



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
CARRERA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Proyecto de Investigación
previo a la obtención del título
de Ingeniera Agroindustrial.

Título del Proyecto de Investigación:

Evaluación de las concentraciones de aceites esenciales de *citrus sinensis* (naranja) en la inhibición de hongos patógenos en *phaseolus vulgaris* l. (frijol canario) almacenados en las bodegas del Cantón Quevedo 2016

Autora:

Jessica Alexandra Daquilema Rea

Directora de proyecto de investigación:

Ing. MS.c. Flor Marina Fon Fay Vásquez

Quevedo - Los Ríos – Ecuador.

2016



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302

Fax: (593-05) 2753300 – 2753303

e-mail: info@uteq.edu.ec

Página web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS

Guayaquil: 10672

Quevedo: 73

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.

Yo, **Jessica Alexandra Daquilema Rea**, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

f. _____
Jessica Alexandra Daquilema Rea
C.C. # 120745615-1



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302

Fax: (593-05) 2753300 – 2753303

e-mail: info@uteq.edu.ec

Página web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS

Guayaquil: 10672

Quevedo: 73

**CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

La suscrita, Ing. M.Sc. **FLOR MARINA FON FAY**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresada **JESSICA ALEXANDRA DAQUILEMA REA**, realizó la tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial titulada: **EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) EN LA INHIBICIÓN DE HONGOS PATÓGENOS EN *Phaseolus vulgaris* L. (FRIJOL CANARIO) ALMACENADOS EN LAS BODEGAS DEL CANTÓN QUEVEDO 2016**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. M.Sc. FLOR MARINA FON FAY
DIRECTORA DE TESIS



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Página web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador
Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

**CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE
PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO
ACADÉMICO**

Quevedo, 12 de enero de 2017

Ing. MSc. Sonia Barzola Miranda
COORDINADORA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Mediante el presente cumplo en presentar a usted, el informe del proyecto cuyo tema es “EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) EN LA INHIBICIÓN DE HONGOS PATÓGENOS EN *Phaseolus vulgaris* L. (FRIJOL CANARIO) ALMACENADOS EN LAS BODEGAS DEL CANTÓN QUEVEDO 2016”. presentado por la señorita **Jessica Alexandra Daquilema Rea**, egresada de la carrera de Ingeniería Agroindustrial, que fue revisado bajo mi dirección según resolución del consejo directivo de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería de sesión extraordinaria que se ha desarrollado de acuerdo al reglamento general de graduación de pregrado de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y cumple con el requerimiento de análisis de **URKUND** el cual avalúa los niveles de originalidad en un 94% y similitud 6%, de trabajo investigativo.

URKUND

Documento [PROY FINAL UNKUR.docx \(D24905848\)](#)
Presentado 2017-01-11 18:23 (-05:00)
Recibido ffonfay.uteq@analysis.orkund.com
Mensaje Proyecto de Investigación Evaluación de las concentraciones de Aceite Esencial de naranja [Mostrar el mensaje completo](#)
6% de esta aprox. 27 páginas de documentos largos se componen de texto presente en 5 fuentes.

Valido este documento para el comité académico de la carrera para seguir con los trámites pertinentes, de acuerdo a lo que establece el reglamento de grado y títulos de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Por su atención mis más sinceros agradecimientos.

Cordialmente.

ING. FLOR MARINA FON FAY VASQUEZ
DIRECTORA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Página web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador
Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE
SUSTENTACIÓN.**

Tesis de grado presenta al Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería Previo a la Obtención del Título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Título de tesis:

EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) EN LA INHIBICIÓN DE HONGOS PATÓGENOS EN *Phaseolus vulgaris* L. (FRIJOL CANARIO) ALMACENADOS EN LAS BODEGAS DEL CANTÓN QUEVEDO 2016.

Aprobado:

Ing. Sonia Barzola Miranda, Msc.
Presidente del Tribunal de Tesis

Ing. Ruth Torres Torres, Msc.
Miembro del Tribunal de Tesis

Ing. Andrea Cortez Espinoza Msc.
Miembro del Tribunal de Tesis

AGRADECIMIENTO

A mis padres por ser el apoyo y el sustento en momentos difíciles de este largo camino. Sin ellos no hubiese sido posible llegar hasta aquí. A mis hermanos Edison, Jimmy y a mi amada hermana por ser el ejemplo de coraje que necesite en tiempos de vulnerabilidad.

A mi directora de proyecto de Investigación, Ing. MS.c. Flor Marina Fon Fay por brindar su aporte en cuanto a conocimientos y sugerencias para la realización de este proyecto. Gracias por el tiempo y por la paciencia brindada.

Al Dr. Fabricio Canchignia por el aporte en el campo experimental de esta investigación.

A la Ing. Vanessa Canchignia por brindar sus conocimientos en el laboratorio y su total apertura en cuanto al acceso del mismo.

A amiga y hermana en Cristo Ing. Flor Narváez por compartir cada uno de sus conocimientos adquiridos en el laboratorio.

A los amigos que logre encontrar durante el desarrollo de este proyecto, a los compañeros de aula de los cuales guardo gratos y hermosos recuerdos. Gracias por su amistad.

A mi familia y hermanos en Cristo que estuvieron presentes mediante sus oraciones para que lo que ayer era solo un objetivo pudiera ser hoy una meta alcanzada.

Y por último pero no menos importante, a mi amado Jesús, mi eterno enamorado, Padre, Consejero y Amigo Fiel. Su fidelidad estuvo conmigo cuando hubo momentos difíciles que no lograba entender. Su favor, su amor y su gracia estuvieron presentes a lo largo de mi vida y de mi carrera universitaria; brindando no solo la fortaleza necesaria sino también la sabiduría para realizar y culminar con éxitos una de mis tantas metas propuestas. Sin Dios la vida de todo ser humano carece de sentido y propósito.

Jessica Daquilema.

DEDICATORIA

Este proyecto de investigación va dedicado a mi eterno enamorado, Jesús. Sin Él, llegar hasta aquí no hubiera sido posible lograr ni alcanzar.

A mis padres, esto es por y para ustedes. Gracias por el amor y la paciencia que brindaron a lo largo de mi carrera universitaria. En especial, gracias a mamá por ser ejemplo de entrega absoluta, ejemplo de que nunca podía rendirme, de que no importara cuan cansada podías estar al final siempre me enseñaste que el trabajo duro trae recompensa.

A mis hermanos, Edison y Jimmy espero que esto sea para ustedes solo un pequeño ejemplo. Sé que si se lo proponen llegaran a alcanzar y a lograr algo mucho más grande.

A mi hermana, Rosa. Que es y será siempre el reflejo de una mujer fuerte, una mujer que no es conformista. Me enseñaste que no debo huir si veo que algo se pone difícil o complicado. Si hubieses apoyado mis miedos, no hubiese llegado hasta aquí.

Jessica Alexandra Daquilema Rea

RESUMEN

En esta investigación se evaluó las concentraciones del aceite esencial de *Citrus sinensis*, frente a hongos patógenos presentes en frijol canario almacenados en bodegas del cantón Quevedo. Se obtuvo aceite esencial extraído de hojas, de corteza y se adquirió un aceite comercial proveniente de ISABRUK BOTANIC S.A. Las semillas del frijol canario fueron sembradas en cajas Petri con PDA durante 7 días para luego ser aislados e identificados, obteniendo el género *Fusarium* spp de dos especies. Las concentraciones de aceite esencial utilizadas fueron del 1,5 % 2,5 % y 3,5 %. La actividad antifúngica de los aceites esenciales se determinó mediante el crecimiento radial de micelio y germinación de esporas. Obteniendo los siguientes resultados: una mayor actividad antifúngica en aceite esencial comercial con un porcentaje de inhibición del 100% en Crecimiento Radial y germinación de esporas. El aceite esencial extraído de las hojas obtuvo un 95% y 91% en crecimiento radial y un 100 % de inhibición en germinación de esporas, mientras que el aceite esencial extraído de corteza no tuvo un efecto antifúngico en cuanto a inhibición del crecimiento micelial del *Fusarium* spp, sin embargo este mismo aceite logro inhibir en un 90% la germinación de esporas. A concentraciones bajas se pudo obtener un mayor efecto antifúngico sin necesidad de recurrir a concentraciones más elevadas. Con una concentración del 1,5% de aceite esencial comercial se obtuvo un efecto antifúngico que inhibió en su totalidad el crecimiento radial y en la germinación de esporas se evidencio una inhibición total. Mientras que con el aceite esencial extraído de hojas, se observó un mayor efecto antifúngico con una concentración del 2,5%. El efecto antifúngico del aceite esencial de *Citrus sinensis* fue evidente en la inhibición de *Fusarium* spp esto debido a los componentes que presenta dicha fruta en sus hojas y corteza.

