Estudio *in vitro* de la eficacia de los aceites esenciales de eucalipto *(Eucalyptus globulus*) y citronella *(Cymbopogon winterianus)* en el control de *Colletotrichum* sp.

Danna Valentina Gutiérrez Gómez

Yensy Katerine Sanabria Tribiño

Alejandra Buitrago Gil

Corporación Universitaria Minuto de Dios

Rectoría Oriente

Sede San Juan Eudes Villavicencio (Meta)

Programa Ingeniería Agroecológica

Septiembre de 2024

Estudio *in vitro* de la eficacia de los aceites esenciales de eucalipto *(Eucalyptus globulus)* y citronella *(Cymbopogon winterianus*) en el control *de Colletotrichum sp*.

Danna Valentina Gutiérrez Gómez

Yensy Katerine Sanabria Tribiño

Alejandra Buitrago Gil

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero en Agroecología

Asesor(a)

Martha Lucia Velasco Belalcázar

Bióloga / MSc Fitopatología

Co Asesor (a)
Carlos Alberto Hernández Medina
Biólogo / MSc Fitopatología

Grupo de investigación GITSAI (Innovación agroindustrial, tecnológica y social)
Línea de investigación: Innovaciones Sociales y Productivas
Sub línea de investigación: Sistemas de conservación-producción en el trópico

Corporación Universitaria Minuto de Dios
Rectoría Oriente
Sede San Juan Eudes Villavicencio (Meta)
Programa Ingeniería Agroecológica
Septiembre de 2024

Dedicatoria

El presente trabajo lo dedicamos primeramente a Dios, por darnos la oportunidad de vivir y por las bendiciones que recibimos de él todos los días; a nuestros padres, ya que sin ellos no estaríamos cumpliendo nuestros propósitos y sueños y son nuestro motor para seguir adelante, a todos nuestros docentes, los cuales nos han acompañado en cada proceso de aprendizaje y nos han enseñado a nunca desistir en este camino de formación, por último y no menos importante, a cada una de las integrantes que hacen parte de este proyecto de investigación ya que se esmeraron en realizar las actividades lo mejor posible para la creación de este trabajo tan vigoroso, por el cual se obtuvo un gran aprendizaje tanto personal como profesional .

Agradecimientos

Ante todo, expresamos nuestra gratitud a DIOS que ha sido nuestra guía en este camino de formación como profesionales, él cual nos ha iluminado con paciencia, estrategia, inteligencia y responsabilidad y nos ha permitido contribuir con el desarrollo de esta investigación, como segunda instancia agradecemos el esfuerzo y compromisos de nuestros familiares especialmente nuestros padres por brindarnos la oportunidad de acceder a la educación profesional y confiar en nosotros, su apoyo incondicional ha sido fundamental en este proceso. De la misma manera agradecemos enormemente a nuestra asesora y co-asesor de proyecto, Martha Lucia Velasco Belalcázar y Carlos Alberto Hernández Medina, quienes estuvieron dedicándonos todo su apoyo, tiempo y compromiso, aportándonos conocimientos y nos han guiado en el desarrollo de esta investigación de manera excepcional.

Por último, pero no menos importante, queremos expresar nuestro agradecimiento a la comunidad en general y docentes de la Corporación Universitaria Minuto de Dios (UNIMINUTO) por brindarnos la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de investigación. Además, agradecemos el apoyo brindado a través de los diversos semilleros de investigación en nuestro programa académico y formativo.

Contenido

Dedicatoria 3
Agradecimientos 4
Contenido 5
Lista de tablas 7
Lista de figuras 8
Lista de anexos 10
Resumen 11
Abstract 12
Introducción 13
CAPITULO I 15
1 Objetivos 15
1.1 Objetivo general 15
1.1.1 Objetivos específicos 15
CAPITULO II. 16
2 Problemática 16
2.1 Pregunta problema 17
CAPITULO III 18
3 justificación 18
CAPITULO IV 20
4 Marco Teórico 20
4.1 Antracnosis 20
4.1.1 Síntomas 21
4.1.2 Manejo de la enfermedad 21
4.1.3 Control químico 22
4.1.4 Colletotrichum sp 22
4.2 Métodos de control 24
4.2.1 Aceites esenciales 24
4.2.2 Actividad biocontroladora de los AE 25
4.2.3 Aceite esencial de eucalipto 25

4.2.4 Aceite esencial de citronella 26
4.2.5 Control con productos de síntesis química 27
CAPITULO V 28
5 Materiales y métodos 28
5.1 Lugar de estudio 28
5.2 Técnicas 28
5.2.1 Obtención de cepas fúngicas. 28
5.3 Procedimientos 29
5.3.1 Etapa I. Análisis de la tasa de crecimiento micelial del Colletotrichum sp.: 29
5.3.2 Etapa 2. Medición del porcentaje de inhibición de dos AE frente al Colletotrichum sp: 33
5.4 Análisis de los resultados: 35
CAPITULO VI 36
6 Resultados y discusión 36
6.1 Determinación del efecto antifúngico de los AE sobre el crecimiento micelial y esporulación del hongo fitopatógeno. 36
6.1.1 Cuantificación del porcentaje de inhibición de los AE frente al Colletotrichum sp: 39
CAPITULO VII 46
7 Conclusión 46
8 Referencias 47
Anexos 54

Lista de tablas

Tabla 1.Clasificación taxonómica de Colletotrichum sp. 23

Tabla 2.Clasificación taxonómica de eucalipto 26

Tabla 3. Clasificación taxonómica de citronella 27

Tabla 4. Tratamientos para el análisis de la actividad inhibitoria de los AE 32

Tabla 5 Resultados de los porcentajes de inhibición. 42

Tabla 6.Resultados de la comparación múltiple de los diferentes tratamientos frente al tratamiento 11 mediante mediante una ANOVA de una vía (Dunnett's Method) 44

Tabla 7. Conteo de esporas en los tratamientos evaluados. Los resultados se expresan en número de esporas por mL de solución. 45

Lista de figuras

Figura 2. Cepa de Colletotrichum sp., referencia utilizada en el estudio. (A) Crecimiento del hongo vista del anverso de la caja Petri y la colonia. (B) Crecimiento del hongo vista del reverso de la caja Petri y la colonia. 29

Figura 3. Porciones del hongo Colletotrichum sp., como inoculante las pruebas de crecimiento e inhibición en medio PDA con cada tratamiento. En la imagen se muestra el procedimiento del medio PDA y la siembra del hongo. 30

Figura 4. (A) y (B); Preparación del medio PDA con los diferentes tratamientos diluidos y homogenizados. (C); fungicida FORDAZIM y AE utilizados en el estudio. 31

Figura 5. Proceso de esterilización de los AE y el fungicida mediante filtración. 31

Figura 6. Proceso relacionado con el conteo de esporas en los tratamientos. (A) y (B); Raspado del medio PDA con Colletotrichum. (C); Decantación de esporas del Colletotrichum. (D); Tubos de ensayos con muestras de esporas. (F); Cámara Neubauer. (F); Conteo de esporas en cámara Neubauer observado en microscopio. 35

Figura 7. Representación del crecimiento micelial del hongo Colletotrichum sp., en presencia del tratamiento de eucalipto. 38

Figura 8. Resultados del porcentaje de inhibición del hongo colletotrichum sp., frente a los tratamientos evaluados en el estudio. 40

Figura 9. (A); Tratamiento del medio de Eucalipto al 300mg/ml. (B); Tratamiento citronella + eucalipto al 300 mg/ml. 40

Figura 10. (C); Tratamiento control del medio. (D); Tratamiento del fungicida FORDAZIM. (E)Tratamiento citronella al 100 mg/ml. 41

Figura 11. (F y G) comparación visual del crecimiento micelial en los tratamientos; eucalipto, citronella, control. fungicida al 100,200 y 300 mg/ml. 41

Lista de anexos

Anexo 1. Datos crudos de crecimiento micelial control y fungicida.....54
Anexo 2. Datos crudos de Porcentajes de Inhibición AE citronella 100 mg/ml ,200 mg/ml ,300 mg/ml 54
Anexo 3. Datos crudos de Porcentajes de Inhibición AE Eucalipto 100 mg/ml ,200 mg/ml ,300 mg/ml 55
Anexo 4. Datos crudos de Porcentajes de Inhibición mezcla de AE 100 mg/ml ,200 mg/ml ,300 mg/ml 55
Anexo 5. Datos crudos de Porcentajes de Inhibición tratamiento de control y fungicida. 56
Anexo 6. Datos crudos de Promedio del número de esporas que se generaron luego de 11 días de crecimiento en cada una de las repeticiones de los diferentes tratamientos. En esta tabla se presenta el promedio de 27 datos tomados en cada repetición. El valor observado corresponde al número promedio de esporas presentes en cada mL de solución generada de las cajas Petri con los tratamientos. 56

Resumen

El hongo *Colletotrichum* sp. es el agente causal de la Antracnosis, enfermedad que está presente en hojas, ramas, frutos y puede originar lesiones, las cuales inicialmente son superficiales, de color rojizo o café, donde de manera convencional se realiza manejos excesivos de fungicidas. Es por esto que, se propone emplear una alternativa para el manejo del hongo, que no disturbe en gran medida los sistemas agrícolas y que se conoce de antemano su efecto positivo en campo. Es así como esta investigación se evaluó *in vitro* y se comparó la eficacia de los aceites esenciales (AE) de citronella (*Cymbopogon winterianus*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) para el control del hongo. Como antecedente se menciona que el hongo empleado proviene de la Granja Agroecológica UNIMINUTO, bajo la metodología implementada por Velasco (2016). El presente trabajo se desarrolló en el ICA Seccional Meta donde a partir de la cepa cedida se derivaron colonias puras sometidas a pruebas de antagonismo o inhibición (para observar actividad antifúngica y en algunas ocasiones fungistáticas) a nivel de medio de cultivo en cajas Petri donde se realizaron mezclas de PDA con diferentes dosis de los AE, con el fin de medir la tasa de crecimiento micelial y producción de esporas. Concentraciones de 100, 200 y 300 μg/ml de AE de *E. globulus* y *C. winterianus* solos y en combinaciones se trabajaron, donde para el caso de citronela no permitieron dejar crecer ni desarrollar las colonias, por otro lado, al emplear solo eucalipto el comportamiento fue más fungistático, y combinado se siguió viendo el efecto antifúngico. Se realizaron comparación de los promedios de las mediciones, mediante una ANOVA de una vía diversas pruebas comparativas para determinar si existían o no diferencias significativas entre tratamientos en las variables de % de inhibición y el número de esporas. Esto nos permite visualizar un panorama para el control del fitopatógeno en campo.

Palabras clave: Antracnosis, aceites esenciales, citronella, antifúngico, eucalipto.

Abstract

The fungus Colletotrichum sp. It is the causal agent of Anthracnose, a disease that is present on leaves, branches, fruits and can cause lesions, which are initially superficial, reddish or brown in color, where conventional handling is carried out with excessive fungicides. This is why it is proposed to use an alternative for the management of the fungus that does not greatly disturb agricultural systems and that its positive effect in the field is known in advance. This is how this research was evaluated in vitro and the effectiveness of essential oils (EO) of citronella (Cymbopogon winterianus) and eucalyptus (Eucalyptus globulus) for the control of the fungus was compared. As background, it is mentioned that the mushroom used comes from the UNIMINUTO Agroecological Farm, under the methodology implemented by Velasco, (2016). The present work was developed at the ICA Sectional Meta where pure colonies were derived from the donated strain and subjected to antagonism or inhibition tests (to observe antifungal and sometimes fungistatic activity) at the level of culture medium in Petri dishes where They made mixtures of PDA with different doses of EO, in order to measure the rate of mycelial growth and spore production. Concentrations of 100, 200 and 300 µg/ml of EO from E. globulus and C. winterianus alone and in combinations were worked, where in the case of citronella they did not allow the colonies to grow or develop, on the other hand, when using only eucalyptus the behavior was more fungistatic, and combined the antifungal effect continued to be seen. Comparison of the averages of the measurements was carried out using a one-way ANOVA, various comparative tests to determine whether or not there were significant differences between treatments in the variables of % inhibition and the number of spores. This allows us to visualize a panorama for the control of the phytopathogen in the field.

