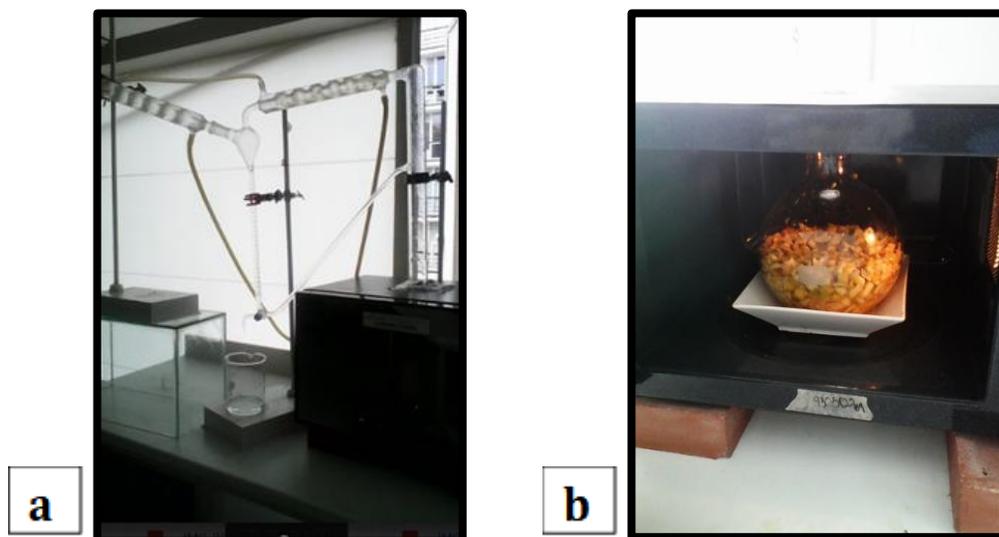
El método por **arrastre de vapor**, se caracteriza por el manejo de la mezcla de dos líquidos inmiscibles, que se someten a un proceso de vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua. Durante el proceso una vez, se libera el vapor de agua, que luego pasa por un recipiente cerrado donde se encuentra el material a destilar ya cortado en trozos de corta medida. Es así como la esencia por es arrastrada por el vapor, posteriormente condensada para ser recolectada y separada de la fase acuosa, (Bandoni, 2000).

El método de **Hidrodestilación asistida por microondas (HDMO)**, en esta técnica por efecto de la radiación se calienta el agua hasta punto de ebullición, de tal manera que vapor obtenido ocasiona rompimiento de las estructuras que contienen el aceite, y una vez este es liberado es arrastrado por el vapor, para luego condensarse y quedar de nuevo en estado líquido, donde ambos son separados por diferencia de densidades, (Kingston y Jassie, 1988 y Bandoni, 2000).

#### 4.1.4.1. Obtención de aceite, por hidrodestilación

Por medio de la recepción del pericarpio del fruto de naranja y limón en establecimientos donde son obtenidos como residuos orgánicos, se procede a realizar la separación de la pulpa y la cascara del fruto.

La extracción se hizo a partir de muestras de 500gr de material fresco (cascara o pericarpio del fruto), previamente cortado con dimensiones aproximadamente de 1cm x 1cm, se adiciono esta cantidad a un balón esmerilado de 2000ml empleando un volumen de 500ml de agua destilada, luego se sometieron durante 40min a proceso de destilación por el método de **Hidrodestilación asistida por microondas (HDMO)**,



**Figura 5:** (a) proceso de Hidrodestilación asistida por microondas, (b) balón esmerilado con parte de material y agua en igual proporción.

En el proceso de extracción, se calculó el rendimiento obtenido, mediante la siguiente formula (Ecu. 1):

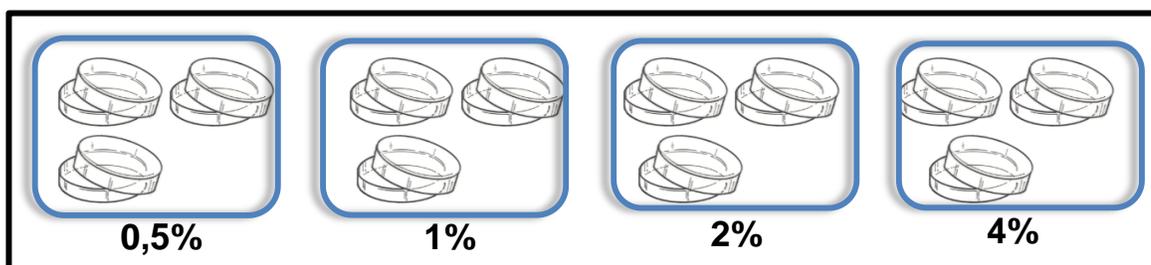
$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad de aceite obtenido}}{\text{Cantidad de material vegetal empleado}} * 100$$

### Facultad de Ciencias Agropecuarias

Después de la extracción se empleó sulfato de sodio anhidrido para remover el agua, en una cantidad de 0,1gr. Los aceites de limón y naranja fueron almacenados en viales oscuros y refrigerados hasta su uso.

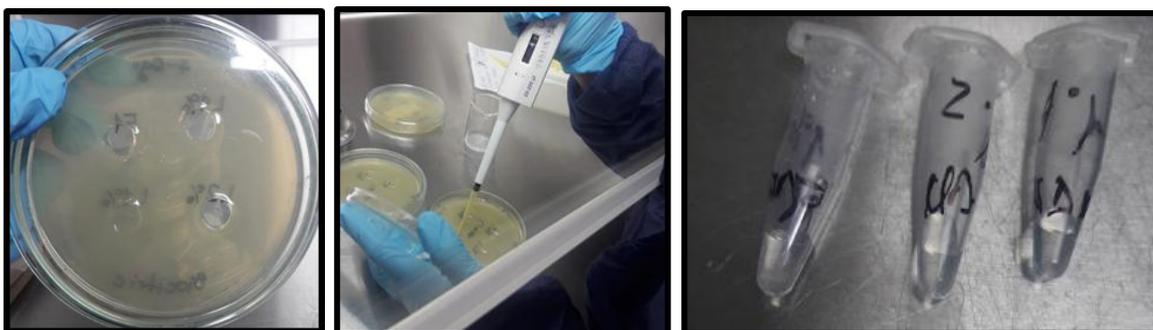
#### 4.1.5. Evaluación de la inhibición del crecimiento de micelio

Inicialmente se determinó las concentraciones que muestran una inhibición positiva del hongo fitopatógeno, para lo cual se establecieron tres rangos de estas, primero (50%-25%-15%-10%), segundo (15%-10%-5%-0%) y tercero (4%-2%-1%-0,5%, ver Figura 5); manejando tres repeticiones por cada concentración, más un control negativo (cuadro de agar con micelio del hongo sin ninguna concentración de aceite) y un blanco (únicamente medio de cultivo).



**Figura 6:** Esquema con las cuatro concentraciones definidas para el tercer rango de concentraciones, del diseño experimental.

Para determinar la dosis mínima efectiva (DE) y medir el halo de inhibición, se empleó el método por difusión en agar modificado reportado por (Fraternal *et al*, 2003; Alzate *et al*, 2009), con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar, acidulado con ácido láctico), con pH5 y temperatura de 22 °C. Se adiciono en frascos estériles, el volumen del soluto (aceite esencial) y solvente (Agar PDA, acidulado) previamente medidos. Para lo cual se tenía como volumen total de la solución 15ml, de los cuales 0,075ml fueron aceite y 14,925ml fueron agar, esto en el caso de la concentración de 0,5%. Posteriormente en placas de Petri se adiciono un volumen de 5ml del medio del cultivo.



**Figura 7:** Técnica de pozos, para la prueba de inhibición del crecimiento radial, según cada concentración. (a) Caja de Petri, con pozos, (b) Adición de la concentración en los pozos y (c) tubos ependorff con las concentraciones.

Para determinar el **porcentaje de inhibición (%I)**, se empleó la técnica de pozos (Figura 7) en base a lo reportado por Cano *et al* (2008), la cual permite confrontar un fragmento del hongo, con la concentración del aceite a evaluar, en este caso AEN y AEL. En placas de Petri con un volumen de 5ml, se adiciona una capa delgada de agar Mueller Hintong Modificado (tiene como Agar base PDA), se dispone un pitillo de 11mm de diámetro y 0,6mm de alto para diseñar el pozo y seguidamente se hace una segunda capa del medio; una vez gelifica el agar se retira el pitillo, dejando allí el molde para adicionar la concentración de aceite a evaluar.

Luego se adiciona en el pozo un volumen de 25ul por cada concentración (4%-2%-1%-0,5%), contenida en tubos ependorff previamente estériles, la cantidad en microlitros ( $\mu$ l) de AE en solución con DMSO (Dimetilsulóxido al 99%, como solvente), hasta completar el volumen total de **1ml** de los dos aceites evaluados por duplicado respecto a cada concentración, se adiciona una caja como control positivo con fungicida comercial Benomyl (Ingrediente activo, 0,5 g/L) a una concentración de 0,012gr/ml, comparado con un testigo (sin concentración),

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

haciendo seguimiento por un periodo de 7 días, para hacer las mediciones del halo de inhibición, mediante la siguiente formula (Ecu. 2, Patiño *et al.*, 2001):

$$\%IMC = \frac{CML - CMI}{CML} * 100$$

Donde **%IM**: porcentaje de inhibición del crecimiento radial, **CML**: Crecimiento radial libre, **CMI**: crecimiento radial influenciado.