Palabras claves: Cítricos, Corteza, Leguminosas, Inhibición de crecimiento radial. Inhibición de esporas.

ABSTRACT

In this research we evaluated the concentrations of the essential oil of *Citrus sinensis*, against pathogenic fungi present in Canary beans stored in warehouses of the canton Quevedo. Was obtained essential oil extracted from leaves, bark and acquired a commercial oil from ISABRUK BOTANIC S.A. canarian bean seeds were sown in Petri dishes with PDA during 7 days and then be isolated and identified, obtaining the genus *Fusarium* spp of two species. The concentrations of essential oil used were 1.5 % 2.5 % and 3.5 %. The antifungal activity of the essential oils was determined by the radial growth of mycelium and spore germination. Obtaining the following results: greater antifungal activity in essential oil with a percentage of inhibition of 100% in radial growth and germination of spores. The essential oil extracted from the leaves obtained a 95% and 91% in radial growth and a 100 % inhibition on germination of spores, while the essential oil extracted from bark did not have an antifungal effect in terms of inhibition of the mycelial growth of *Fusarium* spp, however this same oil was able to inhibit in a 90% germination of spores. At low concentrations could not obtain a higher antifungal effect without the need to resort to higher concentrations. With a concentration of 1.5% of commercial essential oil was obtained an antifungal effect that inhibited the radial growth and in the germination of spores showed a total inhibition. While with the essential oil extracted from leaves, there was a greater antifungal effect with a concentration of 2.5%.The antifungal effect of the essential oil of *Citrus sinensis* was evident in the inhibition of *Fusarium* spp this due to the components that presents such fruit in their leaves and bark.

Keyword: Citrus fruits, bark, Pulses, inhibition of radial growth inhibition of spores

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	i
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN...	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN.	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
TABLA DE CONTENIDO	x
INDICE DE TABLAS	xiii
INDICE DE CUADROS	xiv
INDICE DE ANEXOS	xiv
CÓDIGO DUBLIN:.....	xvi
INTRODUCCION	1
CAPITULO I CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.1 Problema de Investigación.	3
1.1.1. Planteamiento del problema	3
1.1.2. Formulación del problema.....	4
1.1.3. Sistematización del problema.....	4
1.2. Objetivo	4
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos específicos	4
1.3. Justificación	5
1.4. Hipótesis	5
CAPITULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	6
2.1. Marco conceptual	7
2.1.1. Aceite Esencial	7
2.1.2. Obtención de Aceites Esenciales.	7

2.1.3.	Hidrodestilación.	8
2.1.4.	Propiedades Antifúngicas.	8
2.1.5.	Características de las propiedades antifúngica de los aceites esenciales.....	8
2.1.6.	Actividad biológica	10
2.1.7.	Aceite Esencial de cítricos.....	10
2.1.8.	El uso de Aceite esencial de Cítricos como una alternativa "natural" para la preservación química de los alimentos.....	10
2.1.9.	Aceite esencial de naranja.	11
2.1.10.	Aceite esencial de hojas de naranja	11
2.1.11.	Aceite esencial de corteza de naranja	11
2.1.12.	Microorganismos	13
2.1.13.	Hongos.....	13
2.1.14.	<i>Fusarium spp</i>	13
2.1.15.	Frijol canario	14
2.1.16.	Almacenamiento en bodegas	15
2.1.17.	Granos dañados por hongos.....	16
2.2.	MarcoReferencial.....	16
2.2.1.	Catálogo de hongos en semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	16
2.2.2.	Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retrospectivos de Investigaciones.....	16
2.2.3.	Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (<i>Citrus sinensis</i> L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (<i>Carica papaya</i> L.	17
2.2.4.	Actividad antifúngica del aceite esencial y sus componentes en el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. aislado de papaya (<i>Carica papaya</i>)	17
2.2.5.	Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (<i>Eucalyptus tereticornis</i> , <i>Myrtaceae</i>) y cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i> , <i>Rutaceae</i>) sobre algunos hongos filamentosos	18
2.2.6.	Efecto de aceites esenciales extraídos de la cascara de dos especies de cítricos en algunos hongos.....	18
2.2.7.	Actividad Antibacterial y Antifúngica In-Vitro de Aceites Esenciales Seleccionados	19
2.2.8.	Análisis multivariado de los componentes del aceite esencial del género <i>Citrus</i> y su actividad antifúngica	19
2.2.9.	Composición Química y Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Cítricos Argelinos.....	20

CAPÍTULO III	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	22
3.1.	Localización.....	23
3.2.	Tipo de investigación	23
3.3.	Métodos de investigación	23
3.3.1.	Método experimental.....	23
3.3.2.	Método inductivo- deductivo	23
3.4.	Fuentes de recopilación de información.....	24
3.5.	Diseño de la investigación.....	24
3.5.1.	Diseño estadístico de la investigación.....	24
3.6.	Instrumentos de investigación	25
3.7.	Tratamiento de los datos.....	25
3.8.	Recursos humanos y materiales.....	25
3.9.	Manejo específico del experimento.....	27
CAPÍTULO IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1.	Resultados.....	31
4.1.1.	Identificación del hongo aislado en el frijol canario almacenados en bodegas.....	31
4.1.2.	Actividad Antifúngica del aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> (Hojas, Corteza y Comercial).....	33
4.1.3.	Concentraciones de los aceites esenciales (1,5% 2,5% 3,5%) para la inhibición de hongos presentes en el frijol canario (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	38
4.2.	Discusión	43
4.2.1.	Hongos aislados de <i>Phaseolus vulgaris</i> L	43
4.2.2.	Actividad Antifúngica de los aceites esenciales.....	43
4.2.3.	Concentraciones de AEs.....	44
4.2.4.	Tratamiento de las hipótesis.	45
CAPÍTULO V	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
5.1.	Conclusiones.....	47
5.2.	Recomendaciones	47
CAPÍTULO VI	BIBLIOGRAFÍA	49
CAPÍTULO VII	ANEXOS.....	55
ANEXO 1:	Crecimiento radial del <i>Fusarium</i> spp 1	56
ANEXO 2:	Crecimiento Radial del <i>Fusarium</i> spp 2 durante los 7 días de medición. ...	57

ANEXO 3: Crecimiento radial de esporas del <i>Fusarium spp 1</i>	58
ANEXO 4: Germinación de esporas del <i>Fusarium spp 2</i>	59
ANEXO 5: Inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium spp 1</i>	60
ANEXO 6: Inhibición del crecimiento radial de <i>fusarium spp 2</i>	61
ANEXO 7: Inhibicion de germinación de esporas de <i>Fusarium spp 1</i>	62
ANEXO 8: Inhibicion de germinación de esporas de <i>Fusarium spp 2</i>	63
ANEXO 9: Fotos de la fase experimental.	64
ANEXO 10: Diagrama de bloques para la determinación de la concentración óptima de aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> . (Naranja) en la inhibición de <i>fusarium spp</i> presente en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol canario).	71
ANEXO 11: Técnica de laboratorio para crecimiento radial.....	73
ANEXO 12: Técnica de laboratorio para crecimiento de esporas.....	74
ANEXO 13: Certificado de Laboratorio.....	76
ANEXO 14: Resultados obtenidos a partir de los datos del porcentaje de inhibicion de crecimiento radial y germinacion de esporas de <i>Fusarium spp 1</i> y <i>Fusarium spp 2</i> (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) durante las primeras 48, 96 y 168 horas de incubación.....	77
ANEXO 15: Tablas de rangos múltiples para <i>fusarium spp 1</i> durante las primeras 48, 96 y 168 horas.	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentraciones mínimas inhibitorias de aceites esenciales probados “in vitro” contra microorganismos patógenos transmitidos por alimentos (Burt, 2004). ...	9
Tabla 2: Composicion quimica (%) de AEs de bergamota, limon y naranja a partir de partes de cascara frescas identificadas mediante analisis de GC-MS	12
Tabla 3.- Variedades de frijol cultivadas en Ecuador	14
Tabla 4.- Valor nutricional del frijol canario por cada 100 g	15