Keywords: Anthracnose, essential oils, citronella, antifungal, eucalyptus.

Introducción

Las enfermedades en las plantas son consideradas como un desorden fisiológico o anormalidad estructural que es perjudicial para la planta en su conjunto, para una parte de ella o para sus productos y que reduce su valor económico, además que esta da una serie de respuestas, visibles o no visibles, que es denominado sintomatología, que es generada por patógenos según las condiciones medio ambientales y las practicas agronómicas (Ormeño, 2023). La antracnosis es una enfermedad que se caracteriza por presentar síntomas como manchas redondeadas formando anillos concéntricos en hojas, tallos y frutos, además este hongo se ve favorecido por alta humedad relativa, temperaturas superiores a 30°C, encharcamiento del suelo o mal drenaje, alta densidad de siembra, mal manejo de residuos de poda y deficiencias nutricionales en el cultivo (Urbina y Gonzales, 2021).

La región Orinoquia tiene una humedad relativa de 85% y una temperatura que oscila entre 18°C a 36°C , que es allí donde se ve favorecido el patógeno , debido a largos periodos de lluvia que ayudan a la diseminación de este patógeno, causando bastantes problemas en los cultivos de los productores de esta región , en el que se está evidenciando la reducción del valor económico del fruto o del producto ya que este patógeno se presenta más en etapa de poscosecha, además de los altos costos de producción que se generan al aplicar insumos agrícolas que no son efectivos y que deterioran el medio ambiente (Navarro Herrera ,2018). Es preciso mencionar que se requieren de alternativas como es el control biológico a través de AE de plantas aromáticas donde se hace uso de sus metabolitos segundarios para la mitigación de las enfermedades en diferentes cultivos agrícolas, este bio control requiere de esos compuestos o extractos que tiene la planta ya sea a una

concentración pura o combinada, qué son capaces de disminuir los efectos o la severidad que produce una población patógena en un cultivo (Urbina y González,2021).

Los AE de algunas especies vegetales según Duarte y Tomalá, (2022) son inhibidores de patógenos, pero también en organismos fitopatógenos que, como se conoce, tienen una acción fungistática en plantas para el manejo de enfermedades fúngicas como lo confirman los estudios *in vitro*. En los llanos orientales se pueden encontrar gran variedad de AE de plantas aromáticas de casas comerciales , como en las casas verdes o mayormente conocidos como tiendas naturalista , pero también es importa resaltar que en el municipio de Villavicencio-Meta se generan proyectos muy innovadores de la extracción del aceite esencial de las siguientes plantas: *C. citratus* (limonaria), *C. nardus* (citronella), y *Ocimum basilicum* L (albahaca) , según una investigación de la Universidad de los llanos, donde se pudo evidenciar la similitud de componentes químicos que contiene estas plantas para poder ser utilizadas en investigaciones para la inhibición de patógenos en cultivos , además de que se puede obtener y extraer estos componentes de los AE en diferente concentraciones de pureza ,en donde el mayor valor de pureza es 100%. (Pardo Carrasco,2023).

CAPITULO I

1 Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el estudio in vitro de la eficacia de los AE de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y citronella (*Cymbopogon winterianus*) para el control del Colletotrichum sp.

1.1.1 Objetivos específicos

- Determinar el efecto antifúngico de los AE midiendo el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento micelial y esporulación del hongo fitopatógeno.
- Realizar un análisis estadístico para comparar la eficacia de los AE de eucalipto y citronella en el control del crecimiento y esporulación de *Colletotrichum* sp. *in vitro* y determinar si existe alguna diferencia significativa en su actividad antifúngica.

CAPITULO II.

2 Problemática

El hongo *Colletotrichum* sp., que actúa como agente causal de la antracnosis, representa una amenaza significativa en los llanos orientales, donde puede causar pérdidas de hasta el 80% en las producciones agrícolas. Este patógeno es responsable de la pérdida total de frutos afectados por la enfermedad, lo que puede llegar al 100%, especialmente en condiciones ambientales propicias para su desarrollo. La frecuencia y la cantidad de las precipitaciones desempeñan un papel crucial en la magnitud de las pérdidas provocadas por la antracnosis (Mogollón et al., 2021).

De acuerdo con Rojo-Báez et al, (2017), el desarrollo del patógeno *Colletotrichum* sp. Se ve favorecido por temperaturas cálidas y alta humedad relativa, condiciones que son comunes en regiones tropicales. Por lo tanto, en épocas con largos periodos de lluvias durante la etapa de floración se propicia la enfermedad acelerando su ciclo y proporcionando grandes cantidades de inóculo (Mogollón et al., 2021). Además, entre las problemáticas destacables, se encuentra la preocupante presencia y afectación local del patógeno. Esto se hace evidente en el lugar de estudio, específicamente en las instalaciones de la granja agroecológica UNIMINUTO, donde se observa la afectación causada por *Colletotrichum* sp. En áreas de producción de cultivos como el achiote (*Bixa orellana),* cacao *(Theobroma cacao)* y café (*Coffea).* Esta situación subraya la importancia crítica de llevar a cabo un estudio destinado al control y manejo efectivo de este patógeno en la región.

Adicionalmente, según lo reportado en literatura, en el departamento del Meta los cultivos más afectados por el patógeno son: Aguacate *(Persea americana),* Cítricos *(Citrus),* Guayaba *(Psidium),* Guanábana *(Annona muricata),* Mango (*Mangifera indica),* Piña *(Ananas comosus)* y *Caucho (Hevea brasiliensis*) (ICA,2020).

2.1 Pregunta problema

- ✓ ¿Cuál es la eficacia de los AE de eucalipto *(E.globulus)* y citronella *(C. winterianus)* en el control de *Colletotrichum* sp. en estudios *in vitro*?

- ✓ ¿Es viable el uso de AE de eucalipto *(Eucalyptus globulus)* y citronella *(Cymbopogon winterianus)* en el control de *Colletotrichum* sp.*?*

CAPITULO III

3 justificación

El presente estudio *in vitro* contribuye al control del agente causal del hongo *Colletotrichum* sp. que afecta a múltiples cultivos en los llanos orientales, según lo confirmado por el Instituto Colombiano Agropecuario -ICA (2020). Esta preocupante situación ha motivado la implementación de asistencia técnica en varios municipios del Meta, a abarcar localidades como Fuente de Oro, Vista Hermosa, Mesetas, El Dorado, Castillo, Puerto Lleras, Puerto Rico, Granada, Mapiripán, Puerto López, Lejanías, Villavicencio, Acacias y Cabuyaro, lo que se traduce en una cobertura que involucra a 14 municipios. El interés por esta investigación surge como una respuesta a la necesidad de encontrar soluciones efectivas a esta problemática, así como de avanzar en el conocimiento del campo de la Fitopatología, tanto para los actores involucrados en la investigación como para el beneficio de la sociedad en general.

La metodología seleccionada para la investigación se fundamenta en el uso de un patógeno altamente resistente que ejerce un impacto negativo en la etapa de poscosecha de frutos tropicales, como ha sido documentado por Ruiz (2022). El método *in vitro* ofrece un control preciso de las condiciones ambientales del hongo, lo que permite un análisis detenido mediante aislamientos y la aplicación de diversos tratamientos con productos químicos y orgánicos. Esto contribuiría a la generación de alternativas viables para el control de enfermedades, y cuestiona la eficacia de ciertos ingredientes activos presentes en productos comerciales, arrojando luz sobre su capacidad real para controlar patógenos en plantas.

La investigación también se enfoca en el concepto de control biológico, propuesto por Viera et al (2020). Este enfoque destaca la utilización de productos amigables con el medio ambiente y la salud humana como una alternativa relevante. Estos productos presentan características y modos de

acción que contribuyen al control de plagas y enfermedades, minimizando los riesgos asociados con el uso de químicos de síntesis industrial convencional.

Además, se explora el uso de plantas aromáticas como un método de control biológico, ya que diversas especies vegetales producen AE con un papel destacado en los mecanismos de defensa de los hospederos contra fitopatógenos. Investigaciones previas han confirmado la actividad fungicida y fungistática de los AE y sus compuestos, lo que significa que pueden inhibir el crecimiento de patógenos, como lo señalan Barrera y García (2008).

Este estudio contribuye significativamente a la comprensión de la problemática del aumento de las enfermedades de las plantas en los llanos orientales, así como a la búsqueda de estrategias de control más efectivas y amigables con el medio ambiente para beneficio de la agricultura y la sociedad en su conjunto. Para finalizar, en esta investigación *in vitro* se propuso un esfuerzo integral para enfrentar una enfermedad que afecta de manera significativa la agricultura en los llanos orientales, aprovechando metodologías precisas y enfoques sostenibles. A través del estudio riguroso de condiciones ambientales, tratamientos alternativos y estrategias de control biológico, avanzando en la comprensión de esta problemática fitopatológica, y proporcionando herramientas prácticas y conocimientos valiosos que benefician a los agricultores, al sector agrícola en su totalidad y, en última instancia, al bienestar de la sociedad. Representa un paso hacia adelante en la búsqueda de soluciones efectivas y sostenibles para preservar la salud de nuestros cultivos y el equilibrio del ecosistema agrícola en los llanos orientales.”

CAPITULO IV

4 Marco Teórico

4.1 Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum* que afecta a diversas plantas en todo el mundo, es una de las principales enfermedades que pueden generar un daño en cultivos agrícolas y ornamentales. De acuerdo con Bilenki, et al (2021) la antracnosis es una enfermedad que se presenta principalmente en las hojas jóvenes y en los brotes de postcosecha en plantas adultas y débiles, menciona Alava, (2022) que el hongo presenta una distribución cosmopolita y con predominancia en los trópicos y subtrópicos, el cual los ataques más severos del hongo suceden cuando el cultivo se expone a temporadas de lluvias y aumenta la humedad relativa, mayor del 90 %. La antracnosis es una de las enfermedades principales de importancia económica ya que provocan pérdidas en el rendimiento y producción. De la misma manera que es considerada como uno de los principales patógenos que atacan las plantaciones de frutales en etapas de prefloración y permanece asintomática hasta la maduración del fruto, ya que el patógeno realiza una invasión intercelular y la enfermedad se expresa (Montaño & Martínez, 2015).

Alava, (2022) plantea que los agentes diseminadores del hongo se dan por el aire o por salpicaduras de lluvia, donde los conidios se adhieren al hospedero, por medio de una capa mucilaginosa se puede producir la infección que tarda un lapso de 2 horas aproximadamente. Para producir la colonización mediante las hifas inter e intracelulares que penetran las células epidérmicas y mesófilas y ello ocasiona la muerte des hospedante.

4.1.1 *Síntomas*

El agente casual se manifiesta por la presencia de manchas oscuras en las hojas y los frutos, con una forma redonda u ovaladas de un diámetro de 1 o 2 mm hasta 5 cm. Asimismo, se presenta en las ramas, tallos y peciolos, y cuando se evidencian los tonos pasan de verde a violeta o morados oscuros que cubren parcial o totalmente las partes afectadas de la planta (Montaño y Martínez, 2015). Además, se caracteriza por tener alta cantidad de esporas formando unas masas compactas de color salmón, naranja, o rosadas. La presencia de este hongo en el fruto se da antes de la maduración y presenta los síntomas cuando está madura (Trinidad, et al 2017). Otros de los síntomas es una macha en estilo de lágrima que aparece como regiones necróticas lineales en la fruta que a menudo se pueden convertir en grietas anchas y profundas en la epidermis extendiéndose hacia la pulpa causando un efecto de piel de cocodrilo. (Anaya Martínez, 2022).

4.1.2 *Manejo de la enfermedad*

Es muy común el uso de productos químicos para el control de esta enfermedad, lo cual ha ocasionado desequilibrios en el ecosistema y contaminación ambiental y erosión en los suelos, trayendo consigo impactos negativos al medio ambiente. Es usual aplicar fungicidas cúpricos que actúan de forma preventiva como el hidróxido de cobre, oxicloruro de cobre, y se aconseja aplicar antes de la floración.