En total se establecieron cuatro ensayos, los cuales se distribuyeron en: (1) AEN-micelio, (2) AEN-esclerocio, (3) AEL-micelio, y (4) AEL- esclerocio; donde para cada uno se indicaron tres concentraciones diferentes (0,5%, 1% y 2%) junto a un control positivo con el fungicida químico Benomyl. La evaluación de la inhibición del crecimiento radial, tuvo como finalidad verificar el efecto fungistático de los aceites esenciales, sobre el hongo evaluado (Tabla 1).

**Tabla 1:** Aceites esenciales evaluados sobre *S. sclerotiorum*, a diferentes concentraciones.

Controlador	Principio activo	Concentración (Dosis)		
		C1	C2	C3
AEN	Limoneno	0,5%	1%	2%
AEL	Limoneno	0,5%	1%	2%
Benomyl 50 WP	benomil	0,005gr/10ml (0,0005gr/ml)		

**Fuente:** Propia de Autor, 2018

**4.1.6. Análisis estadístico**

Se realizó la toma de datos con un pie de rey, para cada uno de los cuatro ensayos establecidos, realizando la toma de datos por separado para el

---

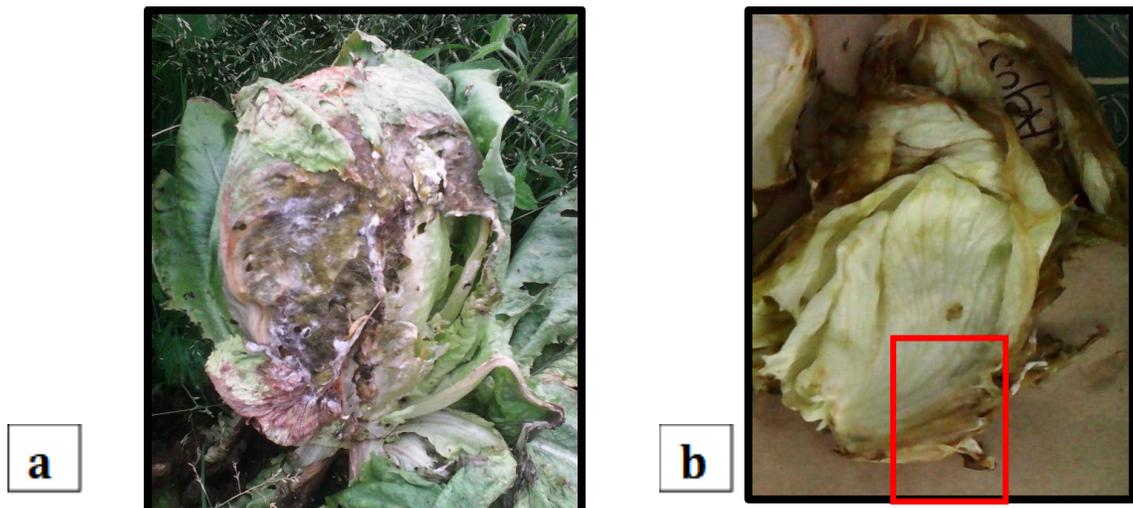
**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

crecimiento de esclerocio y el de micelio, con respecto a las diferentes concentraciones de los aceites. En total se obtuvieron **cuatro** graficas (AE Limón, esclerocio y micelio, de igual manera para AE de naranja).

En el análisis ANOVA, se definió que el Promedio del crecimiento es la variable dependiente (eje Y) y la concentración es la variable independiente (eje X), empleando un rango de confianza del 95%. Con un  $\alpha=0,05$  para la prueba de Tukey, para lo que se empleó el programa InfoStat.

### 5.1. Aislamiento e identificación del hongo fitopatogeno

Se determinó mediante la sintomatología observada en campo en plantas de lechuga, que el agente causal de la enfermedad fue *Sclerotinia sclerotiorum*, identificando los siguientes síntomas: un color café y pudrición en la base de las hojas (Figura 8). Como signo del patógeno se observó la presencia de un micelio blanco y formación de esclerocios de aproximadamente 2mm de diámetro en el envés de las hojas más externas. Estos síntomas concuerdan con lo reportado por (Smith, 2007 y Pérez *et al*, 2009), además de indicar que la infección afecta plantas generalmente en la etapa cercana o en la madurez, formando un micelio blanco y posteriormente esclerocios.



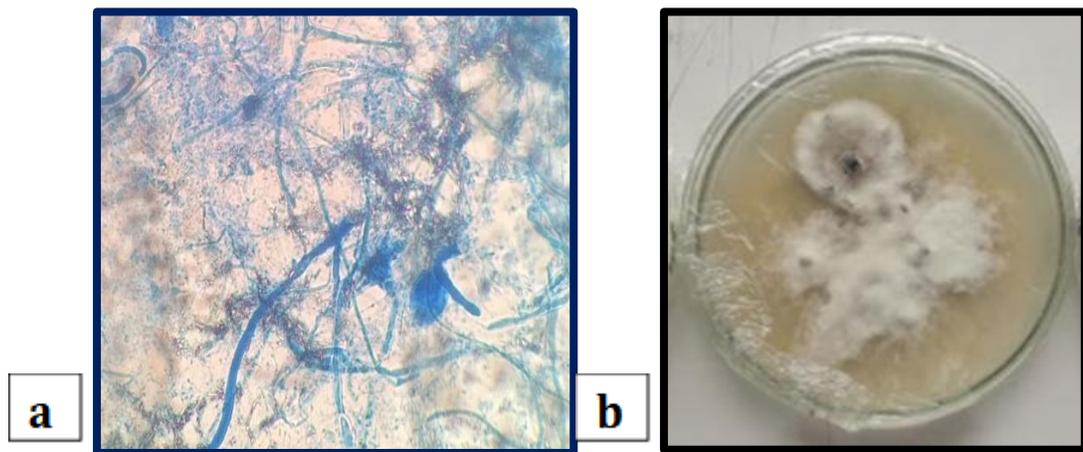
**Figura 8:** (izquierda) Visualización en campo, planta de lechuga con presencia de esclerocios, (derecha) Hoja con presencia de micelio (recuadro rojo) en un extremo de la hoja. Fuente: Delgado, 2017.

De acuerdo al desarrollo de la infección, Inicialmente las hojas menos jóvenes se marchitan y caen (Abawi *et al*, 1979; Subbarao *et al*, 1997), luego en hojas más jóvenes se presentan lesiones de color café pálido en la zona afectada (Koike y

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

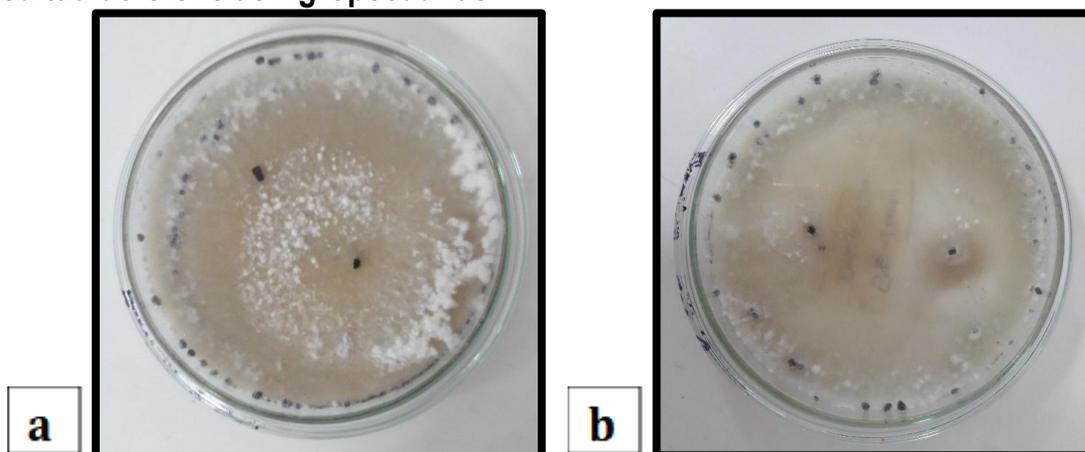
Davis, 2009), finalmente se presenta un aspecto de una masa viscosa en la zona donde se aloja el hongo, con presencia de unas estructuras denominadas esclerocios, por las cuales este consigue inocular más área del hospedero (Ávila de Moreno *et al*, 1992), esto con base en la macroscopia del hongo, lo que conlleva a diferenciar los síntomas en campo.

En relación a la microscopia, se evidencio hifas septadas e hialinas (Figura 9), lo que indica que no presentan color, esta característica es propia del género *Sclerotinia sp.*, por lo que no es confiable para la descripción de este hongo (Willets y Wong, 1980). Lo que en este caso permite asegurar de qué tipo de hongo se trata, son la presencia de esclerocios, encontrados además de su patrón de crecimiento.