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Factores de estudio para la evaluación de concentraciones de aceites esenciales de citrus sinensis (naranja) en la inhibición de hongos patógenos en phaseolus vulgaris L. (frijol canario).....	24
Cuadro 2: Combinación de los tratamientos propuestos para la evaluación de concentraciones de aceites esenciales de citrus sinensis (naranja) en la inhibición de hongos patógenos en Phaseolus vulgaris L. (Frijol Canario).	25
Cuadro 3: Materiales y equipos	26
Cuadro 4: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición del Crecimiento Radial de Fusarium spp 1 mediante prueba de Tukey.	34
Cuadro 5: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición de Germinación de Esporas de Fusarium spp 1 mediante prueba de Tukey..	35
Cuadro 6: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición del Crecimiento Radial de Fusarium spp 2 mediante prueba de Tukey.	36
Cuadro 7: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición de Germinación de Esporas de Fusarium spp 2 mediante prueba de Tukey..	37
Cuadro 8: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición del Crecimiento Radial de Fusarium spp 1 mediante prueba de Tukey.	39
Cuadro 9: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición de Germinación de Esporas de Fusarium spp 1 mediante prueba de Tukey..	40
Cuadro 10: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición del Crecimiento Radial de Fusarium spp 2 mediante prueba de Tukey.	41
Cuadro 11: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición de Germinación de Esporas de Fusarium spp 2 mediante prueba de Tukey.	42

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Crecimiento radial del Fusarium spp 1	56
ANEXO 2: Crecimiento Radial del <i>Fusarium</i> spp 2 durante los 7 días de medición. .	57

ANEXO 3: Crecimiento radial de esporas del <i>Fusarium</i> spp 1	58
ANEXO 4: Germinación de esporas del <i>Fusarium</i> spp 2.....	59
ANEXO 5: Inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> spp 1	60
ANEXO 6: Inhibición del crecimiento radial de <i>fusarium</i> spp 2	61
ANEXO 7: Inhibición de germinación de esporas de <i>Fusarium</i> spp 1	62
ANEXO 8: Inhibición de germinación de esporas de <i>Fusarium</i> spp 2	63
ANEXO 9: Fotos de la fase experimental.	64
ANEXO 10: Diagrama de bloques para la determinación de la concentración óptima de aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> . (Naranja) en la inhibición de <i>fusarium</i> spp presente en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol canario).....	71
ANEXO 11: Técnica de laboratorio para crecimiento radial	73
ANEXO 12: Técnica de laboratorio para crecimiento de esporas.....	74
ANEXO 13: Certificado de Laboratorio.....	76
ANEXO 14: Resultados obtenidos a partir de los datos del porcentaje de inhibición de crecimiento radial y germinación de esporas de <i>Fusarium</i> spp 1 y <i>Fusarium</i> spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) durante las primeras 48, 96 y 168 horas de incubación.....	77
ANEXO 15: Tablas de rangos múltiples para <i>fusarium</i> spp 1 durante las primeras 48, 96 y 168 horas.	80

CÓDIGO DUBLIN:

Título:	“Evaluación de las concentraciones de aceites esenciales de <i>Citrus sinensis</i> (Naranja) en la inhibición de hongos patógenos en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Frijol Canario) almacenados en las bodegas del Cantón Quevedo 2016”				
Autor:	Daquilema Rea Jessica Alexandra				
Palabras claves:	Cítricos	Corteza	Leguminosas	Inhibición de Crecimiento Radial	Inhibición de Esporas.
Editorial:	Quevedo: Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2016				
Resumen: (hasta 300 palabras)	Resumen.- En esta investigación se evaluó las concentraciones del aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i>, frente a hongos patógenos presentes en frijol canario almacenados en bodegas del cantón Quevedo. Se obtuvo aceite esencial extraído de hojas, de corteza y se adquirió un aceite comercial proveniente de ISABRUK BOTANIC S.A. Las semillas del frijol canario fueron sembradas en cajas Petri con PDA durante 7 días para luego ser aislados e identificados, obteniendo el género <i>Fusarium</i> spp de dos especies. Las concentraciones de aceite esencial utilizadas fueron del 1,5 % 2,5 % y 3,5 %. La actividad antifúngica de los aceites esenciales se determinó mediante el crecimiento radial de micelio y germinación de esporas. Obteniendo los siguientes resultados: una mayor actividad antifúngica en aceite esencial comercial con un porcentaje de inhibición del 100% en Crecimiento Radial y germinación de esporas. El aceite esencial extraído de las hojas obtuvo un 95% y 91% en crecimiento radial y un 100 % de inhibición en germinación de esporas, mientras que el aceite esencial extraído de corteza no tuvo un efecto antifúngico en cuanto a inhibición del crecimiento micelial del <i>Fusarium</i> spp, sin embargo este mismo aceite logro inhibir en un 90% la germinación de esporas. A concentraciones bajas se pudo obtener un mayor efecto antifúngico sin necesidad de recurrir a concentraciones más elevadas. Con una concentración del 1,5% de aceite esencial comercial se obtuvo un efecto antifúngico que inhibió en su totalidad el crecimiento radial y en la germinación de esporas se evidencio una inhibición total. Mientras que con el aceite esencial extraído de hojas, se observó un mayor efecto antifúngico con una concentración del 2,5%. El efecto antifúngico del aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> fue evidente en la inhibición de <i>Fusarium</i> spp esto debido a los componentes que presenta dicha fruta en sus hojas y corteza.				
Descripción:	88 hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162				
URI:	(en blanco hasta cuando se dispongan los repositorios)				

INTRODUCCION

Para el desarrollo de este proyecto se extrajo por hidrodestilación aceite esencial de cortezas y hojas de *Citrus sinensis* (naranja) con el fin de utilizarlo en la inhibición de hongos patógenos presentes en frijol canario.

En el caso de las plantas del género Citrus, la mayoría de los aceites esenciales están contenidos en pequeñas glándulas de la cáscara de la fruta, y se compone de más de un centenar de componentes (terpenos, alcoholes, aldehídos y ésteres, entre otros) que conjuntamente determinan las características del aceite. La destilación del aceite esencial de las hojas de las plantas cítricas es menos común [1].

Dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el frijol es uno de las más importantes. Actualmente se encuentra distribuido en los cinco continentes y es un componente esencial de la dieta, especialmente en Centroamérica y Sudamérica [2].

Los microorganismos ya sean hongos, bacterias, nematodos y virus; son responsables de enfermedades a pesar de no tener un síntoma característico para cada uno de ellos. Varias especies de hongos que normalmente habitan en el suelo son responsables de causar las pudriciones radicales en frijol, entre ellos sobresalen: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Sclerotium* [3].

Además, no solo es conocido por sus propiedades antifúngicas y antioxidantes sino también por su poder repelente frente a la especie *Tribolium castaneum*, Herbst, una de las principales plagas de cereales y productos almacenados [4].

Mediante la utilización de aceite esencial de *Citrus sinensis* (naranja) extraído de hojas, corteza y utilizando una marca comercial se pretende evaluar la concentración inhibitoria de hongos patógenos en el frijol canario almacenado; lo cual brinda una alternativa diferente de conservación de este alimento y aporta un conocimiento eficaz en el área científica.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de Investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

La pequeña industria obtiene aceites esenciales destinados para la aromaterapia y farmacéuticas. Los aceites esenciales tienen propiedades antimicrobianas y están declarados como GRAS (generalmente reconocidos como seguros) FAO (2006), pero son pocas las investigaciones sobre el aprovechamiento de estas propiedades. Mayores son las investigaciones de aceites esenciales de corteza y no así de las partes aéreas del árbol de naranja.

Los aceites esenciales y extractos de plantas se han utilizado desde hace mucho tiempo para obtener aromas y sabores. Se han estudiado los extractos y aceites esenciales de especies y condimentos y especias desde un punto de vista funcional. Es decir se ha estudiado si los extractos o aceites tienen actividad antimicrobiana, si actúan como agentes antioxidantes o si aportan nutrientes. Los métodos de obtención de los aceites esenciales determinan el uso de los mismos [5].

Diagnóstico

El almacenamiento indebido en bodegas causa en el frijol canario contaminación por hongos, logrando que este pierda capacidad de germinación, decoloración y otras afecciones. Esto de igual manera provoca que los consumidores se vean afectados al ingerir leguminosas infectadas con micotoxinas. El estudio del aceite esencial extraído de hojas y de corteza de naranja como inhibidor de hongos patógenos en frijol canario ha sido poco frecuente debido a esto se desconoce su efecto inhibidor en hongos de almacén.

Pronóstico

Los aceites esenciales de hojas y corteza de *Citrus sinensis* inhibirán los hongos patógenos en *Phaseolus vulgaris* L almacenado.

1.1.2. Formulación del problema

Se desconocen las concentraciones inhibitorias de aceites esenciales extraídos de hojas y corteza de *Citrus sinensis* (naranja) de hongos patógenos en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol canario) almacenados.

1.1.3. Sistematización del problema

Es necesario identificar los hongos patógenos presentes en el frijol canario almacenados en bodegas.

Se desconoce la actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) en hojas, corteza y comercial.