Según Jiménez (2020), para tener un buen manejo del cultivo se debe seleccionar la zona con las condiciones adecuadas para el cultivo, de igual forma tener una buena amplitud de siembra que permita una correcta aireación en el cultivo. De acuerdo con lo planteado Montaño, (2015) recomienda realizar las podas sanitarias periódicamente, recoger los residuos de la poda y retirarlos del lote, efectuar el manejo de arvenses, garantizando una buena aireación para el cultivo. Asimismo,

Alava, (2022) menciona que para tener unas medidas de prevención y control de las enfermedades ocasionadas por *Colletotrichum* sp. se deben realizar prácticas culturales como son; establecer diseño de siembra, barreras alelopáticas, podas sanitarias, aplicación de trichoderma, rotación de cultivos, limpiar y desinfectar las herramientas y el suelo antes de plantar (Altieri et al, 1995).

4.1.3 *Control químico*

Para el control de antracnosis los productos más destacados por su uso en las casas comerciales son los funguicidas cúpricos, como lo es el hidróxido de cobre y el oxicloruro de cobre, sé aplican de manera preventiva antes de la floración y 15 días previos a la germinación de la semilla, estas aplicaciones se deben realizar semanalmente, mediante aspersión. (Jiménez, 2020).de igual forma se debe de efectuar una aplicación de manera preventiva de funguicidas, de tipo protectantes como el mancozeb y clorotalonil. Existen biopreparados, como caldos y AE, que han demostrado eficacia en la reducción de microorganismos causantes de enfermedades en cultivos, ofreciendo alternativas sostenibles a los agroquímicos tradicionales. Las aplicaciones deben realizarse semanalmente durante épocas de lluvia y en condiciones de sequía realizar aplicaciones con periodos de distancias de 15 a 22 días para la aplicación (Vera, 2020).

4.1.4 *Colletotrichum sp*

Como señala Jiménez (2020), el C*olletotrichum* sp. es uno de los géneros, reconocidos mundialmente como patógenos, especialmente en regiones tropicales y subtropicales. Dentro de este género, las especies; *C.gloesporoides, C.acutamun y C.orbiculare,* son consideradas como especies más importantes . Las variedades de este género poseen la capacidad de producir enzimas que degradan los componentes estructurales de los tejidos vegetales y algunas son capaces de provocar

muerte celular, existen dos clases de enzimas una que degradan los carbohidratos y por ende disuelven la pared celular y otra que dan lugar a la hidrolisis de las cutículas. Las especies de *Colletotrichum* son variables, manifestándose en los rasgos como; morfología de la colonia, la forma de los conidios, pigmentación, patogenicidad, sensibilidad a funguicidas, presencia de vellosidades. Además, el género *Colletotrichum* cuenta con un extenso número de especies, el cual se han considerado como las especies que lideran el grupo de hongos patógenos en las plantas y este, está presente en zonas templadas como tropicales, se caracteriza por su amplia gama de hospedantes y la capacidad para infectar diversas plantas, y de igual forma por su ciclo de vida complejo con estados anamorfos: producción de estructuras asexuales; conidios; esporas de reproducción asexual y teleomorfos: se caracteriza por la producción de estructuras sexuales; ascos, esporas de reproducción sexual (Ríos, 2023).

En la siguiente Tabla.1 se encuentra la clasificación taxonómica del *Colletotrichum* sp.

Tabla 1.*Clasificación taxonómica de Colletotrichum* sp.

Reino	**Fungi**
Filum	Ascomycota
Subfilum	Pezizomycota
Class	Sordariomycetes
Orden	Glomerellales
Familia	Glomerellaceae
Género	*Colletotrichum*

4.2 Métodos de control

4.2.1 *Aceites esenciales*

Los aceites esenciales (AE) son compuestos obtenidos a partir de vegetales, de olor intenso, son una mezcla de sustancias químicas, no grasas, insolubles en agua y solubles en alcohol, grasas y ceras vegetales. Las plantas aromáticas contienen un potencial el cual puede ser aprovechado por el hombre en beneficio propio y en diversas actividades, el cual se extraen la concentración de dichas sustancias que contienen en los diferentes tejidos y órganos; hojas, tallo, fruto, flores, raíces, etc. Producto de su metabolismo secundario. Los AE son productos o sustancias volátiles sintetizadas por plantas aromáticas presentan importancia comercial, debido a su uso en diversas industrias destacando la industria alimentaria y farmacéutica (Jiménez, 2020).

Las plantas producen AE como metabolitos secundarios por el estrés fisiológico, ataques de patógenos o factores ecológicos, los AE pueden varían en composición conforme a muchos factores entre ellos el tipo de planta, especie y género están principalmente constituidos por una base integrada de hidrocarburos terpénicos que consisten en más de cinco estructuras de isopreno, entre lo más comunes se encuentran los monoterpenoide y los sesquiterpenoides. Han sido usados como funguicidas gracias a las propiedades antimicrobianas, en los últimos estudios han demostrado que los hidrocarburos monoterpenos, monorterperos oxigenados, los sesquiterpernos y los compuestos fenólicos son responsables de inhibir el crecimiento de varios hongos. La inhibición del crecimiento de los patógenos fúngicos se debe a que el AE causa daños en la pared celular y la membrana celular al penetrar en las paredes celulares de las hifas fúngicas a base de quitina, de igual forma a la inhibición de la respiración y a la alteración de las barreras de permeabilidad de las estructuras de la membrana celular, donde los compuestos naturales actúan sobre los mecanismos internos del hongo generando malformación de estructuras importantes, granulación citoplasmática, desorganización

del contenido celular, alteración de la membrana plasmática e inhibición de enzimas fúngicas, lo que inhibe la germinación, el alargamiento del tubo germinal y la reducción o inhibición del crecimiento de micelios (Sánchez & Sandoval, 2020).

4.2.2 *Actividad biocontroladora de los AE*

Según Jiménez (2020), los AE tienen una actividad biocontroladora debido al contenido de los metabolitos secundarios, los cuales se asocian al control biológico de organismos fitopatógenos y pueden llegar activar mecanismos de defensas en las plantas, brindando protección preventiva a la mismas. Por otra parte, Oladeji et al, (2019) afirma que se reconocen más de 3000 metabolitos secundarios de origen vegetal con variedad de actividad biológica frente a la diversidad de insectos, estos metabolitos contienen estructuras químicas el cual de acuerdo con su sistema pueden defenderse de condiciones adversas de estrés biótico.

4.2.3 *Aceite esencial de eucalipto*

Eucalipto (*E. globulus*) está conformado por más de 900 especies y subespecies, organizado taxonómicamente en las mirtáceas (Ver Tabla 2). *E. globulus* es la más usada a nivel mundial, es un árbol que vive en zonas bajas, hasta los 300 m de altitud, permanece en suelos arenosos-arcillosos, es cultivado como forestal y se puede asilvestrar, este árbol tiene glándulas de AE en sus hojas, los cuales producen un olor característico y poseen componentes que pueden ser diferenciados en productos químicos de valor industrial. Está planta contiene propiedades antinflamatorias, antisépticas, antiinfecciosas, antirreumáticas, desodorantes y mucolíticas (Sánchez & Sandoval,2020).

Las hojas de *E. globulus* presentan una composición de aceite esencial cuyo principal constituyente es el 1,8-cineol o eucaliptol (eter oxido terpenico) además, contienen: alfa-pineno, d-limoneno, p-cimeno, alfa-felandreno, canfeno, gamma-terpineol, sesquiterpenos, ácidos, taninos, pigmentos flavónicos, entre otros los cuales le otorgan propiedades antisépticas, bacteriostáticas, insecticidas y fungicidas. Además, el extracto de *E. globulus* podría ser utilizado como agente bioactivo natural, debido a la interacción con los constituyentes de la membrana celular, causando reducción de la fluidez de la membrana. También se destaca por ser eficaces al inhibir el crecimiento y eliminar tres bacterias grampositivas (*Staphylococcus. aureus, Listeria. innocua* y *Bacillus cereus*) y tres bacterias gramnegativas *(Escherichia coli, Pseudomonas. aeruginosa* y *Salmonella* sp.*),* donde las grampositivas fueron más susceptibles a los extractos (Sánchez & Sandoval,2020).

Tabla 2.*Clasificación taxonómica de eucalipto*

Nombre científico	***Eucalyptus globulus***
Reino	*Plantae*
Clase	*Magnoliopsida*
Familia	*Myrtaceae*
Genero	*Eucalyptus*
Especie	*Eucalyptus globulus;*Labill

Tabla 2. (Espinoza & Moran, 2021).

4.2.4 *Aceite esencial de citronella*

Según Monteiro (2017) la citronella es una planta originaria del sur este asiático con una alta distribución en Guatemala, incluida en el grupo de las poaceas (ver Tabla 3), familia que incluye alrededor de 140 especies y es muy conocida por el uso en bebidas y medicina natural, sus propiedades medicinales la reconocen como analgésica, antinflamatoria, antiasmático, expectorante y antiespasmódica de igual forma en la industria cosmética, perfumería. Los componentes principales son el citonelal, geraniol, citronelol; considerado como un repelente de insectos. El aceite

extraído de la citronella está compuesto por monoterpenos y sesquiterpenos el cual contiene una actividad biológica en repeler insectos, larvas y actividades de prevención de bacterias en el aire y con propiedades desodorizantes capaz de combatir enfermedades fúngicas.

Tabla 3. *Clasificación taxonómica de citronella*

Reino	**Plantae**
División	*Magnoliophyta*
Clase	*Liliopsida*
Orden	*Poales*
Familia	*Poaceae*
Genero	*Cymbopogon*
Especie	*Citrato*

Tabla 3. (Oladeji et al 2019).

4.2.5 *Control con productos de síntesis química*

El carbendazim (FORDAZIM 5FW) es un funguicida sistémico, dé acción curativa y preventiva que impide la instalación y proliferación del hongo, actúa inhibiendo la síntesis de la beta tubulina mediante la mitosis. (Llanos, 2017). Según estudios se concluye que el funguicida thiram + carbendazim demostró la máxima eficacia para inhibir el crecimiento *in vitro* de todos los patógenos. El carbendazim es ligeramente peligroso, perteneciente al grupo químico de los Benzimidales. (Crovo, 2015)

CAPITULO V

5 Materiales y métodos

5.1 Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de diagnóstico fitosanitario del Instituto Colombiano Agropecuario-ICA en el municipio de Villavicencio-Meta, que está ubicado en la transversal 23 #19-09 del Barrio San Cristóbal , donde se realizaron todas los análisis de este debido estudio y la evidencia de que este patógeno está afectando los cultivos de los granja agroecológica UNIMINUTO, dónde se comprobó visualmente la sintomatología del hongo afectando los s cultivos de café (*Coffea)* , de cacao (*Theobroma cacao)* , de achiote (*Bixa orellana)* y de guanábana(*Annona muricata)* entre otros cultivos de este sitio según lo reportado por investigaciones anteriores(Figueroa y Velasco,2022).

5.2 Técnicas

Para cumplir con los objetivos propuestos en este estudio se utilizó la siguiente técnica e instrumentos

5.2.1 *Obtención de cepas fúngicas.*

La población objetivo está constituida por una cepa de *Colletotrichum* sp., la cual fue obtenida en un estudio previo, realizado por Figueroa y Velasco (2022). En las instalaciones de la Granja Agroecológica UNIMINUTO, esta cepa fue caracterizada morfológicamente y fue cedida como material de referencia para el presente estudio (**Figura 1**).