**Figura 9:** (a) Vista de las hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* a 40x. (b) cepa de *S. sclerotiorum*, de donde se realizó la lámina.

Durante el proceso de purificación de la cepa, el hongo presento contaminación con otros hongos no identificados, por lo cual se empleó un protocolo de desinfección con hipoclorito al 5% y 2,5% por 2min, cuyas concentraciones permitieron un crecimiento óptimo del hongo (Figura 10).



**Figura 10:** (a) Crecimiento de *S. sclerotiorum*, desinfección de esclerocios 2,5% por 2min, (b) Crecimiento de *S. sclerotiorum*, desinfección de esclerocios 5% por 2min. Fuente: Delgado, 2017.

## 5.2. Extracción de aceites

Se obtuvo que en una relación de 500gr de cascara, se obtenía 1,6ml a 2,2ml de aceite esencial en el caso de naranja, y de 0,6ml a 1ml en el caso de limón, lo que se respalda con un rendimiento del 0,38% AEN y del 016% AEL. La eficiencia en el método de extracción empleado, fue dependiente del tamaño del corte de la cascara, indicando que a un menor tamaño se facilitaba la obtención del aceite.

En cuanto a la composición química, se obtuvo por un estudio de cromatografía de gases los siguientes compuestos (Tabla 2).

**Tabla 2:** Composición química de los aceites esenciales de Naranja y Limón.

Aceite esencial ( <i>Citrus sinensis</i> )	Aceite esencial ( <i>Citrus latifolia</i> )	Porcentaje presente, de acuerdo a la literatura
D – Limonene	(E) – Limonene oxide	43,6% (Estevam <i>et al.</i> , 2016)
Geraniol	Geraniol	1,4%, (Kumar <i>et al.</i> , 1992; Vélez, 2016).
4 – Terpeneal	L – alpha – Terpeneal	0,8%, (Kumar <i>et al.</i> , 1992; Vélez, 2016).

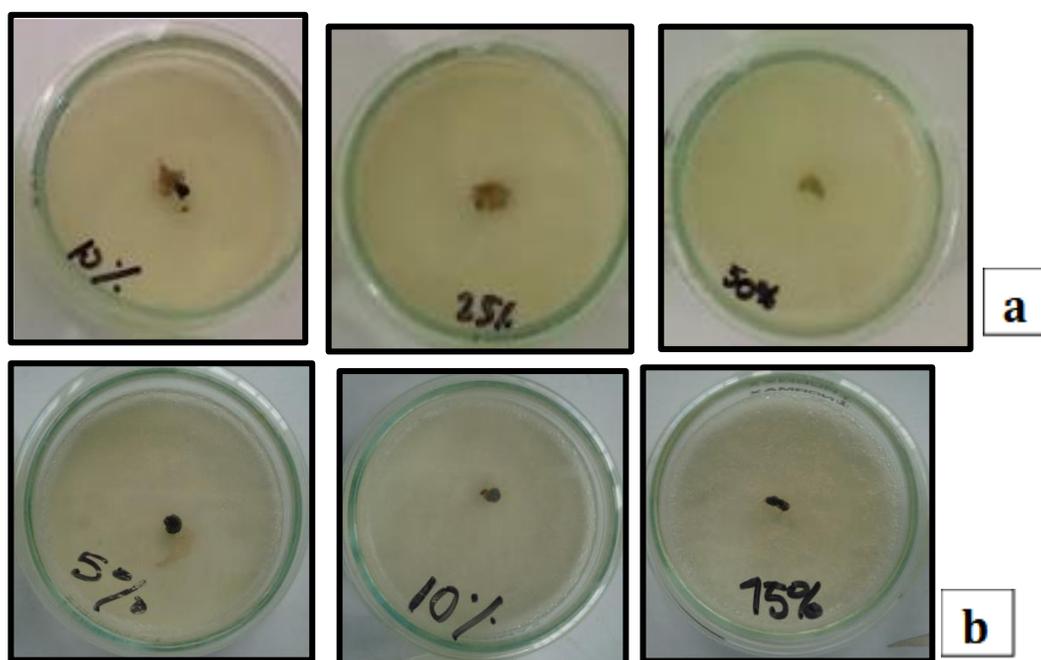
**Fuente:** Propia Autor, 2018.

### 5.3. Pruebas *in vitro*

#### 5.3.1. Pruebas preliminares de Inhibición del crecimiento radial

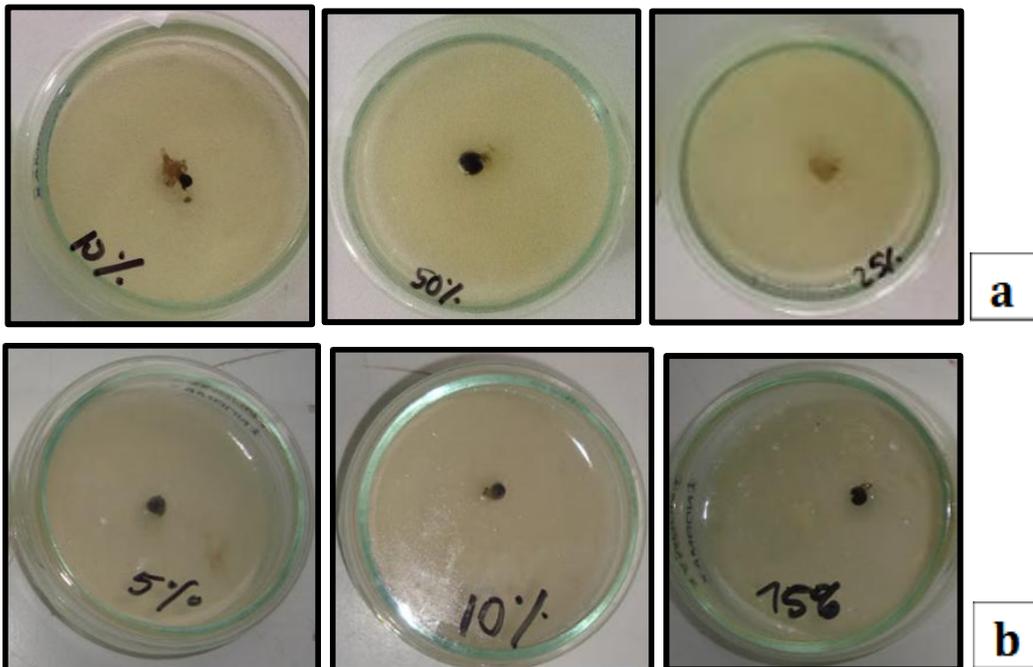
Las alternativas en el manejo y control del fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, ha llevado a que el uso de sustancias naturales sea cada vez más recurrente, identificando entre estas el aceite esencial, que en el caso de los cítricos las concentraciones generalmente evaluadas son bajas al ser menores a 500ppm (lo que equivale a 500mg/L), (Martínez, 2012).

Con base en lo anterior el primer rango (0%, 10%, 25% y 50%, figura 9) y el segundo rango de concentraciones (0%, 5%, 10% y 15%, ver figura 10), no se midió crecimiento radial del hongo, ya que con las concentraciones mínimas de 10% y de 5%, inhibieron el crecimiento del micelio en un 100% bajo condiciones de laboratorio, siendo un indicador de que las concentraciones mínimas para el control del hongo, son inferiores al 5%.





**Figura 11:** Ensayo preliminar por técnica de difusión en agar del AEN-Esclerocio en concentraciones (a) de 10%, 25% y 50%. (b) de 5%, 10% y 15% y (c) de 4%, 2% y 1%, donde esta última evidencia crecimiento del hongo entre el 6 y 7 día, las demás concentraciones no mostraron crecimiento al 5 y 7 día del ensayo.





**Figura 12:** Ensayo preliminar por técnica de difusión en agar del AEL-Esclerocio en concentraciones (a) de 10%, 25% y 50%. (b) de 5%, 10% y 15% y (c) de 4%, 2% y 1%, donde esta última evidencia crecimiento del hongo entre el 6 y 7 día, las demás concentraciones no mostraron crecimiento al 5 y 7 día del ensayo.

Partiendo de lo anterior, se definió un tercer rango de concentraciones (0% 0,5%, 1%, 2% y 4%), donde la menor concentración mostro crecimiento positivo del hongo, y la mayor concentración inhibió por completo el crecimiento del hongo. Partiendo de estos resultados se derivaron solo las concentraciones de 0,5%, 1% y 2%. Se empleó la técnica de pozos, para evaluar cada concentración frente al crecimiento radial del hongo.

#### 5.4. Efecto del AEN y AEL, en la inhibición del crecimiento de micelio

La finalidad de la evaluación, fue determinar las concentraciones optimas de los aceites esenciales (AEN y AEL) para el control de *Sclerotinia sclerotiorum*, indicando si hay o no un efecto de inhibición de su crecimiento, tanto por micelio como por esclerocio. En base a cada uno de ellos, se determinó el porcentaje de efectividad con respecto a las concentraciones de 1% y el fungicida (FBy) como control positivo.