Es preciso conocer la concentración inhibitoria de los aceites esenciales para la inhibición de hongos presentes en el frijol canario (*Phaseolus vulgaris* L.)

1.2. Objetivo

1.2.1. Objetivo general

- ✓ Evaluar las concentraciones de aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*) en la inhibición de hongos patógenos en frijol canario (*Phaseolus vulgaris* L.) almacenados.

1.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Identificar los hongos patógenos presentes en el frijol canario almacenados en bodegas.
- ✓ Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) de hojas, corteza y comercial.
- ✓ Determinar la concentración de los aceites esenciales para la inhibición de hongos presentes en el frijol canario (*Phaseolus vulgaris* L.).

1.3. Justificación

Esta investigación radica en la importancia de preservar de daños por contaminación de hongos al frijol canario; debido a que se destaca por las propiedades nutritivas que posee, de manera fundamental por su alto contenido en proteínas y en menor medida en carbohidratos [6].

Se conocen alrededor de 3000 tipos de aceites esenciales, aunque solo 300 tienen importancia comercial. Además, se puede afirmar que a escala mundial, los 18 aceites esenciales más importantes representan casi el 50% del total del valor. Casi el 90% del consumo mundial de aceites esenciales y absolutos, se produce solo en 13 países, liderados por EEUU y China, que acaparan juntos el 44 % del consumo mundial [7].

Mediante la aplicación de aceite esencial de naranja extraído de varios orígenes como son de: hojas y corteza; se evaluará el porcentaje de crecimiento radial de hongos en el frijol canario y el crecimiento de esporas presentes en el mismo. Sin embargo existe otro factor que debe tomarse en cuenta para el estudio antifúngico de hongos y es el aceite esencial comercial adquirido.

Los aceites esenciales presentan la propiedad de inhibir el crecimiento de microorganismos, expresada como actividad antimicrobiana, actuando como agentes bacteriostáticos o antifúngicos [5]. Esto permitirá conocer la importancia que posee los aceites esenciales, al estudiar y evaluar el poder antifúngico no solo permitirá controlar hongos patógenos en frijol; si no también otorgará un amplio conocimiento para futuras investigaciones.

1.4. Hipótesis

- ✓ Las concentraciones de aceites esenciales de naranja inhibirán hongos patógenos en frijol canario almacenados.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Aceite Esencial

Los AE son una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles, algunos de ellos con actividad atrayente o repelente de insectos. Dentro de los compuestos presentes en estas mezclas con alta actividad repelente están: α -pineno, eugenol, limoneno, terpineol, citronelol, citronelal, alcanfor y timol [4].

Generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales se clasifican en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios [8].

Sin embargo no todos los extractos olorosos de plantas oleaginosas cumplen con la definición de un “aceite esencial”. El documento ISO/DIS 9235.2 de la Organización Internacional de Normas (ISO) define a un aceite esencial, correspondiente a materias primas aromáticas naturales, como: “Producto obtenido a partir de materias primas vegetales, ya sea por destilación con agua o vapor, o desde el epicarpio de los frutos cítricos mediante un proceso mecánico, o por destilación seca” [9].

2.1.2. Obtención de Aceites Esenciales.

La obtención del aceite se efectúa generalmente por métodos mecánicos “presión en frío de la cáscara”, sin embargo también se realiza el proceso de extracción del aceite por medio de hidrodestilación (HD), destilación con vapor (VD), hidrodestilación asistida por microondas (MWHd), extracción con solvente (SE) y extracción con fluidos supercríticos (CO₂) (SFE) [10]. La forma tradicional de obtener los compuestos volátiles como aceites esenciales de cítricos es principalmente por prensado en frío para corteza de cítricos [11].

2.1.3. Hidrodestilación.

La hidrodestilación es un método de destilación que consiste en evaporar una suspensión acuosa del material vegetal que durante toda la operación se encuentra sumergido en agua y en constante agitación para evitar aglomeración o sedimentación que pueden degradar térmicamente el aceite esencial [9].

Los aceites esenciales poseen un punto de ebullición superior al del agua, pero en la mezcla de aceite esencial más agua presenta un punto de ebullición inferior y por esto puede ser destilada; al pasar por el condensador los vapores se enfrían, se condensan y se transforman en un líquido formado por dos fases inmiscibles [12].

2.1.4. Propiedades Antifúngicas.

Los componentes de los aceites esenciales muestran actividades prometedoras contra patógenos transmitidos por los alimentos y los microorganismos causantes de deterioro [13]. Algunos poseen propiedades insecticidas, antifúngico y antibacterianas frente a microorganismos patógenos y han sido considerados como ingredientes activos en algunos plaguicidas botánicos, debido a su eficacia frente a un número considerable de plagas, su toxicidad mínima en mamíferos y su disponibilidad general [14].

2.1.5. Características de las propiedades antifúngica de los aceites esenciales

La actividad antifúngica de los aceites esenciales se asocia al contenido de fenoles monoterpenos especialmente el de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) y clavo (*Eugenia caryophyllata* Thunb). Su mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar con el citoplasma del patógeno y su modo de acción parece estar estrechamente relacionado con la solubilidad de cada compuesto. Se ha reportado toxicidad en humanos por la utilización de los aceites esenciales puros o en altas concentraciones, ocasionando desde irritaciones en la piel hasta cáncer [15].

Sin embargo, la utilización de aceites en concentraciones mínimas no genera alteraciones en el organismo, siendo además productos considerados como GRAS. Los aceites esenciales han mostrado una actividad fungicida contra patógenos postcosecha en un amplio intervalo de hongos. Actualmente, se han reportado varias investigaciones en donde se demuestra la actividad fungicida de los aceites esenciales [15].

Los experimentos de Screening han informado que el tomillo, clavo, canela, laurel, orégano, ajo y limón son algunos de los mejores candidatos de amplio espectro para la inhibición de los agentes patógenos transmitidos por los alimentos y microorganismos de descomposición ya que estos poseen los cinco principales componentes activos contra 25 microorganismos [16]. Son relativamente pocos los estudios sobre la actividad antimicrobiana de aceites esenciales en sistemas modelo de alimentos o en alimentos propiamente dichos. Sin embargo, en los estudios realizados se ha logrado ver que la eficacia de los aceites esenciales “in vitro” es frecuentemente mucho mayor que en los alimentos [17].

Tabla 1: Concentraciones mínimas inhibitorias de aceites esenciales probados “in vitro” contra microorganismos patógenos transmitidos por alimentos (Burt, 2004).

Planta de la cual se deriva el AE	Especie bacteriana	CMI rango aproximado(ul/ml)
Romero	Escherichia coli	4.5 - > 10
	Salmonella typhimurium	> 20
	Bacillus cereus	0.2
	Staphylococcus aureus	0.4 10
	Listeria monocytogenes	0.2
Orégano	E. coli	0.5 1.2
	S. typhimurium	1.2
	S. aureus	0.5 1.2
	E. coli	0.6
	S. typhimurium	2.5
	S. aureus	0.6
	E. coli	3.5 5
	S. typhimurium	10 20
	S. aureus	0.75 10
	L. monocytogenes	0.2
	E. coli	0.4 2.5
	S. typhimurium	> 20
	L. monocytogenes	0.3
	E. coli	0.45 1.25
	B. cereus	5 10

Fuente: Rodríguez Elvia. 2011

2.1.6. Actividad biológica

En los últimos años se ha evidenciado un extraordinario auge de la química de los productos naturales en el ámbito mundial. Entre los tres grupos de productos de origen botánico que con mayor probabilidad tendrán el impacto más notable en la protección de plantas en la próxima década se encuentran los aceites esenciales y sus constituyentes, provenientes de diferentes especies vegetales [18].

Los componentes de aceites esenciales como el limoneno y derivados hidroxilados han mostrado potencial uso en la quimioterapia del cáncer mamario. Los aceites esenciales de varias especies de *Sideritis* sp., *Lamiaceae*, y otras plantas, presentan actividad antimicótica (hongos patógenos al hombre), y en menor grado presentan actividad antimicrobiana. El aceite esencial de *Cymbopogon densiflorus* tiene actividad contra varias bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [19].

2.1.7. Aceite Esencial de cítricos

Los aceites esenciales de cítricos son una mezcla de compuestos volátiles y consisten principalmente en hidrocarburos monoterpénicos, que poseen altos niveles de insaturación y son generalmente inestables, debido a muchos factores, tales como la luz, el calor, oxidación e hidratación [11]. Estas mezclas contienen más de un centenar de compuestos, las mismas que se agrupan en tres fracciones: hidrocarburos terpénicos, compuestos oxigenados y compuestos no volátiles. La fracción terpénica puede constituir de 50 o más del 95% del aceite [20].