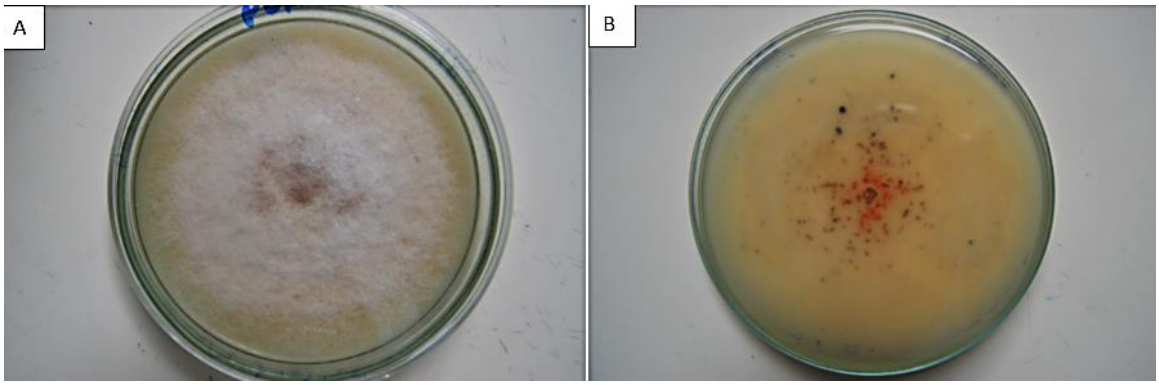


Figura 1. *Cepa de Colletotrichum* sp.*, referencia utilizada en el estudio. (A) Crecimiento del hongo vista del anverso de la caja Petri y la colonia. (B) Crecimiento del hongo vista del reverso de la caja Petri y la colonia.*

A partir de la cepa se realizaron cultivos puros y se hicieron siembras en medio PDA para obtener 11 colonias de la misma (una por cada tratamiento a evaluar). Fueron incubadas a una temperatura de 25°C durante 15 días, a la espera de formación de estructuras reproductivas. Una vez pasado el tiempo mencionado se procedió a sacar porciones circulares de aproximadamente 5 mm de diámetro, las cuales fueron utilizadas para realizar las posteriores pruebas *in vitro* de crecimiento e inhibición del hongo *Colletotrichum* sp., frente a los tratamientos descritos en la **Tabla 4**. En cada tratamiento se utilizaron 6 repeticiones (**Figura 2, Tabla 4**).

5.3 Procedimientos

5.3.1 *Etapa I. Análisis de la tasa de crecimiento micelial del Colletotrichum sp.:*

5.3.1.1 Bioensayos Inhibitorios

5.3.1.1.1 Procesamiento de las muestras en el laboratorio: dilución de los AE en distintas concentraciones y pruebas de antagonismo:

Los AE fueron adquiridos a través de la compra de los mismos a una casa comercial denominada FUNAT (Lote FC0510122 y FC2180922). Estos, se disolvieron, mezclaron y homogenizaron mediante agitación en frascos Shot de 500mL que contenían medios de cultivo líquidos de PDA, previamente esterilizados. Posteriormente, se añadieron concentraciones separadas de 100, 200 y 300 µg/ml, de los AE, según fueran requeridas de acuerdo con el tratamiento descrito en la **Tabla 4**. Los AE y el fungicida, antes de ser agregado al medio fueron esterilizados por filtración con filtros de 0,2 µm (**Figura 4**).

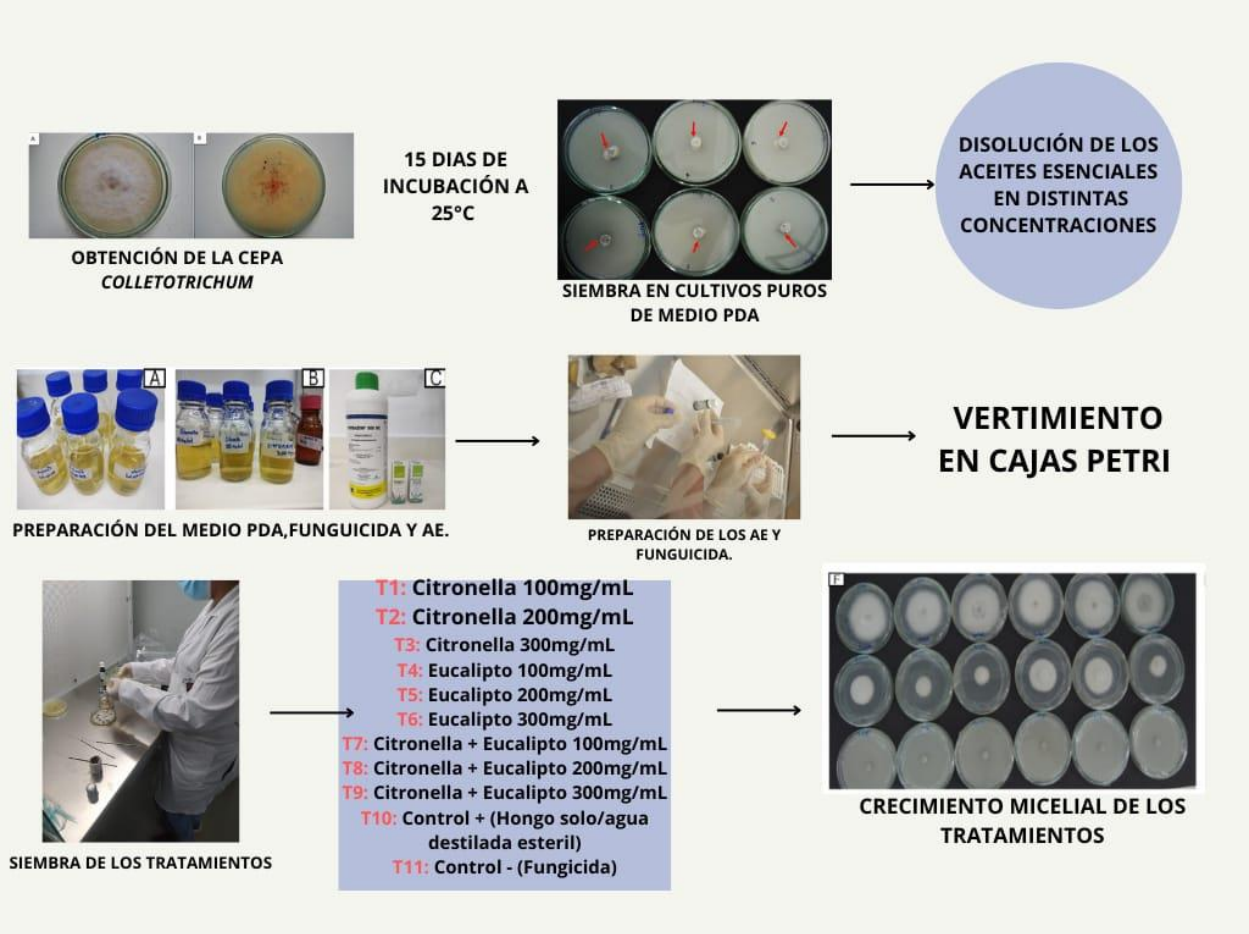


Figura 2. *Porciones del hongo Colletotrichum* sp.*, como inoculante las pruebas de crecimiento e inhibición en medio PDA con cada tratamiento. En la imagen se muestra el procedimiento del medio PDA y la siembra del hongo.*

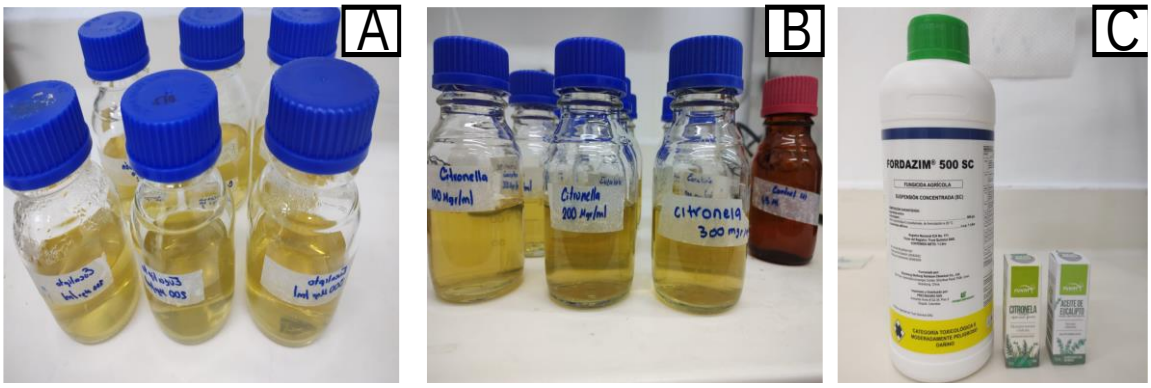


Figura 3. ***(****A) y (B); Preparación del medio PDA con los diferentes tratamientos diluidos y homogenizados. (C); fungicida FORDAZIM y AE utilizados en el estudio.*

Los AE fueron adquiridos a través de la compra de los mismos a una casa comercial denominada FUNAT (Lote FC0510122 y FC2180922). Estos, se disolvieron, mezclaron y homogenizaron mediante agitación en frascos Shot de 500mL que contenían medios de cultivo líquidos de PDA, previamente esterilizados. Posteriormente, se añadieron concentraciones separadas de 100, 200 y 300 µg/ml, de los AE, según fueran requeridas de acuerdo con el tratamiento descrito en la **Tabla 4**. Los AE y el fungicida, antes de ser agregado al medio fueron esterilizados por filtración con filtros de 0,2 µm (**Figura 4**).



Figura 4. *Proceso de esterilización de los AE y el fungicida mediante filtración.*

Luego, se vertieron en cajas de Petri de dimensiones de 90 x 15 milímetros.

En el centro de cada caja, se colocó un disco de agar con un diámetro de 5 mm, inoculado con el patógeno. Las cajas con los diferentes tratamientos se incubaron a una temperatura de 25 °C durante un período de 11 días. Diariamente, se registró el crecimiento micelial utilizando un calibrador vernier. Se llevó a cabo seis repeticiones para cada concentración de AE. Las cajas de Petri de control positivo (+), por su parte, contenían únicamente medio de cultivo PDA sin adición de AE. La evaluación se dió por concluida cuando el micelio en la placa de agar del grupo de control alcanzó los bordes de las cajas (Barrera y Barrera, 2008), es decir abarco la totalidad de la caja.

Tabla 4. *Tratamientos para el análisis de la actividad inhibitoria de los AE*

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	REPETICIONES
T1**: Citronella 100mg/mL**	Medio PDA con AE de citronella [100 mg] por cada mL de medio preparado.	6
T2**: Citronella 200mg/mL**	Medio PDA con AE de citronella [200 mg] por cada mL de medio preparado.	6
T3**: Citronella 300mg/mL**	Medio PDA con AE de citronella [300 mg] por cada mL de medio preparado.	6
T4**: Eucalipto 100mg/mL**	Medio PDA con AE de eucalipto [100 mg] por cada mL de medio preparado.	6
T5**: Eucalipto 200mg/mL**	Medio PDA con AE de eucalipto [200 mg] por cada mL de medio preparado.	6
T6: **Eucalipto 300mg/mL**	Medio PDA con AE de eucalipto [300 mg] por cada mL de medio preparado.	6
T7**: Citronella + Eucalipto 100mg/mL**	Medio PDA con AE de citronella [100 mg] y AE de eucalipto [100 mg] por cada mL de medio preparado.	6
T8**: Citronella + Eucalipto 200mg/mL**	Medio PDA con AE de citronella [200 mg] y AE de eucalipto [200 mg] por cada mL de medio preparado.	6
T9**: Citronella + Eucalipto 300mg/mL**	Medio PDA con AE de citronella [300 mg] y AE de eucalipto [300 mg] por cada mL de medio preparado.	6
T10**:** Control + **(Hongo solo/agua destilada esteril)**	Medio PDA preparado convencionalmente, con solo agua destilada estéril.	6
T11**:** Control - (**Fungicida)**	Medio PDA con fungicida Fordazim a concentración recomendada por el fabricante 80 mL/100 L agua, es decir 400 µL de fungicida en 500 ml de medio preparado.	6
Cajas Total:		66

Fuente: Autoras, 2024.

Se empleó la técnica del muestreo probabilístico estratificado como método de elección para la obtención de datos. Estos datos fueron categorizados porcentualmente, ya que en cada repetición se llevaron a cabo pruebas de antagonismo *in vitro* utilizando el hongo *Colletotrichum* sp., y una selección de AE estratificados. Estas pruebas comprenden la evaluación de diversos parámetros, como el crecimiento del hongo, la inhibición de su desarrollo, o cualquier otro indicador relevante para medir el grado de antagonismo.