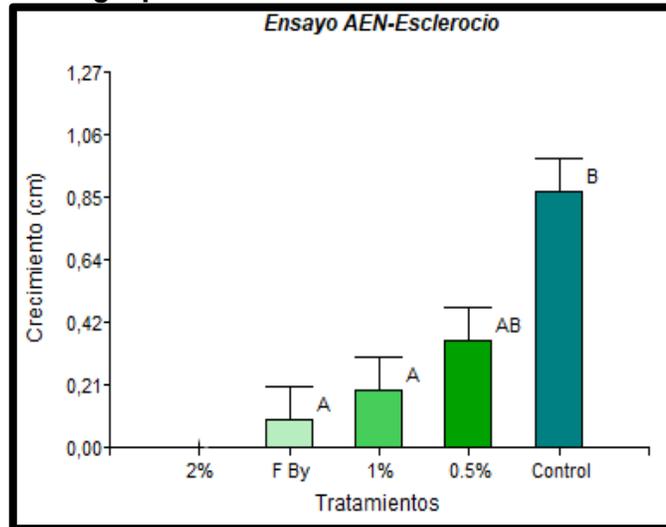
**Tabla 3:** Porcentajes de efectividad, para el control de *S. sclerotiorum*.

<b>ENSAYO DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA (AEN) - Esclerocio</b>			
Concentración de 1%, respecto a la de 0,5%	46,54%	Concentración de FBy, respecto a la de 0,5%	74,19%
<b>ENSAYO DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA (AEN) - Micelio</b>			
Concentración de 1%, respecto a la de 0,5%	65,1%	Concentración de FBy, respecto a la de 0,5%	100%
<b>ENSAYO DE ACEITE ESENCIAL DE LIMON (AEL) - Esclerocio</b>			
Concentración de 1%, respecto a la de 0,5%	89,32%	Concentración de FBy, respecto a la de 0,5%	72,33%
<b>ENSAYO DE ACEITE ESENCIAL DE LIMON (AEL) - Micelio</b>			
Concentración de 1%, respecto a la de 0,5%	62,90%	Concentración de FBy, respecto a la de 0,5%	100%

Fuente; Propia Autor, 2018.

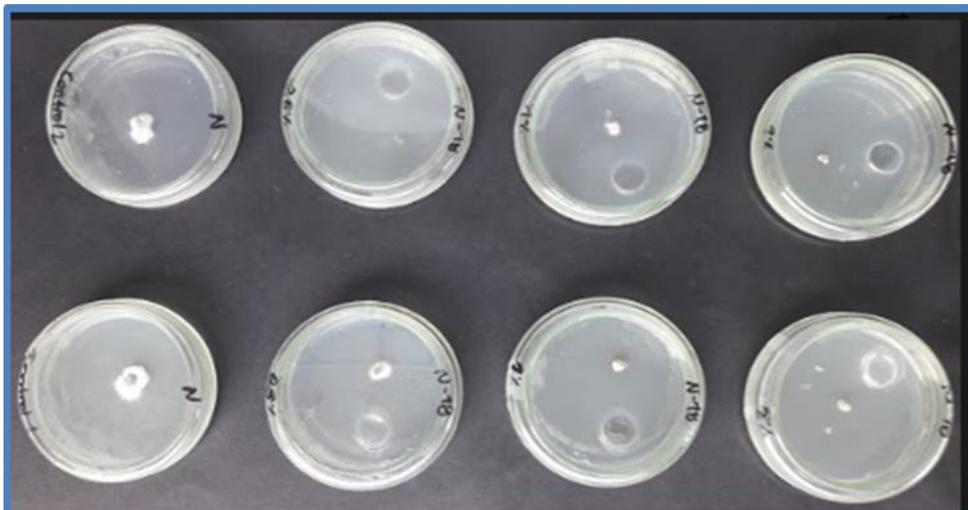
**ENSAYO DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA (*Citrus sinensis* L.) - AEN**  
(Esclerocio)

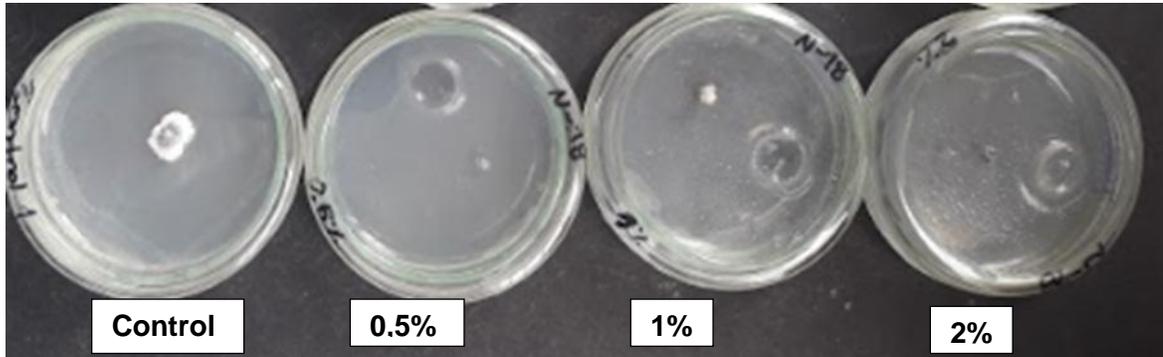
En este ensayo, no se identificó formación de esclerocios, y para cada concentración se obtuvo un dato de crecimiento de la siguiente manera: con la concentración de 0,5% se obtuvo 0,36cm, la de 1% es 0,19cm, la de 2% es 0cm, con respecto al control que fue de 0,86cm (Ver Grafica 1). Lo cual evidencia que la concentración de 1% es 46,54% más efectivo que la concentración de 0,5%, y el fungicida (FBy, i.a. benomil) es más efectivo en un 51,72% respecto a 1% y 74,19% respecto al 5% (tabla 3), frente a inhibir el crecimiento de *S. sclerotiorum*.



**Grafica 1:** Promedio de crecimiento (cm) de *S. sclerotiorum*. Por técnica de pozos con AEN a diferente concentración evaluada (2%, 1% y 0,5%), en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).

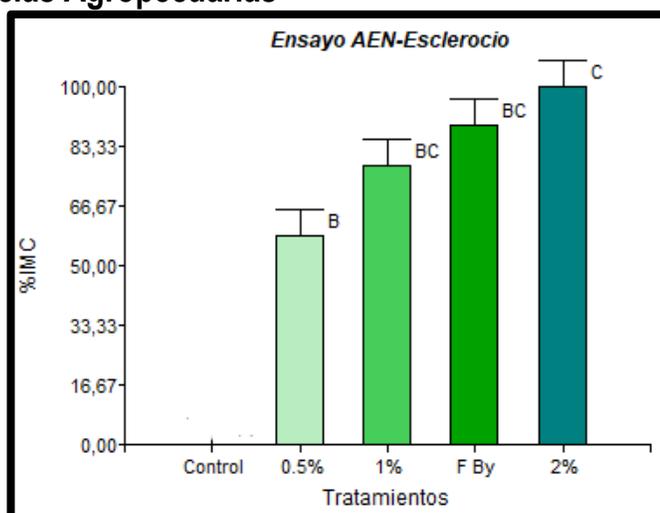
**Figura 13:** Ensayo de AEN por esclerocio, en las concentraciones de 0,5%, 1% y 2%.





**Figura 14:** Crecimiento de *S. sclerotiorum*., a partir de esclerocio, para el 7mo día de ensayo con las concentraciones de AEN.

Con respecto a la inhibición de crecimiento radial, la concentración de 2% inhibió por completo (%IMC=100%). Se encontró de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p > 0.05$  y un nivel de confianza del 95%), que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de 1% y el fungicida (FBy, i.a: benomil), ya que como se evidencia presenta igual letra (Grafica 2), con porcentajes de inhibición del 77,73% y 89,2%, respectivamente, en comparación con la concentración más baja 0,5%, la cual mostro una inhibición de 58,33%, por lo que no sería apropiada para el control del hongo, al ser menos efectiva que el producto químico y las concentraciones de 1% y 2%.

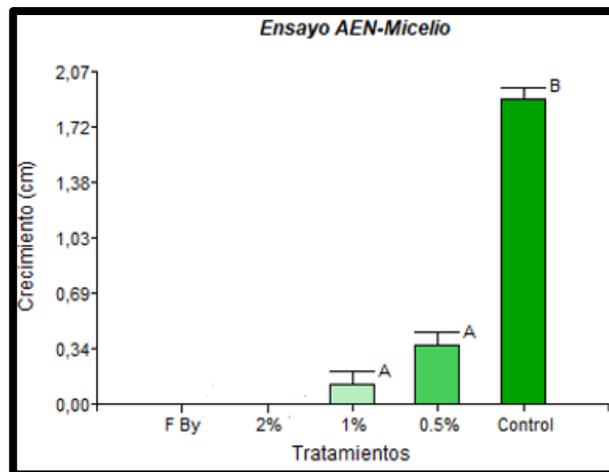


**Grafica 2:** Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (%IMC) de *S. sclerotiorum*, con respecto a cada concentración evaluada, en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).