2.1.8. El uso de Aceite esencial de Cítricos como una alternativa "natural" para la preservación química de los alimentos.

Las nuevas tecnologías de procesamiento de alimentos, incluidos los antimicrobianos naturales están cobrando cada vez mayor importancia. Los AE de cítricos se han aplicado industrialmente en muchos productos, incluidos los alimentos y bebidas y las actividades contra algunos de los patógenos más importantes transmitidos por los alimentos se han demostrado. Los AE de cítricos tienen un gran potencial para satisfacer las demandas de los alimentos, farmacéutica y cosmética, ya que no sólo son fáciles y baratas de producir sino que son también sin ningún riesgo percible para los seres humanos [21].

2.1.9. Aceite esencial de naranja.

El aceite esencial de naranja se encuentra principalmente en sacos de forma ovalada en el flavedo o en la porción anaranjada de la cáscara y actúa como una barrera natural para muchos microorganismos e insectos, [10]. Además, no solo es conocido por sus propiedades antifúngicas y antioxidantes sino también por su poder repelente frente a la especie *Tribolium castaneum*, Herbst, una de las principales plagas de cereales y productos almacenados [4].

2.1.10. Aceite esencial de hojas de naranja

Los aceites esenciales de hojas son productos obtenidos a partir de materiales vegetales crudos que deben ser extraídos por medios físicos [11]. Son ampliamente utilizados en la medicina y la industria alimentaria para estos fines. El creciente interés en las sustancias naturales está llevando a la comunidad de investigadores a encontrar nuevos usos para las aplicaciones de estas sustancias [13].

2.1.11. Aceite esencial de corteza de naranja

Están presentes en los sacos de aceite o barras de aceite situado a diferentes profundidades en la cáscara y los cuerpos de la fruta. Se aplican en muchos productos, como alimentos, bebidas, cosméticos y medicamentos, como agentes aromatizantes, así como para la aromaterapia [11].

La cáscara de cítricos tiene numerosas glándulas que contienen aceite; cada uno de los cítricos tiene su propio conjunto de compuestos característico que posee el aceite y que son responsables de su sabor y aroma a productos como el carbonatado, bebidas, helados, tortas, ambientadores y perfumes. Se elige la cáscara de naranja para extraer el aceite esencial porque proporciona gran potencial para la forma comercial adicional [20].

Tabla 2: Composición química (%) de AEs de bergamota, limón y naranja a partir de partes de cascara frescas identificadas mediante análisis de GC-MS

N°	Compuesto	RI	Porcentaje (%)		
			AE	AE	AE
			Bergamota	Limón	Naranja
1	α -pineno	935	00,77	03,07	00,22
2	β -Phellandreno	964	01,92	-	-
3	β -pineno	980	03,45	17,04	01,62
4	β -Myrcene	990	-	02,37	03,20
5	Octanal	1006	01,25	-	-
6	Carene	1020	-	-	01,09
7	Limoneno	1033	77,37	51,40	02,20
8	Ocimeno	1048	-	-	02,24
9	γ -Terpineno	1060	-	13,46	-
10	β -Linanol	1080	01,22	-	23,37
11	Decanal	1175	00,83	-	-
12	Nerol	1207	-	01,50	-
13	Geraniol	1234	-	02,43	-
14	Acetato de Linanilo	1255	-	-	37,29
15	Citral	1336	-	-	00,34
16	Acetato de Nerilo	1365	-	01,05	04,10
17	Acetato de Geranilo	1384	-	-	06,35
18	Caryophyllene	1428	-	-	01,12
19	Naftaleno	-	01,42	-	-
20	Isocaryophyllene	-	-	01,23	-
Total de los componentes identificados (%)			8821	93,55	83,14
Rendimiento			0,60	0,70	0,58

Fuente: Djamel Djenane 2015

2.1.12. Microorganismos

Como microorganismo se define a cualquier organismo vivo que no sea visible a simple vista. Esta definición operativa no incluye los hongos, tanto inferiores como superiores, ni las algas aunque ambos grupos son considerados microorganismos porque su organización es esencialmente unicelular (las células que los constituyen mantienen un alto grado de autonomía entre sí). Por otra parte, organismos pluricelulares pueden ser de tamaño tan pequeño que entren dentro de la definición anterior sin dejar por ello de ser estructuralmente tan complejos como cualquier animal superior [22]

Los microorganismos se agrupan en dos categorías: procarióticos y eucarióticos. En la primera están las archaeas y las bacterias, mientras que en la segunda se encuentran hongos, algas y protozoarios. No obstante, de manera convencional los virus, viroides y priones son también considerados microorganismos [23].

2.1.13. Hongos

Los hongos son heterótrofos y como saprofitos obtienen su alimento de la materia orgánica muerta o se alimentan de huéspedes vivos parasitándolos. Pueden destruir plantas completas y restos de animales degradándolos a formas químicas simples que pasan al suelo y son absorbidas por otra generación de plantas [24].

2.1.14. *Fusarium spp*

El género *Fusarium* habita en el suelo y sobrevive entre los restos de plantas infectadas que yacen en el mismo en forma de micelios mediante clamidiosporas. Los tubos germinales de las esporas penetran directamente por las puntas de la raíz, mediante heridas o a nivel de zonas donde se forman las raíces laterales. El micelio se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilemáticos ascienden hasta la parte superior de las plantas en el torrente de la savia obstruyendo los vasos y afectando el transporte de agua, causando la marchitez de las hojas. *Fusarium* forman estructuras de resistencia en el suelo que les permite subsistir bajo condiciones adversas del medio ambiente [25].

2.1.15.Frijol canario

Es un grano perteneciente a la familia Fabaceae de la subfamilia Papilonoidea, género Phaseolus y especie vulgaris Linneo [26]. El frijol (Phaseolus vulgaris L.) es de las leguminosas más importantes del mundo; su cultivo está extendido en los cinco continentes y es uno de los alimentos básicos en África, América Latina y el Caribe [27]. En la producción del frijol se pueden elevar los rendimientos a niveles entre 57 a 75 quintales por hectárea, haciendo de éste un cultivo rentable y no de subsistencia, como normalmente se considera [28].

Esta clase comprende a las variedades de grano de color amarillo especial, similar al ave canario. Las variedades de este tipo son originarias del Perú desde donde se introdujeron a México en los años 70 [29].

Tabla 3.- Variedades de frijol cultivadas en Ecuador

Clase de grano			
Variedad	Color	Tamaño	Origen
Amarillo Matahambre	Amarillo moteado	Mediano	Introducido de Perú
Bayo Bolón	Pardo	Grande	
Bola 60 días	Blanco	Grande	
Canario	Amarillo	Mediano	
Canario Bolón	Amarillo	Grande	
Calima	Crema con pintas rojas	Grande	
Cargabello	Crema con pintas rojas	Grande	Introducido de Perú
Cocacho	Pardo	Mediano	
Machetón			
Magola	Rosa moteado	Grande	
Panamito	Blanco	Pequeño	
Percal	Crema moteado	Mediano	
Rojo Bolón	Rojo	Grande	Introducido de Colombia
Uribe	Rosado moteado	Grande	

Fuente: Voysest, O. (1983)

Tabla 4.- Valor nutricional del frijol canario por cada 100 g

Valor nutricional	
Nutrientes.	Cantidad.
Energia	339
Proteina	21.90
Grasa Total (g)	2.10
Colesterol (mg)	-
Glúcidos	60.10
Fibra (g)	2.90
Calcio (mg)	138
Hierro (mg)	6.60
Yodo (µg)	-
Vitamina A (mg)	0
Vitamina C (mg)	6.30
Vitamina D (µg)	-
Vitamina E (mg)	-
Vitamina B 12 (µg)	-
Folato (µg)	-

Fuente: Fundacion Universitaria Iberoamericana. 2012

2.1.16. Almacenamiento en bodegas

En particular los granos y las semillas son infectados por diversos hongos en el campo entre ellos *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Helminthosporium* sp. Por otra parte, los granos también pueden ser invadidos por hongos de almacén, siendo *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. los principales géneros de hongos que se presentan. Durante su desarrollo en los granos, los hongos causan diferentes clases de daños, siendo los más importantes la pérdida de capacidad de germinación, decoloración, calentamiento y producción de micotoxinas. Existen varios métodos de control de plagas, pero desgraciadamente las sustancias químicas empleadas en el control de insectos han provocado el desarrollo de resistencia, contaminación ambiental y riesgos de salud pública. Así mismo, actualmente no existe ningún método de control de hongos, sólo medidas preventivas como monitorizar la temperatura y la humedad del grano [30].

2.1.17. Granos dañados por hongos

Granos de frijol y sus partes que presentan en la superficie, en el germen o en los cotiledones, afectación parcial o total por desarrollo de hongos de campo y/o de almacén [26].