5.3.2 *Etapa 2. Medición del porcentaje de inhibición de dos AE frente al Colletotrichum sp:*

5.3.2.1 Tasa de crecimiento micelial:

La tasa de crecimiento micelial fue medida en mm por día, determinando y teniendo en cuenta el diámetro de crecimiento de la colonia fúngica en cuanto al testigo para generar comparaciones con los diferentes tratamientos, de calculando su magnitud mediante la expresión sugerida por Velasco (2018) y Mead et al, (1993):

$$T.C= (Cf -Ci) / (Tf-Ti).$$

Dónde:

- Cf: es el crecimiento final expresado en mm.
- Ci: es el crecimiento inicial (día uno) expresado en mm.
- Tf: es el tiempo final en días
- Ti: es el tiempo inicial en días

5.3.2.2 Calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento de Colletotrichum sp. en comparación con el control positivo.

El cálculo del porcentaje de inhibición se realizó siguiendo la metodología propuesta por Villota-Burbano & Vazquez-Ochoa, 2021, en la que se mide el crecimiento radial de la colonia del hongo en cada uno de los medios con los diferentes tratamientos y se aplica la siguiente formula:

%Inhibición= ((Crecimiento del control positivo pasado los 11 días-Crecimiento del hongo en el tratamiento) / Crecimiento del control positivo pasado los 11 días))*10

5.3.2.3 Conteo de esporas de los tratamientos

Para realizar el conteo de esporas con la cámara de Neubauer, primero se realizó un raspado del micelio en la caja Petri y se adicionó 9 ml de agua destilada estéril, el contenido de la misma se vertió en un tubo falcon de 15ml y se homogenizó con la ayuda de un vortex durante un minuto. Posteriormente, se decantó la solución con un embudo de vidrio y papel filtro. Se tomó la solución de esporas contenida del tubo falcon para realizar el conteo de esporas presentes en la solución. De esta, se tomó 50µL de solución y montó en la cámara de Neubauer, asegurándose llenar todos los espacios de la misma. A continuación, se usó un microscopio para observar la cámara de Neubauer y se procedió a contar las esporas presentes en las áreas de conteo (**Figura 5**). Este proceso se repitió 27 veces por cada repetición de los tratamientos. Finalmente se empleó una fórmula para calcular la concentración de esporas en la muestra, teniendo en cuenta el factor de dilución y el volumen de la muestra (García, 2020).

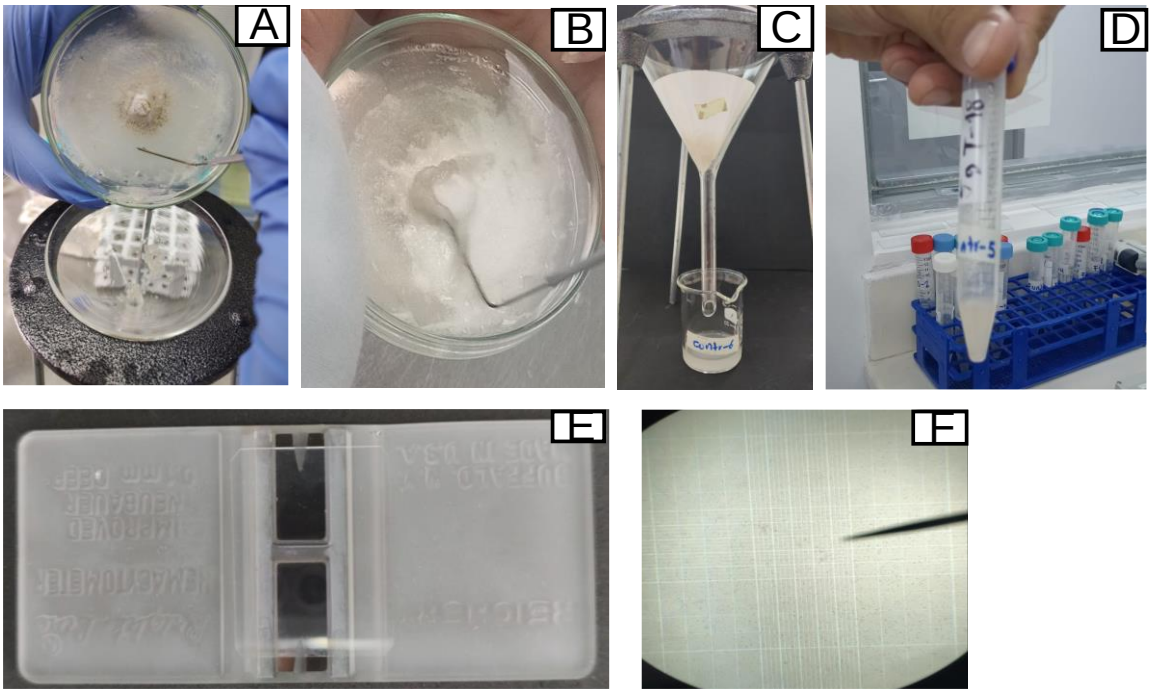


Figura 5. *Proceso relacionado con el conteo de esporas en los tratamientos**.** (A) y (B); Raspado del medio PDA con Colletotrichum. (C); Decantación de esporas del Colletotrichum. (D); Tubos de ensayos con muestras de esporas. (F); Cámara Neubauer. (F); Conteo de esporas en cámara Neubauer observado en microscopio.*

5.4 Análisis de los resultados:

Se realizaron comparación de los promedios de las mediciones, mediante una ANOVA de una vía con una prueba comparativa de Tukey, para determinar si existían o no diferencias significativas entre tratamientos en las variables de % de inhibición y el número de esporas. Para el caso de inhibición, adicionalmente se realizó una ANOVA de una vía usando la prueba comparativa de Dunnet, con el propósito de saber si el tratamiento 11, del fungicida, presentaba diferencias frente a los demás tratamientos. Dichos procesos o análisis estadísticos se realizaron con el programa SIGMA PLOT versión 11.

El motivo de selección de las pruebas estadísticas se realizó según la clasificación estadística descrita por Flores et al., (2017) y teniendo en cuenta el comportamiento de las variables analizadas.

CAPITULO VI

6 Resultados y discusión

6.1 Determinación del efecto antifúngico de los AE sobre el crecimiento micelial y esporulación del hongo fitopatógeno.

Al realizar una ANOVA de una vía con la prueba comparativa de El experimento comenzó el 21 de julio de 2023, y se realizaron mediciones clave del crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum* sp. a los 6 y 11 días después de la siembra. A los 11 días, el testigo (hongo sin tratamiento) había cubierto completamente el diámetro de la caja Petri (90 mm). A los 6 días, el testigo mostró un crecimiento promedio de 75 mm, comparando con los tratamientos de eucalipto sucedió lo siguiente, el tratamiento T4 presentó un crecimiento promedio de 65 mm en el mismo lapso, mientras que T5 mostró un crecimiento más variable, con un máximo de 50 mm y un mínimo de 31 mm. Por otro lado, T6 resultó en un crecimiento promedio de 30 mm en dos repeticiones. En los tratamientos mencionados en todos los casos se considera que los crecimientos fueron similares y sin deformaciones aparentes en las colonias. En caso contrario se observaron que los tratamientos T1, T2, T3, T7, T8 y T9 presentaron una tasa de crecimiento de cero (0), es decir, citronella no permitió el desarrollo del micelio, recalcando su efecto solo o acompañado de eucalipto.

Para la evaluación de la esporulación, se empleó la cámara de Neubauer. En donde los resultados mostraron: citronella, que todos sus tratamientos y las combinaciones con eucalipto inhibieron completamente la esporulación ya que se evidencio bajo el lente de microscopio ausencia de esporas al momento del conteo en cámara de Neubauer. En contraste, los tratamientos con eucalipto indicaron los siguientes: T4 presento una esporulación de 4,6 conidios/mL, T5 se

encontraron 2,1 conidios/mL y T6 solo 2 conidios/mL. El T10 tuvo una esporulación significativa de 255,2 conidios/mL, mientras que el control con fungicida (T11) mostró solo 0,6 conidios/mL.

Los resultados obtenidos demostraron que la citronella, en todas las concentraciones probadas (100, 200 y 300 mg/ml), presentó una inhibición completa de la esporulación del hongo. Estos hallazgos sugieren que la citronella puede ser considerada como una opción viable y efectiva para detener o prevenir la propagación de la infección por *Colletotrichum* en cultivos agrícolas.

Por otro lado, los resultados variaron en función de la concentración y tipo de aceite esencial de eucalipto utilizado. Se observó que el eucalipto a una concentración de 300 mg/ml mostró un efecto fungistatico significativo sobre el crecimiento micelial, mientras que concentraciones más bajas (200 y 100 mg/ml) resultaron en una efectividad reducida. Lo anterior, se evidencia en la **Figura 6**, en la que el crecimiento micelial en T4 fue similar o cercano a lo observado con el control positivo, en el que el hongo *Colletotrichum* sp., no estaba siendo sometido a la aplicación de AE o fungicida. Esta variabilidad en los resultados podría atribuirse en parte a la composición química y las propiedades intrínsecas de los AE utilizados, así como a la posible interacción entre los componentes de los AE y el hongo (Ortiz, 2018). así mismo se deduce que es viable el uso de los AE de eucalipto (*E,globulus*) y citronela(*C, winterianus*) para el control de *Colletotrichum* sp., debido a las propiedades antifúngicas fungistáticas que poseen, de igual manera su menor impacto ambiental en comparación con funguicidas químicos, reducción de resistencia de patógenos.

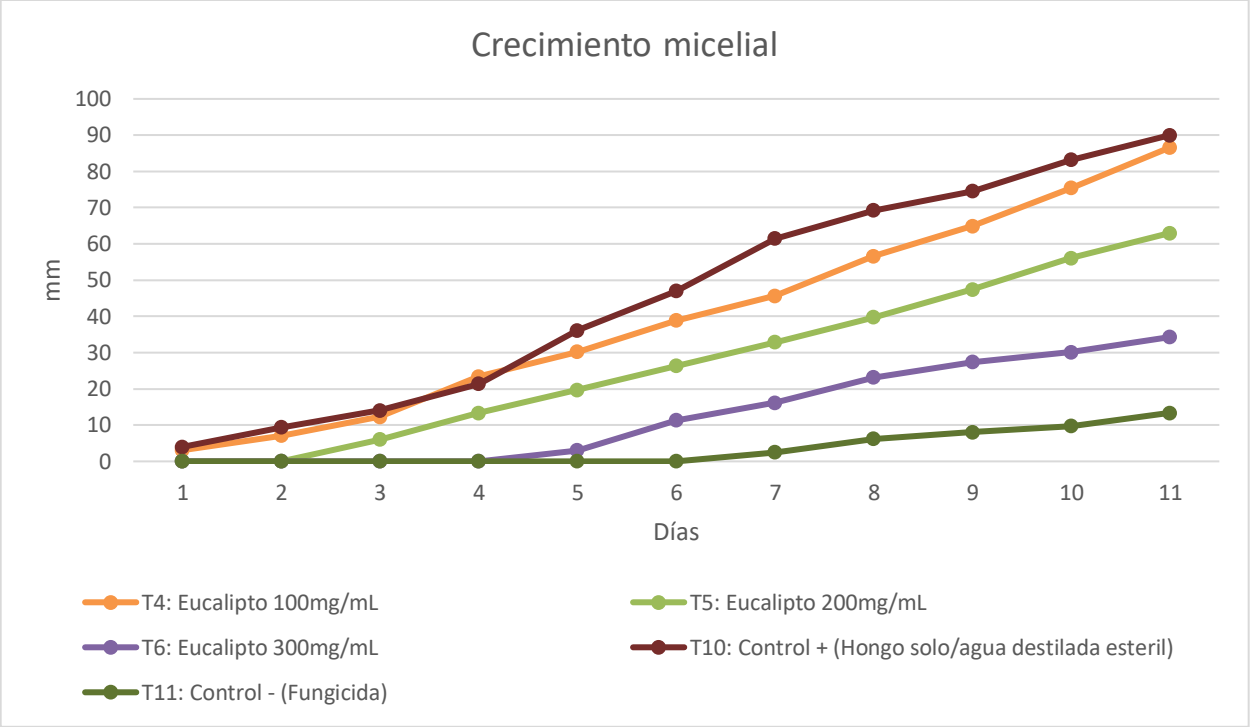


Figura 1. *Representación del crecimiento micelial del hongo Colletotrichum* sp., *en presencia del tratamiento de eucalipto.*

La combinación de citronella y eucalipto resultó en una inhibición total del crecimiento micelial del hongo, lo que sugiere un posible efecto sinérgico entre estos dos AE en términos de actividad antifúngica. Este hallazgo, respalda la idea planteada en distintos estudios donde se ha evaluado la actividad antifúngica de los AE de citronella y eucalipto frente al agente causal de la antracnosis, los resultados sugieren realizar la combinación de diferentes AE ya que puede potenciar sus efectos individuales y mejorar su eficacia como agentes antifúngicos (Ortiz, 2018).