Se conoce que el aceite esencial de la especie *Citrus sinensis*, se ha comprobado su efectividad en la inhibición del crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos. En un estudio se reportó que el AE de naranja (*Citrus sinensis* L.), controla las especies de hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium indicum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*, asociados a frutos de (*Carica papaya* L.) en etapa de poscosecha, en el caso de concentraciones más bajas como la de 1%, no hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), a diferencia de las concentraciones de 2,5% y 5% con un porcentaje de inhibición (%I) del 100%. (Guédez et al., 2014). Lo que, en comparación con nuestro estudio, se obtuvo que la concentración de 2% fue la que inhibió el crecimiento en un 100%, con respecto a las demás concentraciones.

(Micelio)

En este ensayo para cada concentración se obtuvo un dato de crecimiento de la siguiente manera: con la concentración de 0,5% se obtuvo 0,362cm, la de 1% es 0,13cm, la de 2% es 0cm, con respecto al control que fue de 1,89cm (Grafica 3). Lo cual evidencia que la concentración de 1% es 65,16% más efectivo que la concentración de 0,5%, y el fungicida (FBy, i.a. benomil) es más efectivo con respecto a el 1% y el 0, 5% (tabla 3). Es así que la concentración de 2% y el fungicida inhibieron en un 100%r el crecimiento de *S. sclerotiorum*.



**Grafica 3:** Promedio de crecimiento (cm) de *S. sclerotiorum*. Por técnica de pozos con AEN a diferente concentración evaluada (2%, 1% y 0,5%), en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).



**Figura 15:** Ensayo de AEN por micelio, en las concentraciones de 0,5%, 1% y 2%.



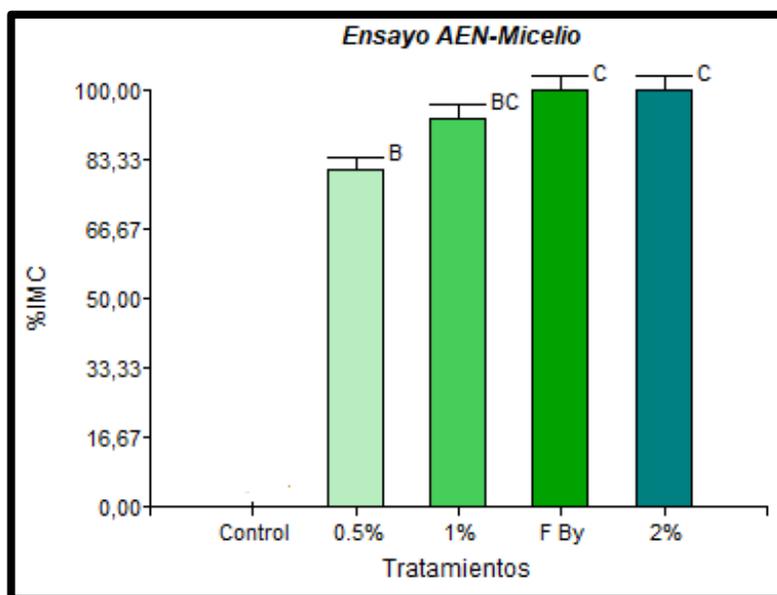
**Figura 16:** Crecimiento de *S. sclerotiorum*., a partir de esclerocio, para el 7mo día de ensayo con las concentraciones de AEN.

Con respecto a la inhibición de crecimiento radial, la concentración de 2% inhibió por completo (%IMC=100%), por lo que no se evidenció formación de micelio. Se encontró de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p > 0.05$  y un nivel de confianza del 95%), que no hay diferencia significativa entre la concentración 2% y el fungicida (FBy, i.a: benomil), con porcentajes de inhibición del 100%, respectivamente, es

### Facultad de Ciencias Agropecuarias

decir que de acuerdo a este resultado ambas son adecuada para el control de *S. sclerotiorum*, en condiciones de laboratorio, lo que en comparación con la concentración más baja 0,5% con un %IMC de 80%, por lo que la aplicación de esta no sería apropiada para el control del hongo, ya que el fungicida químico presento un mejor control del hongo, con respecto a esta concentración (tabla 3).

En un estudio reportado por Al-Taisan *et al.*, (2014), se logró un inhibir en un 100% el crecimiento radial y formación de micelio de *S. sclerotiorum*, con los AE's de menta (*Mentha spp*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*), en concentraciones de 10ppm y 100ppm. Lo que indica que el efecto de estos aceites es efectivo al 1% de concentración, que en comparación a este estudio el AEN, controlo a *S. sclerotiorun* a una concentración de 2%, aunque la diferencia es una unidad de porcentaje, se indica que los resultados de esta investigación, lo muestran como una alternativa de control, frente a este patógeno.



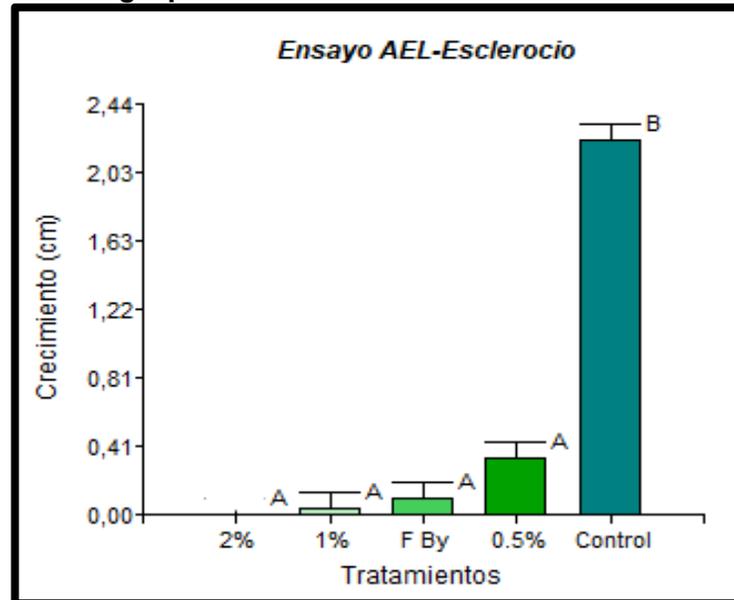
**Grafica 4:** Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (%IMC) de *S. sclerotiorum*, con respecto a cada concentración evaluada, en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).

En los dos ensayos del AEN, se identificó que la concentración de 2% inhibió en un 100% tanto la formación de esclerocio y micelio, lo que se respalda con los resultados encontrados por Gómez, (2014), donde en su estudio indicaron que las concentraciones de 2% y 4% mostraron actividad antifúngica, a excepción *Fusarium semitectum* que mostro crecimiento de 0,4cm y 0,15cm respectivamente, y que en comparación de la concentración más elevada de 8% que ellos evaluaron, fue la que presento el mayor control, que en diferencia con el presente estudio la concentración de 4%, se había reportado en las pruebas preliminares con nulo crecimiento *S. sclerotiorum*, agente causal del moho blanco.

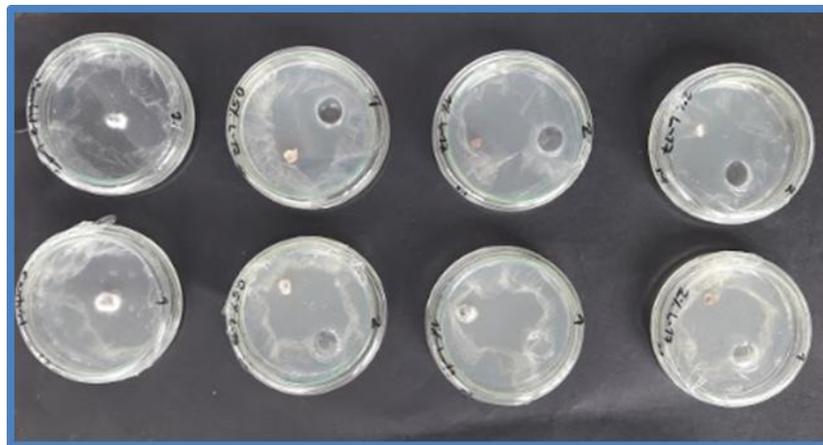
#### **ENSAYO DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (*Citrus latifolia*) - AEL**

(Esclerocio)

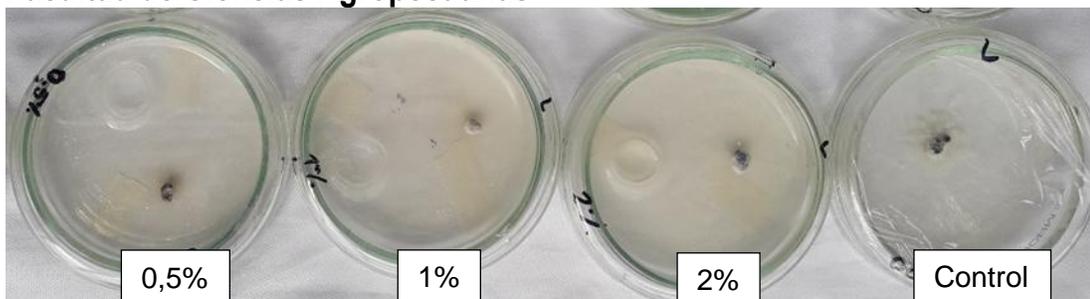
En este ensayo, no se identificó formación de esclerocios, y para cada concentración se obtuvo un dato de crecimiento de la siguiente manera: con la concentración de 0,5% se obtuvo 0,33cm, la de 1% es 0,036cm, la de 2% es 0cm, con respecto al control que fue de 2,22 cm, (Ver Grafica 5). Lo cual evidencia que la concentración de 1% es 89,32% más efectivo que la concentración de 0,5% (tabla 3) y el fungicida es 72,33% más efectivo que la concentración de 0,5%, frente a inhibir el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum*.