2.2. Marco Referencial

2.2.1. Catálogo de hongos en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Los hongos transmitidos por semillas son una gran limitación para la producción de frijol en Nicaragua y causa grandes pérdidas en el rendimiento. Sin embargo, la identificación de hongos transmitidos por semillas ha ganado poca atención. Una de las prioridades es identificar aquellos transmitidos por semillas en el cultivo del frijol. Los hongos identificados mediante secuencias de espacios internamente transcritos fueron: Complejo de *Fusarium* (*F. chlamydosporum*, *F. equiseti* y *F. incarnatum*); *Macrophomina phaseolina* (anamorfo o sinónimo *Rhizoctonia bataticola*); *Lasiodiplodia theobromae* (teleomorfo *Botryosphaeria rhodina*) *Corynespora cassiicola*; *Collectotrichum gloesporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*); *Colletotrichum capsici*; *Diaporthe sp/Phomopsis*. Mediante identificación de prueba de incubación y prueba de germinación en sustrato estéril fue detectado la presencia de *Rhizoctonia solani* Kühn [31].

2.2.2. Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retrospectivos de Investigaciones

Para el tratamiento de semillas, los mejores productos han sido los aceites esenciales que pueden tener acción inclusive sobre la parte interna de las semillas. Contra *A. flavus* en maíz, se han conseguido excelentes resultados con los aceites esenciales de canela, clavo, orégano, epazote, albahaca, tomillo y yerbabuena a su máxima concentración; sólo el ajo, la pimienta negra y la cebolla no tuvieron efecto eficiente. Mientras que los aceites de clavo, canela y tomillo demostraron su efecto fungicida sobre *Fusarium moniliforme*; sin embargo, el efecto de los aceites, ha sido en dosis altas; en maíz se requieren dosis de 8% en yerbabuena y 3% para epazote, en tanto que en sorgo, el clavo, la canela y el tomillo requieren dosis de

10% para un efecto óptimo; en contacto directo del hongo con el aceite, la concentración mínima efectiva es mucho menor, como ocurrió con el tomillo que fue eficiente a 150 ppm para inhibir a *F. moniliforme*. Se han probado combinaciones de aceites esenciales y en algunos casos se han obtenido lo que llamamos efecto sinérgico (que no corresponde estrictamente al concepto); es decir, utilizando dosis por debajo de la mínima eficiente para cada producto, al combinar dos productos se obtiene también la eliminación del hongo, como sucede con la combinación de la canela con el clavo, el orégano, el epazote y el tomillo contra *Aspergillus flavus* [32].

2.2.3. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.)

En este estudio se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium indicum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*, en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) en un diseño completamente al azar. Los resultados mostraron que existe un efecto inhibitor del aceite esencial de naranja (AEN) en el crecimiento micelial de los hongos in vitro, superior al 80% a concentración de AE de 1%, y 100% de inhibición a concentraciones de 2,5% y 5% de AE ($p < 0,05$). Al ser utilizado como recubrimiento de los frutos, a concentraciones de 2,5% y 5%, disminuye la presencia de lesiones en los mismos, sin diferencias significativas ($p < 0,05$), con igual comportamiento en efectividad in vitro e in vivo. El AEN puede ser una alternativa factible, para el control natural y eficaz de hongos postcosecha, causantes de grandes pérdidas en frutas para exportación y consumo [33].

2.2.4. Actividad antifúngica del aceite esencial y sus componentes en el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*)

El efecto antifúngico de aceites esenciales y sus compuestos fue investigado en bioensayos de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp. Durante ocho días de incubación se midió el diámetro de la colonia y se determinó la tasa de crecimiento micelial. En general, el mejor efecto antifúngico fue observado con el aceite de *Thymus vulgaris*, el cual presentó una total inhibición a 200, 250 y 300 $\mu\text{g/ml}$. Los aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Teloxys ambrosioides*, exhibieron

una inhibición del crecimiento micelial dependiente de la dosis al incrementarla de 100 a 300 µg/ml. Mientras que los aceites de *Allium sativum*, *Citrus aurantifolia*, *Ruta chalepensis*, *Mentha piperita* y *Eucalyptus globulus* no tuvieron actividad antifúngica en las diferentes concentraciones probadas. Todos los compuestos con excepción del cineol tuvieron un efecto fungicida o fungistático [34].

2.2.5. 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

Se evaluó la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Eucalyptus* sp (*Myrtaceae*) y cáscara de naranja, *Citrus sinensis* (*Rutaceae*) a diferentes concentraciones frente a los modelos biológicos: *Trichoderma harzianum*, *Absidia* sp y *Fusarium oxysporum*, hongo que es considerado como un patógeno importante de humanos y plantas. El aceite esencial de eucalipto inhibió completamente el crecimiento de este hongo a 3000 ppm, mostrando mayor potencial inhibitorio que el fungicida comercial Dithane empleado a 10000 ppm. Los hongos *Absidia* sp y *Trichoderma harzianum* resultaron ser más susceptibles a los componentes del aceite y su crecimiento fue inhibido por completo a 1000 ppm. El aceite esencial de cáscara de naranja fue menos efectivo y solamente mostró actividad fungicida sobre el hongo *Trichoderma harzianum* a 11000 ppm. Los hongos *F. oxysporum* y *Absidia* sp no fueron afectados por los componentes de ese aceite esencial en ninguna de las concentraciones evaluadas (de 100 a 12000 ppm) [35].

2.2.6. Efecto de aceites esenciales extraídos de la cascara de dos especies de cítricos en algunos hongos.

Este estudio investigó el efecto de los aceites esenciales extraídos de la cáscara de *Citrus limon* y *Citrus reticulata* en dos especies de hongos: *Penicillium expansum* y *Fusarium proliferatum* y también el efecto de dos fungicidas: Hymexazol y Benomyl contra estos hongos. Los resultados demostraron que los aceites esenciales de *C. limon* inhibían el crecimiento radial de *P. expansum* y *F. Proliferatum* a una concentración de 4,5 y 5%, respectivamente. Sin embargo, el aceite esencial de *C. reticulata* inhibieron este crecimiento a una concentración de 5,5 % y 6%, respectivamente. Además, los dos fungicidas estudiados inhibieron el crecimiento radial de este hongo [36].

En conclusión, existe una relación entre el aumento de la concentración y el porcentaje de inhibición de crecimiento radial de hongos [36].

2.2.7. Actividad Antibacterial y Antifúngica In-Vitro de Aceites Esenciales Seleccionados

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (aceite de naranja, aceite de palmarosa moha y aceite Palmarosa CN-5) se evaluó mediante el método de difusión de disco en bacterias patógenas humanas, es decir *Staphylococcus aureus*, *Proteus Vulgaris* y hongos patógenos de plantas, es decir, *Aspergillus niger*, *Penicillium Chrysogenum*, *Fusarium acuminatum* y *Phanerochaete Chrysosporium*. La actividad antimicrobiana in vitro del aceite de naranja, Palmarosa moha y Palmarosa CN-5 contra los microorganismos y su actividad potencial fueron evaluados cuantitativamente por presencia o ausencia de zona de inhibición [37].

La actividad antifúngica del aceite de naranja se encontró menor que la de Neomicina (ZOI 26,5 mm) y Cloxacilina (ZOI 28,5 mm). Los hongos patógenos vegetales (es decir, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Phenerochactan*) se encontraron resistentes al aceite de naranja con concentraciones de 20, 30, 40, 50 y 60 µl de aceite. La actividad antibacteriana y antifúngica del aceite de naranja fue insignificante ($P > 0,05$) en comparación con los antibióticos estándar. La actividad del aceite de Palmarosa moha se encontró mejor que la de Neomicina (ZOI 7,5 mm) y aceite de naranja [37].

2.2.8. Análisis multivariado de los componentes del aceite esencial del género *Cítrus* y su actividad antifúngica

Los aceites esenciales y sus componentes químicos se analizaron mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis Cluster Jerárquico (HCA). La identificación química y la cuantificación del Aceites esenciales basados en cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas (GC / MS) mostrando varias sustancias se correlacionan entre sí, siendo el limoneno el compuesto más predominante. Los aceites esenciales fueron agrupados en tres grupos sobre la base de análisis multivariante. El primer grupo *Citrus sinensis* (naranja) y *Citrus reticulata* (ponkan), la segunda *Citrus limonia* (lima limón) y la tercera *Citrus aurantifolia* (lima) y *Citrus medica* (citrón) [38].