El fungicida químico Fordazim, por otro lado, mostró una eficacia relativamente baja en comparación con algunas concentraciones los AE con una tasa de crecimiento micelial promedio de 0.134 cm. Por su parte, los tratamientos con AE de Eucalipto, T4, T5 y T6 presentaron tasas de crecimiento de 0.866, 0.900 y 0.685, respectivamente. Esta diferencia en la eficacia podría atribuirse

a las diferencias en el mecanismo de acción y la selectividad de los ingredientes activos entre los productos químicos y los AE.

6.1.1 *Cuantificación del porcentaje de inhibición de los AE frente al Colletotrichum sp:*

En concordancia con lo observado en el desarrollo del micelio, los resultados obtenidos indicaron que la citronella exhibió una inhibición total del crecimiento micelial del hongo en todas las concentraciones probadas (100, 200 y 300 mg/ml), lo que sugiere un alto potencial como agente antifúngico (**Figura 7 y Figura 8**). Esta efectividad podría atribuirse a la presencia de compuestos activos en la citronella, como citronelal y citronelol, que han demostrado poseer propiedades antifúngicas en estudios previos. Además, el estudio realizado por Arribas (2018), respalda esta afirmación debido a sus resultados ya que el aceite de citronella demostró una notable reducción del desarrollo del micelio.

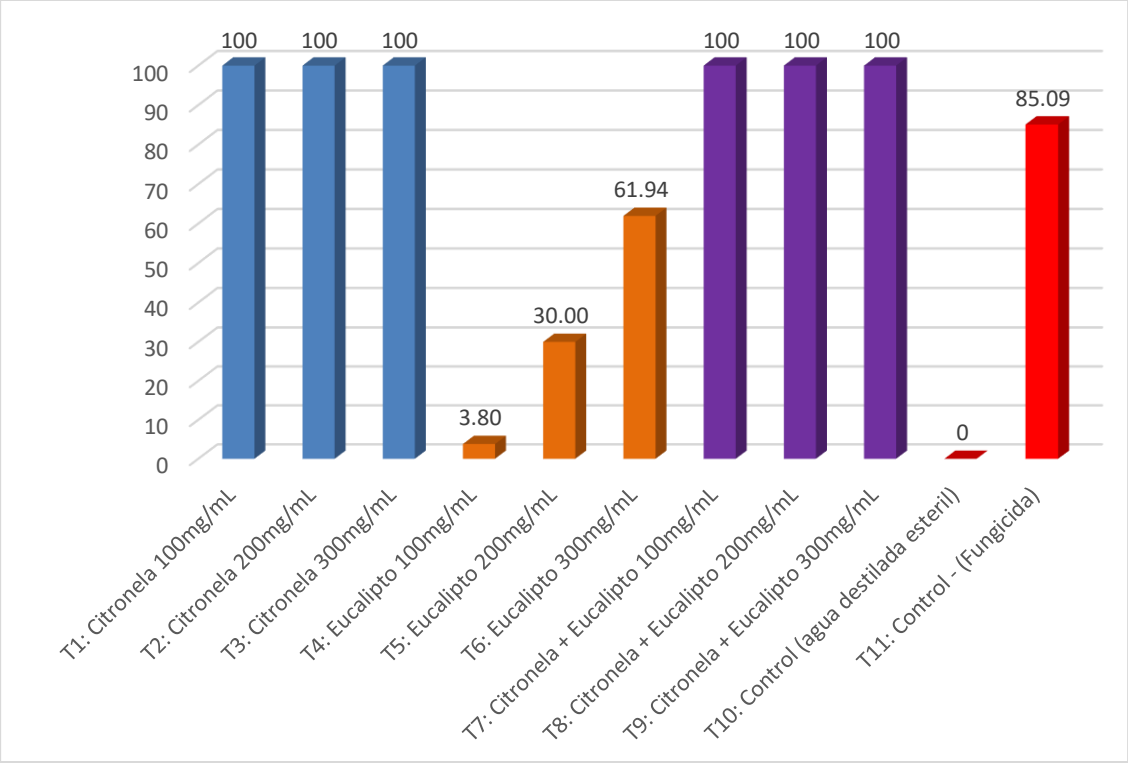


Figura 2. *Resultados del porcentaje de inhibición del hongo colletotrichum* sp.*, frente a los tratamientos evaluados en el estudio.*

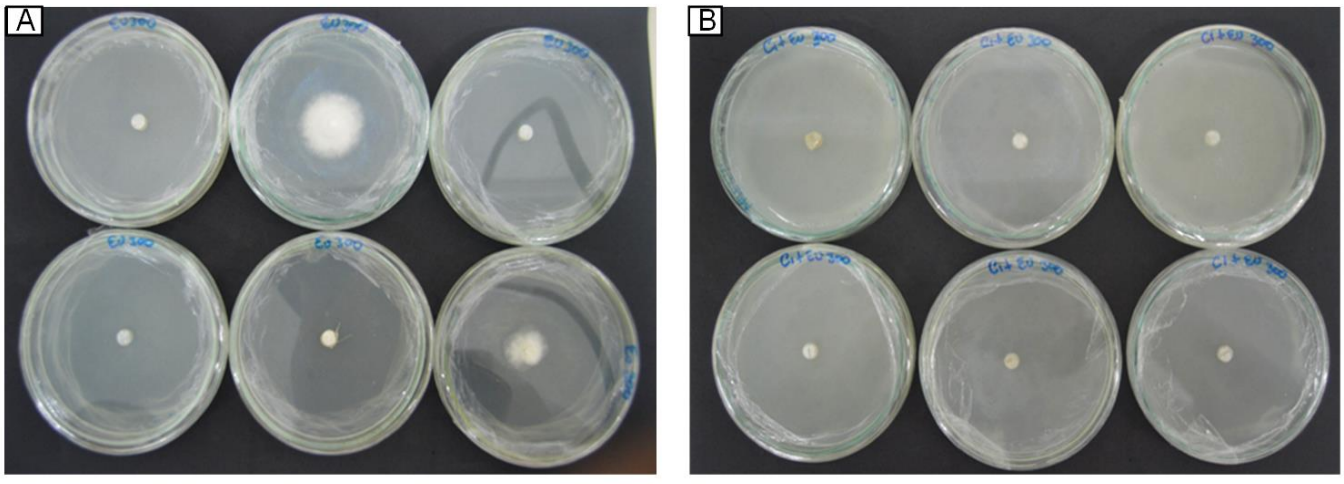


Figura 3*. (A); Tratamiento del medio de Eucalipto al 300mg/ml. (B); Tratamiento citronella + eucalipto al 300 mg/ml****.***

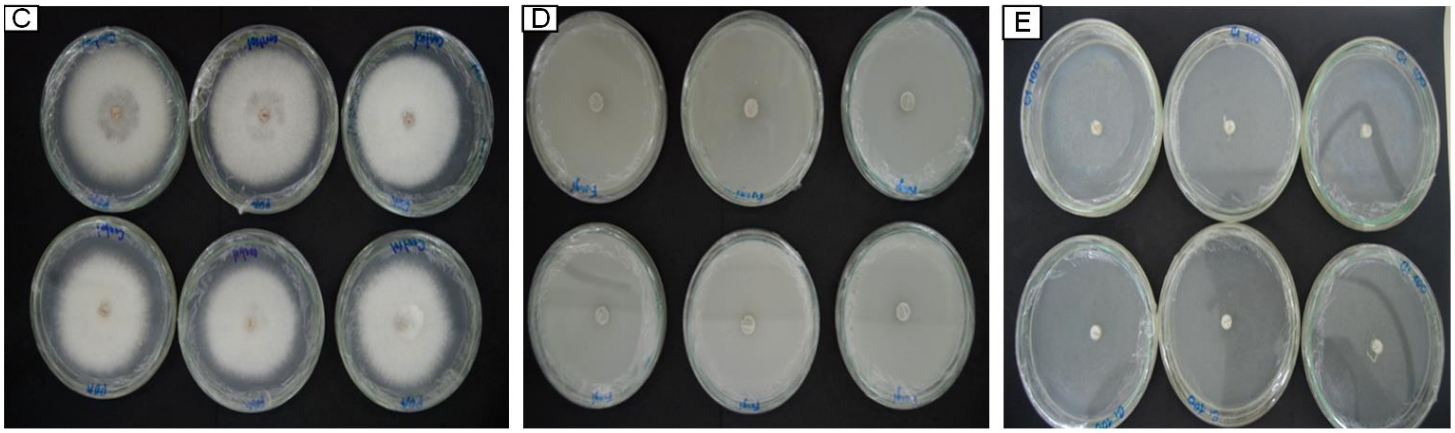


Figura 4*. (C); Tratamiento control del medio. (D); Tratamiento del fungicida FORDAZIM. (E)Tratamiento citronella al 100 mg/ml.*

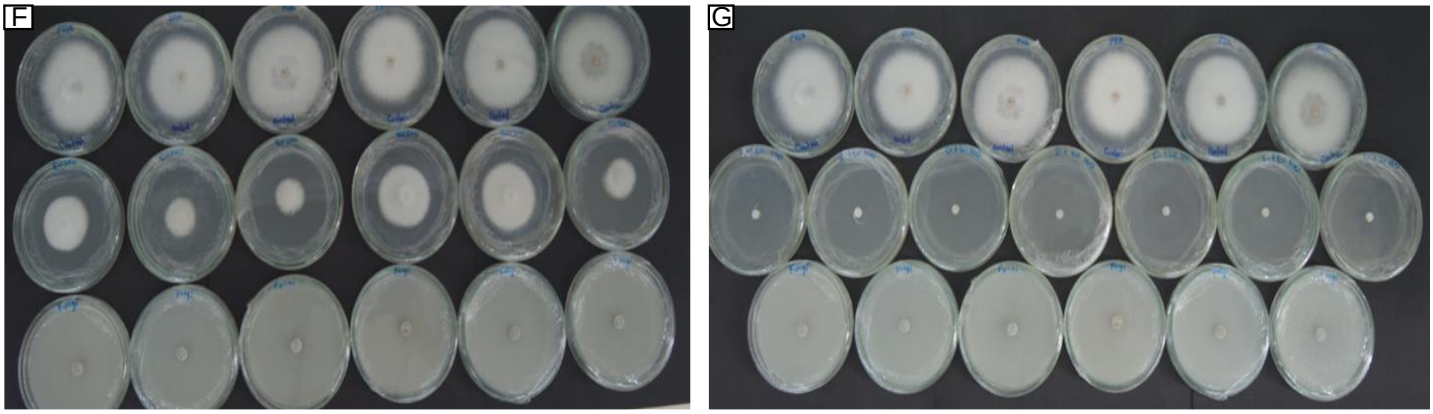


Figura 5. *(F y G) comparación visual del crecimiento micelial en los tratamientos; eucalipto, citronella, control. fungicida al 100,200 y 300 mg/ml.*

De acuerdo a la clasificación de la clasificación de Benítez et al. (2007), los tratamientos en los que se utilizó aceite esencial de citronella, sola o en conjunto con eucalipto presentaron una inhibición positiva, de acuerdo al análisis estadístico en comparación con los controles. Así mismo, resultados se pueden clasificar según, el comportamiento de inhibición mostrado por los diferentes tratamientos de la siguiente manera, utilizando la clasificación de Benítez et al. (2007):

Tabla 5 *Resultados de los porcentajes de inhibición.*

Tratamiento	Dosificación y porcentajes de inhibición
AE de Citronella	100 mg /ml: positivo 200 mg/ml: positivo 300 mg/ml: positivo
AE de Eucalipto	100 mg/ml: baja 200 mg/ml: media 300 mg/ml: media
Mezcla de ambos AE (Eucalipto y Citronella)	100 mg /ml: positivo 200 mg/ml: positivo 300 mg/ml: positivo
Control + (Agua destilada)	Negativo
Control + (FungicidaFordazim)	Positivo

Estas clasificaciones se basan en el porcentaje de inhibición promedio obtenido para cada tratamiento, donde se considera la presencia o ausencia de zona de inhibición y el porcentaje de inhibición en comparación con el control.