**Grafica 5:** Promedio de crecimiento (cm), de *Sclerotinia sclerotiorum*. Por técnica de pozos con AEL a diferente concentración evaluada (2%, 1% y 0,5%), en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).

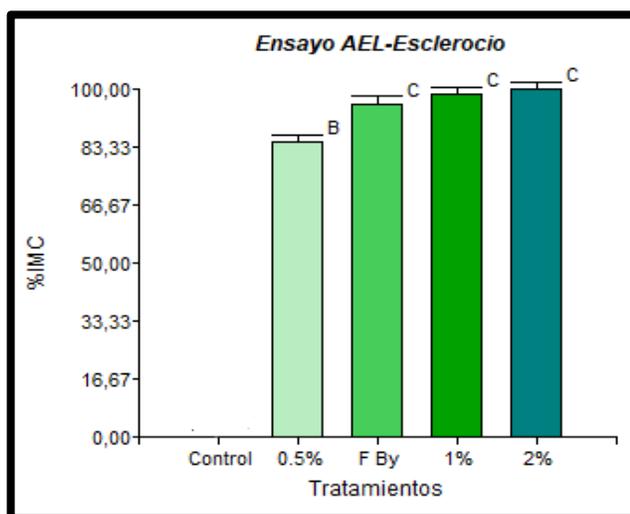


**Figura 17:** Ensayo de AEL por esclerocio, en las concentraciones de 0,5%, 1% y 2%.



**Figura 18:** Crecimiento de *S. sclerotiorum*, a partir de esclerocio en el 7mo día de ensayo, con las concentraciones de AEL.

Con respecto a la inhibición de crecimiento radial, la concentración de 2% inhibió por completo (%IMC=100%). Se encontró de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p > 0.05$  y un nivel de confianza del 95%), que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de 1%, 2% y el fungicida (FBy, i.a: benomil), con porcentajes de inhibición del 98,38% y 100%, respectivamente, en comparación con la concentración más baja 0,5%, se indica que esta no sería apropiada para el control del hongo, ya que tan solo muestra un %IMC del 84%, siendo menos efectiva que el producto químico y las concentraciones de 1% y 2%.



**Grafica 6:** Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (%IMC) de *S. sclerotiorum*, con respecto a cada concentración evaluada, en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).

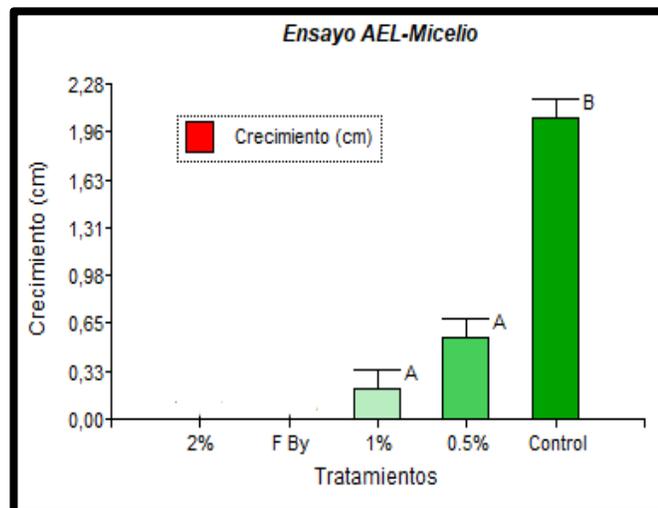
### Facultad de Ciencias Agropecuarias

En un estudio donde se usó aceite esencial (AE) de la especie *Citrus lemon*, encontraron que tres especies de hongos asociados a el cultivo de la vid, presentaron porcentajes de inhibición de: *Eutypa sp.* (IM: 82%), seguido por *B. dothidea* (IM: 48.1%) y *F. mediterranea* (IM: 33.1%) a una concentración de 0.25% (Amad *et al*, 2018). Sin embargo respecto a nuestro estudio, las concentraciones de AEL, fueron entre 0,75% y 1% más elevadas a la de este estudio, para el control de *S. sclerotiorum*. (Grafica 8)

### ENSAYO DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (*Citrus latifolia*) - AEL

(Micelio)

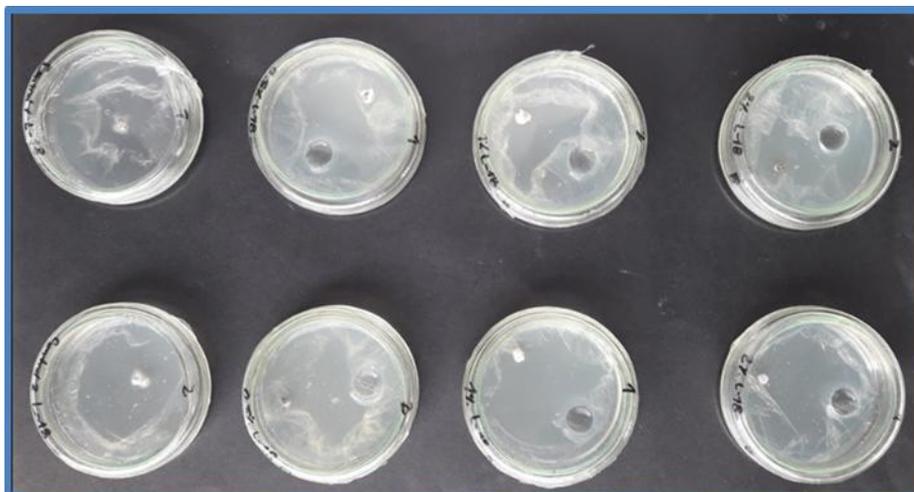
En este ensayo para cada concentración se obtuvo un dato de crecimiento de la siguiente manera: con la concentración de 0,5% se obtuvo 0,56cm, 1% es 0,20cm y la de 2% es 0cm, con respecto al control que fue de 2,05cm (Grafica 7). Lo cual evidencia que la concentración de 1% es 62,90% más efectivo que la concentración de 0,5% (tabla 3), frente a inhibir el crecimiento de *S. sclerotiorum*.



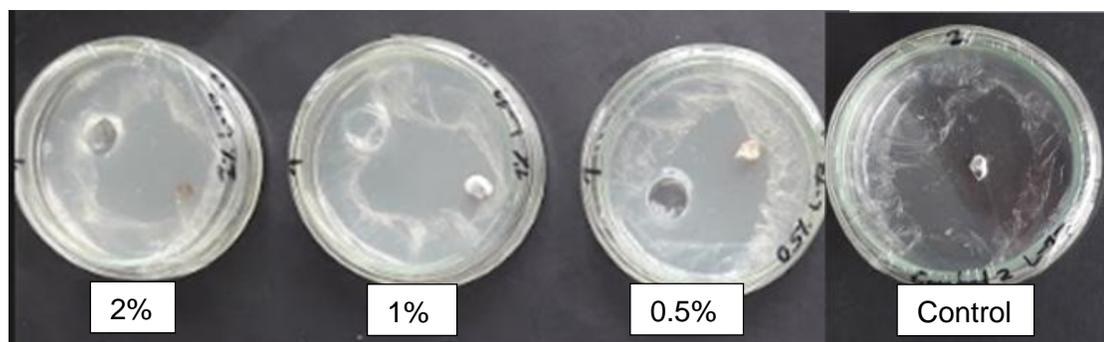
**Grafica 7:** Promedio de crecimiento (cm), de *S. sclerotiorum*, Por técnica de pozos con AEL a diferente concentración evaluada (2%, 1% y 0,5%), en comparación

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).



**Figura 19:** Ensayo de AEL por micelio, en las concentraciones de 0,5%, 1% y 2%.

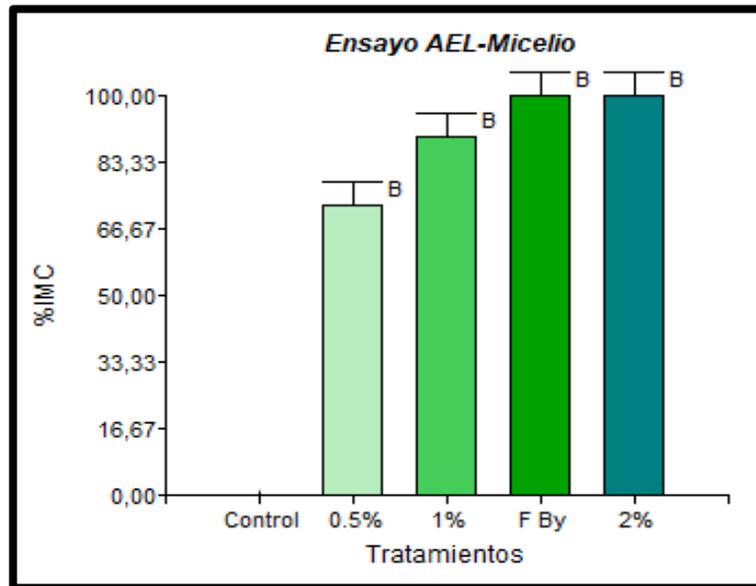


**Figura 20:** Crecimiento de *S. sclerotiorum*, a partir de micelio en el 7mo día de ensayo, con las concentraciones de AEL.