Usando la concentración de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el aceite esencial del tercer grupo (lima, citrón) inhibió completamente el crecimiento micelial de los hongos *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*., mientras que los otros aceites esenciales con la misma concentración presentó una menor poder inhibitorio. Por otro lado, utilizando la misma concentración, sólo el aceite esencial del citrón fue capaz de inhibir completamente el crecimiento micelial de los hongos *Colletotrichum musae*. Los aceites esenciales de *C. medica* (cidra) y *C. aurantifolia* (cal) mostraron una inhibición total del crecimiento micelial de los hongos *F. oxysporum* y *A. alternata* en la concentración de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [38].

2.2.9. Composición Química y Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Cítricos Argelinos

El objetivo de este estudio fue determinar la composición química de los aceites esenciales de cítricos argelinos. Fueron extraídos por hidrodestilación de las hojas de especies de cítricos (naranja, Bigaradier, mandarina y limón), utilizando cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC / MS). Su composición química y su actividad antifúngica contra cuatro hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *albedinis* sp, *Penicelium* sp., *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp.). La concentración mínima inhibidora (CMI) también se dio para los cuatro aceites. Diez compuestos fueron registrados conjuntamente entre los 51 identificados, de los cuales limoneno (7,18 a 36,10%), β pineno (4,35 a 30,0%) y linalol (0,21 a 63,03%) representan los principales compuestos [39].

Estos resultados indican que los aceites esenciales se pueden emplear como fungicidas contra hongos fitopatógenos. El crecimiento radial de *Fusarium. ox*, *A. sp* y *Fusarium. sp* fueron significativamente reducido con aceite esencial de naranja en respuesta a las concentraciones de aceites esenciales de bigaradier, mandarina y limon, con concentraciones de 1 a 0,05 mg / ml. Los resultados de los efectos de la inhibición en la producción y la germinación de las esporas por los aceites esenciales en comparación con el Control, se expresan por el porcentaje de inhibición de la producción de esporas (PIs%) y la inhibición porcentaje de germinación de las esporas (%) [39].

La producción de esporas fue fuertemente inhibida por los aceites de naranja, Bigaradier, mandarina y limón en *Fusarium oxysporum*, *Penicilium*. sp y *A.* sp. El mayor porcentaje de inhibición de germinación de esporas se registró en *Penicilium*. sp con limón (97, 85%). Y se notó una estimulación de la producción de esporas con *Fusarium*. sp para aceites esenciales de limón y mandarina [39].

Se estudió la capacidad de los cítricos para inhibir la germinación de las esporas a partir de esporas de cultivos previamente expuestos a aceites esenciales. AEs de naranja, Bigaradier, mandarina y limón fueron expuestos a inhibiciones de las diferentes esporas germinadas. El más eficaz frente a todas las poblaciones de hongos probados fue el aceite de naranja, con una fuerte inhibición de porcentaje de germinación de esporas de (PIg 58,66 a 100%). Se observó en *Alternaria* sp una estimulación de la germinación de las esporas por la bioactividad de los aceites esenciales extraídos de limón y mandarina [39].

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

Para la desarrollo de este Proyecto de Investigación se utilizó materiales y equipos disponibles en el Laboratorio de Química Básica, Biotecnología y Microbiología la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Ubicación geográfica.

Altitud: 76 m.s.n.m

Longitudes: 79° 28' 30" Oeste

Latitud: 1° 6' S

T° media: 24.8

3.2. Tipo de investigación

Este proyecto es considerado una investigación que corresponde al nivel explicativo ya que una de las mayores problemáticas en el almacenamiento de frijol en bodegas es el daño ocasionado por hongos, esta infección produce pudrición, pérdida de capacidad de germinación y riesgo a la salud pública; por tal motivo mediante la evaluación de concentraciones de aceite esencial de naranja se pretende minimizar el daño ocasionado por *Fusarium* en frijol almacenado.

3.3. Métodos de investigación

3.3.1. Método experimental

En esta investigación se aplica el método experimental al relacionar las variables de estudio entre sí y controlando las demás variables que puedan surgir e influir en el estudio; de esto se obtiene resultados en donde luego se aplicará análisis de varianza y prueba de significación Tukey, utilizando el sistema Statgraphics.

3.3.2. Método inductivo- deductivo

En este Proyecto de Investigación se constató la contaminación de frijol por hongos almacenados en bodegas. El investigador se involucra de lleno en la recopilación de información y aplicación del conocimiento adquirido en el problema ya constatado anteriormente.

En este caso sería el evaluar las concentraciones de aceite esencial de naranja para inhibición de *Fusarium* spp en frijol canario. De esta manera mediante los resultados obtenidos al estudiar estas variables se concluye si el aceite esencial de naranja inhibe o no el hongo encontrado en frijol canario almacenado.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

Las fuentes utilizadas para respaldar este Proyecto de Investigación fueron: libros, artículos científicos (Scielo, Dialnet, entre otros.), revistas científicas, páginas web, guías prácticas, de igual manera todo el aporte obtenido de cada fuente consta de su respectiva bibliografía.

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Diseño estadístico de la investigación.

Factores de estudio

Los factores de estudio que intervinieron en esta investigación fueron los siguientes:

- ✓ Factor A: 2 (Hongos aislados de *Phaseolus vulgaris* L.)
- ✓ Factor B: 3 (Aceites Esenciales)
- ✓ Factor C: 3 (Concentraciones de AEs)

Lo que corresponde a 18 tratamientos, con 2 repeticiones da un total de 36 tratamientos en la investigación.

Cuadro 1: Factores de estudio para la evaluación de concentraciones de aceites esenciales de citrus sinensis (naranja) en la inhibición de hongos patógenos en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol canario).

Factores	Simbología	Descripción
A: Hongos	a ₀	Hongo 1
	a ₁	Hongo 2
B: Aceites esenciales	b ₀	Hojas
	b ₁	Corteza
	b ₂	Comercial
C: Concentraciones	c ₀	150 ul
	c ₁	250 ul
	c ₂	350 ul

Elaborado: Daquilema, J. (2016).

3.6. Instrumentos de investigación

En la presente investigación los datos de cada uno de los tratamientos obtenidos fueron ingresados en un programa estadístico como es el Statgraphics que permite establecer si es que existe o no diferencia significativa entre cada uno de los factores analizados.

3.7. Tratamiento de los datos

Cuadro 2: Combinación de los tratamientos propuestos para la evaluación de concentraciones de aceites esenciales de citrus sinensis (naranja) en la inhibición de hongos patógenos en *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol Canario).

Tratamiento	Simbología	Descripción
T1	a ₀ b ₀ c ₀	Fusarium spp 1, Hojas, 1,5 %.
T2	a ₀ b ₀ c ₁	Fusarium spp 1, Hojas, 2,5 %
T3	a ₀ b ₀ c ₂	Fusarium spp 1, Hojas, 3,5 %
T4	a ₀ b ₁ c ₀	Fusarium spp 1, Corteza, 1,5 %
T5	a ₀ b ₁ c ₁	Fusarium spp 1, Corteza, 2,5 %
T6	a ₀ b ₁ c ₂	Fusarium spp 1, Corteza, 3,5 %
T7	a ₁ b ₀ c ₀	Fusarium spp 1, Comercial, 1,5 %
T8	a ₁ b ₀ c ₁	Fusarium spp 1, Comercial, 2,5 %
T9	a ₁ b ₀ c ₂	Fusarium spp 1, Comercial, 3,5 %
T10	a ₁ b ₁ c ₀	Fusarium spp 2, Hojas, 1,5 %
T11	a ₁ b ₁ c ₁	Fusarium spp 2, Hojas, 2,5 %.
T12	a ₁ b ₁ c ₂	Fusarium spp 2, Hojas, 3,5 %
T13	a ₃ b ₀ c ₀	Fusarium spp 2, Corteza, 1,5 %
T14	a ₃ b ₀ c ₁	Fusarium spp 2, Corteza, 2,5 %
T15	a ₃ b ₀ c ₂	Fusarium spp 2, Corteza, 3,5 %
T16	a ₃ b ₁ c ₀	Fusarium spp 2, Comercial, 1,5 %
T17	a ₃ b ₁ c ₁	Fusarium spp 2, Comercial, 2,5 %
T18	a ₃ b ₁ c ₂	Fusarium spp 2, Comercial, 3,5 %

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

3.8. Recursos humanos y materiales

- ✓ Tutor de proyecto de investigación
- ✓ Jefe de laboratorio de Microbiología
- ✓ Jefe de laboratorio de Química básica
- ✓ Jefe de laboratorio de Biotecnología