Por otro lado, los tratamientos con AE de eucalipto mostraron resultados variables en función de la concentración utilizada. Mientras que el tratamiento de eucalipto a una concentración de 300 mg/ml demostró una inhibición significativa del crecimiento micelial, con un porcentaje promedio del 61.94%, los tratamientos a concentraciones más bajas (100 y 200 mg/ml) exhibieron una efectividad menor, con porcentajes de inhibición del 3.80% y 30.00% respectivamente. Esta variabilidad en la efectividad podría atribuirse a la composición química específica del AE de eucalipto, que puede variar dependiendo de factores como la especie de eucalipto y el método de extracción del AE, “el tipo de extracción se elige según el propósito del uso. El producto de extracción puede variar en calidad, cantidad y composición según el clima, composición del suelo, órgano de la planta, edad y etapa del ciclo vegetativo” Bakkali et al. (2008).

La combinación de citronella y eucalipto resultó en una inhibición total del crecimiento micelial del hongo, lo que sugiere un posible efecto sinérgico entre estos dos AE en términos de actividad antifúngica. Este hallazgo respalda la idea de que la combinación de diferentes AE puede potenciar sus efectos individuales y mejorar su eficacia como agentes antifúngicos, lo común de estos dos hidrolatos es la presencia de los sesquiterpenos, pero más los que actúan como fitoalexinas como lo menciona Pietrobelli et al. (2020), ya que atacan en defensa propia frente al patógeno y al aumentar respectivamente sus concentraciones en el medio es más resistente inhibiendo la elongación y crecimiento micelial.

El fungicida químico Fordazim también demostró una alta efectividad en la inhibición del crecimiento micelial del hongo, con un porcentaje promedio del 85.09%. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el uso excesivo de fungicidas químicos puede tener efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud humana, lo que resalta la importancia de explorar alternativas más naturales y sostenibles, como los AE.

Tukey, se observó que si presentaban diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos (P= <0,001). Por otro lado, al tratar de observar si la aplicación de AE como alternativa de control era eficiente en el manejo *in vitro* de *Colletotrichum* sp., se hizó la prueba de comparación múltiple mediante una ANOVA de una vía, comparando al tratamiento 11 con todos los demás (**Tabla 6**), Observándose que los tratamientos con los AE, principalmente el de citronella, genera una inhibió del patógeno. Por lo que, el uso de citronella solo o en combinación se constituye en una alternativa eficiente, para el control del patógeno evaluado.

Tabla 6.*Resultados de la comparación múltiple de los diferentes tratamientos frente al tratamiento 11 mediante mediante una ANOVA de una vía (Dunnett's Method)*

Comparación	Diff of Means	q'	P	P<0,050
T11: Control - vs. T10: Control + (Hongo solo/agua destilada esteril)	85,093	19,482	<0,001	Yes
T11: Control vs. T4: Eucalipto 100mg/mL	81,296	18,613	<0,001	Yes
T11: Control vs. T5: Eucalipto 200mg/mL	55,093	12,614	<0,001	Yes
T11: Control vs. T6: Eucalipto 300mg/mL	23,148	5,3	<0,001	Yes
T11: Control vs. T3: Citronella 300mg/mL	14,907	3,413	<0,001	Yes
T11: Control vs. T1: Citronella 100mg/mL	14,907	3,413	<0,001	Yes
T11: Control vs. T7: Citronella + Eucalipto 100mg/mL	14,907	3,413	<0,001	Yes
T11: Control vs. T8: Citronella + Eucalipto 200mg/mL	14,907	3,413	<0,001	Yes
T11: Control vs. T9: Citronella + Eucalipto 300mg/mL	14,907	3,413	<0,001	Yes
T11: Control vs. T2: Citronella 200mg/mL	14,907	3,413	<0,001	Yes

Por último, se encontró que al analizar la formación de conidios por parte del hongo *Colletotrichum* después de estar bajo la influencia de los tratamientos, a pesar de que presento crecimiento micelio en los tratamientos de con eucalipto (T4, T5 y T6), la generación de estructuras reproductivas se inhibió en gran medida, ya que al comparar estos frente al control positivo (T10), en el que no se hizo ninguna aplicación de AE o fungicida, la producción de esporas fue significativamente menor o nula en los tratamientos en los que se aplicó algún producto (**Tabla 7**).

Según Argote et al. (2017). manifiesta que la inhibición microbiana por medio de uso de AE ha demostrado alta capacidad y desempeño frente a los patógenos en la industria alimentaria. Es importante resaltar esta actividad inhibitoria de estructuras reproductivas, que son la principal fuente de inoculo para la diseminación del patógeno en los cultivos.

Tabla 7*. Conteo de esporas en los tratamientos evaluados. Los resultados se expresan en número de esporas por mL de solución.*

Tratamiento	N° conidios/mL
T1: Citronella 100mg/mL	0
T2: Citronella 200mg/mL	0
T3: Citronella 300mg/mL	0
T4: Eucalipto 100mg/mL	4,6
T5: Eucalipto 200mg/mL	2,1
T6: Eucalipto 300mg/mL	2
T7: Citronella + Eucalipto 100mg/mL	0
T8: Citronella + Eucalipto 200mg/mL	0
T9: Citronella + Eucalipto 300mg/mL	0
T10: Control + (Hongo solo/agua destilada esteril)	255,2
T11: Control - (Fungicida)	0,6

CAPITULO VII

7 Conclusión

- El uso de AE, principalmente citronella, o en combinación con eucalipto se constituye en una alternativa eficiente, para el control del *Colletotrichum* sp., que merece ser evaluado en campo.
- El uso del AE de Eucalipto es una alternativa importante en el control del patógeno en estudio, y a pesar de tener deficiencias en el control del crecimiento de micelio, se demuestra que tiene una fuerte acción sobre la inhibición de estructuras reproductivas del patógeno, lo cual, requiere seguir siendo evaluado.
- Los resultados obtenidos con el fungicida evaluado, permite evidenciar que los productos químicos de síntesis industrial también pueden tener un efecto limitado y no total de los patógenos que se controlan, por lo que es importante acompañar con diferentes estrategias de manejo.
- Para concluir este estudio fue muy exitoso debido a que se pudo comprobar que tan eficaz es el uso de plantas aromáticas y sus componentes, que hacen posible el control de este patógeno en medio de cultivo *in vitro* ,así mismo se vio reflejada el manejo agroecológico que se le da a los cultivos de una manera más amigable con el medio ambiente teniendo muy en cuenta la economía del pequeño agricultor, la salud humana y la producción inocua resaltando las prácticas agroecológicas dándole un equilibrio al ecosistema y brindando una sinergia a todo el sistema que se quiere brindar con esta alternativa del uso de AE.

CAPÍTULO VIII
8 Referencias

Argote Vega, F, E. Suarez Montenegro, Z. J. Tobar Delgado, M.G. Pérez Álvarez,J.A. Hurtado Benavides , A .M .Delgado Ospina ,J . (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli.* https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6230654

Anaya Martínez,N.J.(2022). Evaluación de productos Biológico y Químicos para el control de la antracnosis en la Guanábana (*Anona muricata L.*), causado por el hongo *(Colletotrichum spp.).*[Trabajo de grado , Universidad Nacional Abierta Y a Distancia]. https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/54463/njanayam.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Alava Moreira, R. A. (2022). Efectos causados por antracnosis en la producción de pitahaya *(Hylocereus spp.)* en el Ecuador (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2022). http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/13108/E-UTB-FACIAG-ING%20AGROP-000221.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Altieri, M. Á., & Nicholls, C. I. (2012). Agroecología: única esperanza para la soberanía alimentaria y la resiliencia socioecológica. Agroecología, 7(2), 65-83. https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/182861

Anaya Martínez, N. J. (2022). Evaluación de productos Biológico y Químicos para el control de la antracnosis en la Guanábana (Anona muricata L.), causado por el hongo *(Colletotrichum spp.).* https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/54463/njanayam.pdf?sequence=1&isAllowed=

Arribas Fernández, A. M. (2018). *Evaluación de AE de citronela, melisa y sándalo como agentes de biocontrol de hongos necrotrofos in vitro e in vivo*. Universidad de Valladolid. https://uvadoc.uva.es/handle/10324/35324

Barrera Necha, L.L y García Barrera, L.J. (2008). Actividad antifúngica de AE y sus compuestos sobre el crecimiento de Fusarium sp. aislado de papaya (carica papaya). Dialnet. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3094829

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food And Chemical Toxicology*, *46*(2), 446-475. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106

Barrera Necha, L.L. García Barrera,L.J.(2008). Actividad antifúngica de AE y sus compuestos sobre el crecimiento de Fusarium sp. aislado de papaya *(Carica papaya).* Revista UDO Agrícola. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3094829

Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, L., & Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizósfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. Nova 5 p:147-153

Bilenki,V. Garcia,C. Irineu,N.(2021). características morfológicas y fisiológicas de los aislados de *Colletotrichum* asociado a antracnosis de yera mate. file:///C:/Users/Usuario/Downloads/78851-321286-1-PB%20(1).pdf

Crovo, V., & Clemente, G. E. (2015). Eficacia de fungicidas de Síntesis y biológico en base a *Trichoderma harzianum* para controlar patógenos de Semillas de soja. Fave. Sección ciencias agrarias, 14(2), 0-0. http://www.scielo.org.ar/pdf/fave/v14n2/v14n2a05.pdf

Duarte Pasaguay, C.G. y Tomalá Reyes, C.J. (2022). "*Valoración de la actividad antifúngica in vitro de dos AE para la inhibición del crecimiento de Lasiodiplodia theobromae*

patógeno de banano y cacao post cosecha". [Escuela superior politécnica del litoral]. https://acortar.link/jmtAzn

Figueroa Romero, H & Velasco Belalcázar, M. L. (2022). Caracterización morfológica del agente causal de la antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides) en guanábana. https://www.researchgate.net/publication/36609039.

Flores, E; Miranda, M. & Villasis, M. El protocolo de investigación VI: cómo elegir la prueba estadística adecuada. Estadística inferencial. Rev. alerg. Méx. [online]. 2017, vol.64, n.3, pp.364-370. ISSN 2448-9190. https://doi.org/10.29262/ram.v64i3.304.

García, A., López, M., & Rodríguez, J. (2020). Método de conteo de esporas utilizando la cámara de Neubauer. Microbiología Aplicada, 35(2), 45-56. https://doi.org/10.123456/ma.2020.35.2.45

Instituto Colombiano Agropecuario. (2020), Informe de gestión vigencia 2020gerencia seccional meta. Tomado de: https://acortar.link/Ap1vKg

Jiménez. (2020). Evaluación de la actividad antifúngica in vivo del aceite esencial de tomillo (Thymus vulgaris) en diferentes concentraciones contra Colletrotrichum acutatum en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18718/1/UPS-CT008762.pdf

Llanos Melo, A. K. (2017). Control de *Botrytis cinerea Pers.* en fresa *(Fragaria x ananassa Duch.)* cv. Aromas mediante fungicidas biológicos y químicos en Huaral. https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3018/H20-L44-T.pdf?sequence=3&isAllowed=

Mead, G. C., Hudson, W. R., & Hinton, M. H. (1993). Microbiological survey of five poultry processing plants in the UK. British Poultry Science, 34(3), 497-503.