Con respecto a la inhibición de crecimiento radial, la concentración de 2% inhibió por completo (%IMC=100%), es decir no presento formación de micelio. Se encontró de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p > 0.05$  y un nivel de confianza del 95%), que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de 1%, 2% y el fungicida (FBy, i.a: benomil), con porcentajes de inhibición del 89,87% y 100%, respectivamente, en comparación con la concentración más baja 0,5%, se indica

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

que esta no sería apropiada para el control del hongo, ya que tan solo muestra un %IMC del 72,69% (tabla 3), siendo menos efectiva que el producto químico.



**Grafica 8:** Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (%IMC) de *S. sclerotiorum*, con respecto a cada concentración evaluada, en comparación con el control positivo (FBy = Fungicida i.a: benomil) y testigo sin concentración (Control).

En un estudio donde se usó aceite esencial (AE) de la especie *Citrus lemon*, encontraron que tres especies de hongos asociados a el cultivo de la vid, presentaron porcentajes de inhibición de: *Eutypa sp.* (IM: 82%), seguido por *B. dothidea* (IM: 48.1%) y *F. mediterranea* (IM: 33.1%) a una concentración de 0.25% (Amad *et al*, 2018). Sin embargo respecto a nuestro estudio, las concentraciones de AEL, fueron entre 0,75% y 1% más elevadas a la de este estudio, para el control de *S. sclerotiorum*.

- De acuerdo a los resultados obtenidos, se define que la concentración de 2%, fue exitosa al presentar un efecto fungistático con %IMC de 100% sobre el control de *S. sclerotiorum*, que a diferencia de la concentración de 0,5% presenta en promedio un 74% de inhibición, frente a el hongo.
- La identificación de los hongos patógenos tanto en campo, como en laboratorio es importante, para ayudar a el diagnostico de las enfermedades dentro del cultivo, además de conocer la morfología del hongo y así saber cómo manejarlo.
- El uso de esto aceites esenciales, se muestra como una alternativa para el control del hongo fitopatogeno *S. sclerotiorum*, en porcentajes de concentración bajos, lo que además favorece el aprovechamiento de un residuo orgánico, como lo es la cascara de estos frutos.
- Tanto el aceite esencial de la especie *Citrus sinensis* L. y *Citrus latifolia*, mostraron control del crecimiento del hongo fitopatogeno. Siendo que el AEN presento un mejor control en inhibir el crecimiento a partir de micelio y por otro lado el AEL, inhibió mejor el crecimiento a partir de esclerocio.

## 7. RECOMENDACIONES

- El desarrollo de futuras investigaciones en etapa *in vivo*, son importantes para determinar si las concentraciones determinadas en laboratorio, muestran la misma eficacia en el cultivo de lechuga, siendo uno de los más afectados por la enfermedad de “moho blanco”.
- Es importante, determinar si el uso de estos aceites junto a otra alternativa de control, permite compatibilidad entre los tratamientos.
- El uso de nuevas alternativas de control, que disminuyan el uso de productos de síntesis química, permite mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos, como es el caso del cultivo de Lechuga (*Lactuca sativa* L.), teniendo en cuenta que sus hojas como producto para comercialización, son de consumo directo.
- La detección temprana de la enfermedad, permite que el manejo y su control sea oportuno y apropiado, para realizar un plan de manejo integrado donde se reduzca la afectación generada por la presencia del patógeno causante de la patología.
- Es necesario el aporte de la investigación de estos y otros aceites esenciales, en el control de hongos patógenos, del género *Sclerotinia* sp.

**8. BIBLIOGRAFIA**

- Abawi, G.S., Polach, F.J. y Molin, W.T. (1975) Infection of Bean by Ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*. 65: 673-678.  
<http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-65-67>
- Adams, P.B. y Ayers, W.A. (1979). Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 69 (8):896-899.
- Adams, P. (1979) Comparison of antagonists of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 79(12):1345–1347
- Abdullah MT, Ali NY, Suleman P (2008) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Prot* 27: 1354-1359.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. En G. N. Agrios. Florida: Elsevier.
- Alzate, N. A., López, V. K., Marín, H. A. y Murillo A.W. (2009). Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. *Revista Tumbaga*, 1(4).
- Álvarez, Á. M. Á., Díaz, D. P. T., Fernández, S. V., Noreña, J. J., Aguilar, P. A. A., Molano, P. J. T., y Patiño Gómez, J. H. (2016). Modelo tecnológico para el cultivo de lechuga bajo buenas prácticas agrícolas en el oriente antioqueño. Disponible en: <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20LA%20LECHUGA.pdf>.
- Al-Taisan, W. A. A., Bahkali, A. H., Elgorban, A. M., & El-Metwally, M. A. (2014). Effective influence of essential oils and microelements against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Int. J. Pharmacol*, 10, 275-281.
- Azis, Irawanti. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on lettuce: does the efficacy of protection depend on the cultivar and the strain of pathogen, 2015.
- Arias, L. A., Tautiva, L. A., Piedrahíta, W., & Chaves, B. (2007). Evaluación de tres métodos de control del Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Agronomía Colombiana*, 133.
- Ávalos-García, A., E. Pérez-Urría, (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, serie Fisiología Vegetal 2: 119-145.
- Ávila, Rubén. Estudio de la actividad antifúngica de aceites esenciales. Septiembre, 2016.
- Bailey, K., y Lazarovits, G. (2003) Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil Tillage Res* 72(2): 169–180.
- Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina. Editorial Universidad Nacional de la Plata.
- Boland, G.J. y Hall R.(1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol*. 16: 93–108.

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

- Caccioni, D.R.L., Guizzardi, M., Biondi, D.M., Renda, A. y Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile compounds of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int J Food Microbiol* 43, 73–79.
- Cadena Piedrahita, L., Borbor Bermeo, J., & Mejia Coronel, M. T. (2009). Proyecto de exportación de aceite esencial de limón con destino a los países miembros del nafta: una alternativa para competir en el tlc.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 25(3), 298-301.
- Cook, R.J. (1990). Twenty-five years of progress towards biological control. In: Hornby, D. (Ed.), *Biological Control of Soilborne Pathogens*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 1–14.
- Cowan, M. (1999). Plants products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 564–582.
- Diáñez, F., Santos, M., Parra, C., Navarro, M. J., Blanco, R., & Gea, F. J. (2018). Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. *Letters in applied microbiology*, 67(4), 400-410.
- Duncan, R.W., Dilantha, Fernandoa, W.G. y Rashidb, K.Y. (2006) Time and burial depth influencing the viability and bacterial colonization of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Soil Biol Biochem* 38: 275-284.
- Elsheshtawi, M., Elkhaky, M.T., Sayed, S.R., Bahkali, H.A., Mohammed, A.A., Gambhir, D., Mansour, A.S., y Elgorban, A.M. (2016) Integrated control of white rot disease on beans caused by *Sclerotinia sclerotiorum* using Contans and reduced fungicides application. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 24, 405–409.
- Estevam, E. B. B.; Miranda, M. L. D.\* Alves, J. M.; Egea, M. B.; Pereira, P. S.; Martins, C. H. G.; Esperandim, V. R.; Magalhães, L. G.; Bolela, A. C.; Cazal, C. M.; Souza, A. F.; Alves, C. C. F. (2016). Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). *Rev Virtual Quim*, 8, 1842-1854.
- Fraternale, D., Giamperi, L., y Ricci, D. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from in vitro plants of *Thymus mastichina* L. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 278–281.
- FRAC, 2018. Fungicide Resistance Action Committee, Code List ©\*2018: Fungicides sorted by mode of action. In: <http://www.phibase.org/images/fracCodeList.pdf>.
- Ferreira, S.A. y Boley, R.A. (1992). *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop knowledge Master*. En: [www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s\\_scler.htm](http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s_scler.htm); consulta: Septiembre 27 de 2016