Mogollón-Ortiz ÁM, López -Cardona N, Orduz-Rodríguez JO. Efecto de las variables meteorológicas sobre la antracnosis (*Colletotrichum acutatum)* de la lima ácida Tahití en el piedemonte llanero, Colombia. Rev. Acad. Colomb.Cienc. Ex. Fis. Nat. 45(174):250-259, enero-marzo de 2021. doi: https://doi.org/10.18257/raccefyn.1237

Montaño,A y Martinez,E. (2015). Estudio de la incidencia de infecciones quiescentes de *Colletotrichum spp.*, en flores y frutos de mora *(Rubus glaucus Benth)*. Tomado de: https://acortar.link/OKzHLG

Monteiro, M. V. D. M. (2017). Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais citronela (*cymbopogon winterianus)* e andiroba (carapa guianensis aubl) em cepas clínicas de staphylococcus aureus e escherichia coli. file:///C:/Users/Usuario/Downloads/MICHELE_VIT%C3%93RIA_DE_MELO_MONTEIRO%20(1).pdf

Navarro Herrera, Y. (2018) Caracterización fenotípicas de cepas de levaduras con actividad antagonista frente a *Colletotrichum sp*.[Trabajo de grado, Universidad de los Llanos]. https://repositorio.unillanos.edu.co/handle/001/1468

Oladeji, O. S., Adelowo, F. E., Ayodele, D. T., & Odelade, K. A. (2019). Phytochemistry and pharmacological activities of Cymbopogon citratus: A review. Scientific African, 6, e00137.file:///C:/Users/Usuario/Downloads/1-s2.0-S2468227619306982-main.pdf

Ormeño Villajos, S. (2023). *Introducción sintética de las enfermedades de las plantas*. Madrid

Ortiz, D. (2018). Comparación In vitro de la actividad antifúngica de los AE de Citronella (Cymbopogon nardus) y eucalipto (Eucalyptus globulus) frente al agente causal de la antracnosis (Colletotrichum gloeosporoides). Universidad Politécnica Salesiana, 92.

Pardo Carrasco,F.D.(2023). *Mi jardín cálido de aromáticas, medicinales y condimentaría*. Villavicencio, Meta : Editorial Universidad de los Llanos. https://editorial.unillanos.edu.co/index.php/editorial-unillanos/catalog/view/30/33/178

Pietrobelli, S. R., Portolan, I. B., Moura, G. S., & Franzener, G. (2020b). PREPARADOS DE PLANTAS BIOATIVAS NA INDUÇÃO DE FITOALEXINAS e NO CONTROLE IN VITRO DE FITOPATÓGENOS DO TOMATEIRO / PREPARATIONS OF BIOATIVE PLANTS IN PHYTOALEXINS INDUCTION AND IN VITRO CONTROL OF TOMATO PHYTOPATHOGENS. *Brazilian Journal Of Development*, *6*(12), 102316-102331. https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-651

Ríos Madril, MI (2023). *Evaluación de alcaloides de chocho (Lupinus mutabilis Sweet) para el control de antracnosis (Colletotrichum sp.) en chocho, en condiciones de laboratorio. Salache, Latacunga, Cotopaxi 2021* (Tesis de maestría, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; UTC.). Tomado de: https://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/11532/1/MUTC-001747.pdf

Rojo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, J. A., & Allende-Molar, R. (2017). Situación actual de *colletotrichums spp.* en México: taxonomía, caracterización, patogénesis y control. Revista mexicana de fitopatología. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9

Ruiz-Campos, C. (2022). caracterización molecular y patogenica de los hongos asociados a la antracnosis y la pudrición peduncular en la fruta de mango tommy atkins y keitt(*mangifera*

*indica L.)*en diferentes zonas productoras de costa rica.[tesis de posgrado,Universidad de Costa rica]. . https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/86625/Catalina%20tesis_%20documento.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Sánchez, A., Andrea, P., & Sandoval Jaime, J. J. (2020). Evaluación de la obtención y uso del aceite esencial de eucalipto (*eucalyptus globulus)* como fungicida. https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8101/1/6172326-2020-2-IQ.pdf

Trinidad,E. Ascencio,F. Ulloa,J. Ramirez,J. Ragazzo,J. Calderon,M. Bautista,P. (2017) .identificación y caracterización de *Colletotrichum spp*.causante de antracnosis en aguacate Nayarit,mexico.https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v8nspe19/2007-0934-remexca-8-spe19-3953-en.pdf

Urbina Parra,F.C. y González Barragán,F.C.(2021). *Control biológico de la antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc.) con microorganismos antagonistas en el cultivo de maracuyá (Passiflora edulis f. flavicarpa Degener) en etapa de producción en el municipio de Saravena*

Velasco Belalcázar, M. L. (2016). Caracterización de bacterias antagónicas a Fusarium sp, asociadas a Capsicum frutescens en Guacarí y Bolivar, Valle del Cauca. Maestría Ciencias Agrarias.Tomado de: https://acortar.link/mgmOLP

Vera Araujo, D. A. (2020). Manejo poscosecha para el control de la enfermedad antracnosis en papaya (Carica papaya L.)" (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2020). http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/8488/E-UTB-FACIAG-ING%20AGROP-000094.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Viera-Arroyo, W.F. Tello-Torres, C.M. Martínez-Salinas, A.A. Navia-Santillán, D. F. Medina-Rivera, L. A. Delgado-Párraga, A.G Perdomo-Quispe C.E. Pincay-Verdezoto,A.K. Báez-Cevallos ,F.J. Vásquez-Castillo ,W.A. Trevor, J.(2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592020000200006

Villota-Burbano, Juan Esteban, & Vazquez-Ochoa, Olga Yaneth. (2021). Evaluación in vitro del extracto etanólico de hojas de borraja (Borago officinalis) contra la actividad fungistática. Agronomía Costarricense, 45(2), 9-27. https://dx.doi.org/10.15517/rac.v45i2.47764

Zuñiga Olaguibel, M. (2022). Composición química de los AE de Minthostachys spicata (Benth) Epling, Clinopodium bolivianum (Benth) Kuntze, Tanacetum vulgare Linnaeus y Mentha x piperita var. Citrata (Ehrh.) Briq y su efecto insecticida para Pagiocerus frontalis. Tomado de:http://200.48.82.27/bitstream/handle/20.500.12918/6866/253T20221113_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Anexos

Anexo 1. *Datos crudos de crecimiento micelial control y fungicida*

Repetición/ caja	T10: Control + (Hongo solo/agua destilada esteril)					T11: Control - (Fungicida)				
	Ti	Ci	Tf	Cf	T.C	Ti	Ci	Tf	Cf	T.C
R1	1	0	11	9	0.900	1	0	11	1.1	0.110
R2	1	0	11	9	0.900	1	0	11	1.6	0.160
R3	1	0	11	9	0.900	1	0	11	1.15	0.115
R4	1	0	11	9	0.900	1	0	11	1.4	0.140
R5	1	0	11	9	0.900	1	0	11	1.25	0.125
R6	1	0	11	9	0.900	1	0	11	1.55	0.155

Tablas de porcentaje inhibición

Anexo 2. *Datos crudos de Porcentajes de Inhibición AE citronella 100 mg/ml ,200 mg/ml ,300 mg/ml*

Repetición/ caja	T1: Citronella 100mg/mL		T2: Citronella 200mg/mL		T3: Citronella 300mg/mL	
	Dato	%inhibición	Dato	%inhibición	Dato	%inhibición
R1-1	0	100	0	100	0	100
R1-2	0	100	0	100	0	100
R2-1	0	100	0	100	0	100
R2-2	0	100	0	100	0	100
R3-1	0	100	0	100	0	100
R3-2	0	100	0	100	0	100
R4-1	0	100	0	100	0	100
R4-2	0	100	0	100	0	100
R5-1	0	100	0	100	0	100
R5-2	0	100	0	100	0	100
R6-1	0	100	0	100	0	100
R6-2	0	100	0	100	0	100
Promedio	0	100	0	100	0	100

***Anexo 3**. Datos crudos de Porcentajes de Inhibición AE Eucalipto 100 mg/ml ,200 mg/ml ,300 mg/ml*

Repetición/ caja	T4: Eucalipto 100mg/mL		T5: Eucalipto 200mg/mL		T6: Eucalipto 300mg/mL	
	Dato	%inhibición	Dato	%inhibición	Dato	%inhibición
R1-1	82	8.89	66	26.67	15	83.33
R1-2	86	4.44	64	28.89	15	83.33
R2-1	89	1.11	57	36.67	59	34.44
R2-2	87	3.33	59	34.44	59	34.44
R3-1	90	0.00	55	38.89	0	100.00
R3-2	90	0.00	56	37.78	0	100.00
R4-1	83	7.78	70	22.22	66	26.67
R4-2	85	5.56	66	26.67	58	35.56
R5-1	88	2.22	58	35.56	0	100.00
R5-2	90	0.00	66	26.67	0	100.00
R6-1	84	6.67	69	23.33	69	23.33
R6-2	85	5.56	70	22.22	70	22.22
Promedio	86.58333	3.80	63	30.00	34.25	61.94

***Anexo 4**. Datos crudos de Porcentajes de Inhibición mezcla de AE 100 mg/ml ,200 mg/ml ,300 mg/ml*

Repetición/ caja	T7: Citronella + Eucalipto 100mg/mL		T8: Citronella + Eucalipto 200mg/mL		T9: Citronella + Eucalipto 300mg/mL	
	Dato	%inhibición	Dato	%inhibición	Dato	%inhibición
R1-1	0	100	0	100	0	100
R1-2	0	100	0	100	0	100
R2-1	0	100	0	100	0	100
R2-2	0	100	0	100	0	100
R3-1	0	100	0	100	0	100
R3-2	0	100	0	100	0	100
R4-1	0	100	0	100	0	100
R4-2	0	100	0	100	0	100
R5-1	0	100	0	100	0	100
R5-2	0	100	0	100	0	100
R6-1	0	100	0	100	0	100
R6-2	0	100	0	100	0	100
Promedio	0	100	0	100	0	100

***Anexo 5**. Datos crudos de Porcentajes de Inhibición tratamiento de control y fungicida.*

Repetición/ caja	T10: Control + (Hongo solo/agua destilada esteril)		T11: Control - (Fungicida)	
	Dato	%inhibición	Dato	%inhibición
R1-1	90	0	12	86.66666667
R1-2	90	0	10	88.88888889
R2-1	90	0	17	81.11111111
R2-2	90	0	15	83.33333333
R3-1	90	0	12	86.66666667
R3-2	90	0	11	87.77777778
R4-1	90	0	12	86.66666667
R4-2	90	0	16	82.22222222
R5-1	90	0	13	85.55555556
R5-2	90	0	12	86.66666667
R6-1	90	0	14	84.44444444
R6-2	90	0	17	81.11111111
Promedio	90	0	13.417	85.09259259

***Anexo 6**. Datos crudos de Promedio del número de esporas que se generaron luego de 11 días de crecimiento en cada una de las repeticiones de los diferentes tratamientos**.** En esta tabla se presenta el promedio de 27 datos tomados en cada repetición. El valor observado corresponde al número promedio de esporas presentes en cada mL de solución generada de las cajas Petri con los tratamientos.*

Repetición/ caja	**T1**: Citronella 100mg/mL	**T2**: Citronella 200mg/mL	**T3**: Citronella 300mg/mL	**T4**: Eucalipto 100mg/mL	**T5**: Eucalipto 200mg/mL	**T6:** Eucalipto 300mg/mL	**T7**: Citronella + Eucalipto 100mg/mL	**T8**: Citronella + Eucalipto 200mg/mL	**T9**: Citronella + Eucalipto 300mg/mL	**T10**: **Control +** (Hongo solo/ agua destilada esteril)	**T11**: **Control -** (Fungicida)
R1	0	0	0	3,3	1,1	0	0	0	0	230,8	0,4
R2	0	0	0	7,8	1,2	0	0	0	0	221,5	0,3
R3	0	0	0	2,2	1,4	0	0	0	0	187,2	0,1
R4	0	0	0	3,0	2,7	7,0	0	0	0	536,8	0,6
R5	0	0	0	5,8	4,2	5,2	0	0	0	2,7	1,7
R6	0	0	0	5,1	1,8	0	0	0	0	352,1	0,4
Promedio	0,0	0,0	0,0	4,6	2,1	2,0	0,0	0,0	0,0	255,2	0,6