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

- Gulya, T., Rashid, K.Y., y Masirevic, S.M. (1997). Sunflower technology and production. In: Schneiter AA (ed) Sunflower Diseases. vol 35. Madison, Wisconsin 263–379.
- Ghasolia, R.P. and Shivpuri, A. (2008). Management of Sclerotium rot of Indian mustard with plant extracts and fungicides. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 38 (2): 400-402.
- Gossen, B.D., Rimmer, S.R y Holley, J.D. (2001). First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis* 85: 1206.
- Gogoi, P.; Baruah, P.; Nath, S.C. Microbiological Research. Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem.). *Microbiol. Res.* 2008, 163, 337–344.
- González, E, R.; Ragazzo, S.J.; Calderón, S.M. (2016). Antifungal activity of SPI-based films enriched with essential oils and postharvest application of coatings on quality of Persian lime (*Citrus latifolia tanaka*). DO - 10.13140/RG.2.1.1331.0964/1.
- Gómez Cisneros, K. Y. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium* L.) frente al hongo (*fusarium semitectum*).
- Guédez, C., Cañizalez, L., Avendaño, L., Scorza, J., Castillo, C., Olivar, R., y Sánchez, L. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34(2).
- Hariprasad, P. y Niranjana, S.R. (2009). Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil* 316: 13- 24.
- Kingston, HM, Jassie, LB (1988). Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. Washington: American Chemical Society. p. 7-31
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Wigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1, 119–128.
- Koike, S.T. y Davis, R.M. (2009). Lettuce. Lettuce drop. UC IPM Pest management guidelines: Lettuce. UC ANR Publication 3450. University of California, Agriculture and Natural Resources, En: [www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r441100711.html](http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r441100711.html).
- Koul, O., Walia, S. and G. S. Dhaliwal. (2008). Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopesticides International*, 4(1): 63–84.
- Kumar, U., Ram, B., Pant, A. K., Gupta, K. C., & Brophy, J. J. (1992). Volatile constituents of the distilled leaf and peel oils of Citrus limon Burm cv. "Pant lemon-1". *Journal of Essential Oil Research*, 4(6), 643-644.
- Laemmlen, F. (2003). Sclerotinia diseases – Symptoms, signs and management. En: [www.cesantabarbara.ucdavis.edu/ipm2.htm](http://www.cesantabarbara.ucdavis.edu/ipm2.htm); consulta: Septiembre 27 de 2017.
- Liñan de, C. (2015). *Vademecum De Productos Fitosanitarios Y Nutricionales 2000*.

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

- LIZCANO, María. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de Tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. UNAL, Bogotá-Colombia, 2014.
- Martínez, J.A. (2012) Natural fungicides obtained from plants. In: Dhanasekaran, D., Thajuddin, N. and Panneerselvam, A. (eds) Fungicides for Plant and Animal Diseases. InTech Open, Rijeca, Croatia, pp. 3–28.
- North Central Integrated Pest Management Center (NCIPMC). Field Crop Fungicides for the North Central United States. In: Fungicide Resistance and the FRAC Code. 17-18, 22 pp. <https://www.ncipmc.org/action/Fungicide%20Manual4.pdf>.
- Ong, H. F. (2012). Extraction of essential oil from orange peels (Doctoral dissertation, UMP). En: [http://umpir.ump.edu.my/3557/1/ONG\\_HUI\\_FONG.PDF](http://umpir.ump.edu.my/3557/1/ONG_HUI_FONG.PDF).
- Ospina, D. I., Álvarez, V., Torres, H. G., Sánchez, M. S., & Bonilla, C. R. (2011). Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Acta Agronómica*, 60(4), 306-311.
- Ouhaibi-Ben Abdeljalil, N., Vallance, J., Gerbore, J., Rey, P., y Daami-Remadi, M. (2016). Bio-suppression of *Sclerotinia* stem rot of tomato and biostimulation of plant growth using tomato-associated rhizobacteria. *J Plant Pathol Microbiol*, 7(331), 2.
- Patiño, L. Rodríguez, M. (2001). Aislamiento e identificación de Hongos fitopatógenos y evaluación de fungicidas frente a los hongos, más relevantes en vid (*Vitis vinífera*), variedad chardonnay en el viñedo san Martín en el municipio de Sogamoso, departamento de Boyacá. Trabajo de grado para optar por el título de microbiólogo industrial. Universidad Pontificia Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas.
- Pérez, S. (2009). La Pudrición de la lechuga causada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* o *Sclerotinia minor*. Trabajo final. Especialización en Horticultura, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. pp. 33-160.
- Pérez, S. L., Piedrahíta, W., y Arbeláez, G. (2011). Patogénesis de la pudrición blanda de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) en la Sabana de Bogotá causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(2), 262-274.
- Piñeros, C. Y. (2010). Manual poscosecha de Brócoli, Espinaca y Lechuga en la sabana de Bogotá. Capítulo 1: Diagnóstico de pérdidas en cosecha y poscosecha de hortalizas (brócoli, espinaca y lechuga), en la sabana de Bogotá. 19-21 pp. En: [http://www.utadeo.edu.co/files/node/publication/field\\_attached\\_file/pdf-manual\\_prod.\\_brocoli\\_-pag\\_30\\_publication.pdf](http://www.utadeo.edu.co/files/node/publication/field_attached_file/pdf-manual_prod._brocoli_-pag_30_publication.pdf).
- Piper, P., Calderon, C. O., Hatzixanthis, K., & Mollapour, M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, 147, 2635–2642.

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

- Purdy, L.H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69: 875-880.
- Quintana-Obregón, E. A., Sánchez-Mariñez, R. I., Cortez-Rocha, M. O., & González-Aguilar, G. A. (2017). Actividad antifúngica in vitro de mezcla de terpenos de naranja contra *Alternaria tenuissima*. En: <http://revistamexicanademicologia.org/wp-content/uploads/2017/05/art-2.pdf>.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams Ghahfarokhi, M., Yoshinari, T., Rezaee, M.B., Jaimand, K., Nagasawa, H., Sakuda, S., 2008. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Int. J Food Microbiol.*, 123: 228–233.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M. 2011. Natural Inhibitors of Food-borne Fungi from Plants and Microorganisms. In: Rai, M. Chikindas, M. (eds.), *Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality*. CABI Publisher, pp 182-203
- Saharan G.S., y Mehta, N. (2008) *Sclerotinia* diseases of crop plants: Biology, ecology and disease management. Springer Science Business Media BV, The Netherlands. 485 pp.
- Sepúlveda R. P. (2015). Enfermedades en Hortalizas de hojas, raíz y brasicas. *Fitosanidad para hortalizas en la zona del sur* (pág. 47). Chile: INIA La Platina.
- Shelz Z, Molnar J, Hohmann J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*. 77:279-85.
- Smit, Alexander. Caracterización, análisis espacial y manejo integrado del moho blanco (*S. minor* Jagger y *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary), en lechuga Batavia (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*), en la vereda la moya (Cota-Cundinamarca), 2007.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59, 201–222.
- Sommer, N. F., Fortlage R. J. y Edwards, D. C. (2011). Enfermedades Postcosecha de Productos Seleccionados. 260-261 pp. En: Kader, A. A.; Pelayo-Zaldivar, C. (ed). *Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas*. Tercera edición. Universidad de California, USA.
- Subbarao, K.V., Hubbard, J.C., y Schulbach, K.F. (1997). Comparison of lettuce disease and yield under subsurface drip and furrow irrigation. *Phytopathology*. 87 (8), 877-883.
- Suarez, R.; Brodeur, J. y Zaccagnini, M. (2013). Los Agroquímicos y el Ambiente. In book: Programa de Formación Integral en el Uso Responsable de los Fitosanitarios.
- Steadman, J.R. (1979). Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathol.* 69, 904-907.
- UNCR (2006). Benomil. Manual de plaguicidas de Centroamérica, Características generales. Universidad Nacional de Costa Rica. En:

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

<http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/58-benomil>

- Valencia, J., & Arbeláez, G. (1999). Control biológico de la pudrición basal del tallo en Crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*) ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum* con algunos aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. *Agronomía Colombiana*, 16(1-3), 1-4.
- Vélez Calderón, S. N. (2016). *Evaluación de la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y corteza de citrus limon (limón sutil) para la inhibición de hongos patógenos presentes en carica papaya l.(papaya maradol) y carica papaya var. solo sunrise (papaya hawaiana)*, Quevedo 2016 (Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ).
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food control*, 19(12), 1130-1138.
- Wang, Y., Hou, Y. P., Chen, C. J., y Zhou, M. G. (2014). Detection of resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* to carbendazim and dimethachlor in Jiangsu Province of China. *Australasian Plant Pathology*, 43(3), 307-312.
- Willestts H.J. y Wong L.J. 1980. The biology of *Sclerotinia Sclerotiorum*, *S. Trifoliorum*. And *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Bot. Rev* 46: 65-101.
- Wu, B. M., y Subbarao, K. V. (2003). Effects of irrigation and tillage on temporal and spatial dynamics of *Sclerotinia minor* sclerotia and lettuce drop incidence. *Phytopathology* 93:1572-1580.
- Zhang, J.X. y Xue, A.G. (2010). Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control conditions. *Plant Pathol* 59: 382-391.

ANEXO N°1:

Resultados Cromatografía de gases.

### Compuestos del Naranja

Analyzed : 10/12/2016 3:15:17 PM

Bicyclo  
Beta-phellandrene  
Beta- myreene  
4-carene  
beta.-Cymene  
D-Limonene  
gamma.-Terpinene  
4-Terpineol  
Geraniol

### Compuestos del Limón

Analyzed : 10/12/2016 4:12:33 PM

beta.-Phellandrene  
Tricyclo  
gamma.-Terpinene  
1,3,8-para-Menthatriene  
(E)-Limonene oxide  
L.-alpha.-Terpineol  
trans-Carveol  
Geraniol  
Isocarveol  
alfa.-Copaene  
alpha.-Muurolene  
beta.-Bisabolene  
alpha.-Panasinsen  
Caryophyllene oxide