Cuadro 3: Materiales y equipos

PDA (Papa Dextrosa Agar)		
Materiales	Equipos	Reactivos
Matraz Erlenmeyer 1000mL	Microondas	PDA (Papa Dextrosa Agar)
Marcador indelible	Refrigerador	Sulfato de Estreptomicina"GM"
Papel aluminio	Autoclave	Alcohol
Varilla de vidrio	Balanza	Agua destilada
Envases de vidrio		
Aislamiento hongos.		
Cajas Petri	Cámara de aislamiento laminar	PDA (Papa Dextrosa Agar) con antibiótico (Sulfato de Estreptomicina"GM") al 1%.
Probeta 100 mL	Incubadora	Alcohol
Marcador indeleble		Agua esterilizada
Algodón		Hipoclorito al 3%
Papel toalla		
Bisturí		
Pinzas de disección		
Cinta Parafilm		
Mechero		
Repique de hongos		
Materiales	Equipos	Otros
Tubos de ensayo	Cámara de aislamiento laminar	Hongo madre por identificar.
Cajas Petri	Refrigerador	Alcohol
Gradilla	Incubadora	
Marcador indeleble		
Algodón		
Asa		
Mechero		
Inhibición de hongos		
Materiales	Equipos	Reactivos
Matraz Erlenmeyer 100mL	Cámara de flujo laminar	PDA (Papa Dextrosa Agar)
Probeta de 100 mL	Incubadora	Sulfato de Estreptomicina"GM"
Cajas Petri	Contador de colonias	Alcohol
Marcador indelible		Agua destilada
Algodón		Solución de TWEEN 20
Mechero		Aceite esencial de hojas y corteza de mandarina
Asa		Aceite esencial de hojas y corteza de naranja
Micropipeta de 100 µL a 1000µL		
Cinta Parafilm		
Pipetas Pasteur esterilizadas		
Calibrador de Vernier		
Conteo de esporas.		
Probeta de 10mL	Microscopio Olympus CX21	Solución de tween 20
Varilla de vidrio	Agitador	Agua esterilizada
Gasa	Cámara de recuento	Alcohol
Microtubos eppendorf	Neubauer	
Micropipeta de 10µL a 100µL	Contador de Esporas	
Marcador indeleble		
Mechero		
Papel toalla		

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

3.9. Manejo específico del experimento.

Para la inhibición de los hongos (*Fusarium sp*) aislados de frijol canario (*Phaseolus vulgaris* L.) aplicando aceites esenciales de naranja (corteza, hojas) y aceite comercial obtenido de Isabruk Botanic.

✓ Obtención de los aceites esenciales

Para la extracción de aceite esencial se empleó el método de hidrodestilación por arrastre con vapor de agua convencional (HD) con capacidad para 4 L (balón de destilación) [40].

Se pesó 200 g del material vegetal y la corteza del fruto, se seleccionó y troceó. Fueron introducidos en el balón de extracción, el cual contenía 400 mL de agua destilada. En el proceso de arrastre con vapor empleando manta de calentamiento el tiempo de extracción fue de 4 horas a 70 °C. Para la separación del aceite esencial del agua se utilizó éter etílico y sulfato de sodio, conservando los aceites en frascos ámbar protegidos de la luz en refrigeración a 4 °C.

Mientras que el aceite esencial comercial se adquirieron del laboratorio ISABRUK BOTANIC.S.A. de la ciudad de Ambato.

✓ Preparación del PDA (Papa Dextrosa Agar)

Para la preparación del PDA se utilizó 39 g de PDA (Papa Dextrosa Agar) disueltos en 1000 mL de agua esterilizada, seguido de esto se mantuvo en el microondas durante 10 minutos para que se disuelva completamente. Se esterilizó por tres horas en el autoclave. Cuando estuvo completamente esterilizado, se esperó hasta que el PDA se entibie para disolver los antibióticos; 500 uL de cada uno, en este caso fue Cloranfenicol y Sulfato de Estreptomicina, para su conservación se lo mantuvo en refrigeración.

✓ Desinfección del frijol.

Se desinfecto las muestras en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% durante 3 minutos. Se enjuagó luego los muestras desinfectadas con agua destilada estéril y se

colocó las muestras lavadas sobre toallas de papel estériles hasta que se sequen [41].

✓ **Aislamiento de los hongos.**

Para el aislamiento de los hongos realizándose en la cámara de aislamiento laminar previamente desinfectada con alcohol, con la pinza esterilizada se siembra cinco muestras de frijol canario en la caja petri dispensada con PDA (Papa Dextrosa Agar) rotulando y sellando con cinta Parafilm para dejar en la incubadora por 7 días a 27°C; cuando el hongo se desarrolló completamente se mantuvo en refrigeración ya que esta se considera como muestra madre.

✓ **Repique de hongos aislados**

En la cámara laminar se aisló el hongo se abre la caja petri del hongo madre cerca del mechero y con el asa se quitó una parte del hongo sembrándolo en el centro de los tubos de ensayo con PDA (Papa Dextrosa Agar) tipo pico flauta se dejaron en la incubadora a 27°C por 5 días; posteriormente para conocer el tiempo de desarrollo del hongos se sembró en cajas Petri y se esperó hasta que el hongo cubrió totalmente la caja; el hongo encontrado fue *Fusarium* de dos especies que lograron desarrollarse en 7 días

✓ **Proceso de Inhibición de hongos.**

Para la inhibición del hongo *Fusarium sp* de dos especies (F sp1 y F sp2)se dejaron dos testigo para comparar con los tratamientos evaluando el porcentaje de inhibición de los aceites esenciales de la naranja obtenidos de la corteza y del material vegetal; se utilizaron concentraciones de 3,5%, 2,5% y 1,5% disueltos en una solución de Tween 20 y PDA dispensado en cajas Petri, se sembró los hongos dejándolos en la incubadora a 24°C; se realizó un control del desarrollo de los hongos durante 7 días midiendo el crecimiento radial con el calibrador Vernaut y el contador de colonias.

Se realizó la evaluación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR), empleando la fórmula de Abbott [42].

$$PICR (\%) = \frac{RC - RT}{RC} \times 100$$

Dónde: RC = Radio del micelio del control.

RT = Radio del micelio del tratamiento.

✓ **Conteo de esporas**

Se obtuvieron las cajas petri con las muestras de hongos de *Fusarium* spp en los cuales se le aplicó 10 mL de agua estéril y 20 uL de TWEEN 20 y con una varilla se raspó el micelio, para luego con una micropipeta de 1000 uL tomar una parte de la muestra y filtrar mediante una gasa estéril para que se deposite en microtubos eppendorf. Se agitó por 10 segundos. Seguido de esto se utilizó la cámara Neubauer y se tomó 20 uL de la muestra ya filtrada para depositarla dentro de la cámara situándolo en el microscopio Olympus CX21 observando las esporas con el lente 10 contándolas con el contador de esporas; para calcular el porcentaje de inhibición de las esporas se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Número esporas testigo} - \text{Número de esporas tratamiento}}{\text{Número de esporas del testigo}} * 100$$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados.

4.1.1. Identificación del hongo aislado en el frijol canario almacenados en bodegas.

Los hongos patógenos identificados en el frijol canario fueron aislados desde la semillas verificando en placas petri: PDA con las características morfológicas para *Fusarium* spp 1 y *Fusarium* spp 2

Características macroscópicas para la identificación taxonómica del aislamiento correspondiente a *Fusarium* spp 1 y *Fusarium* spp 2

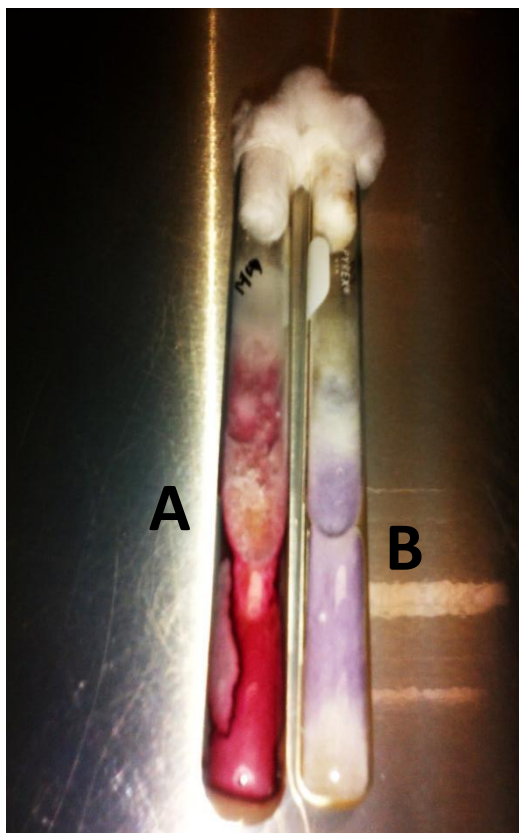


Fig. 1: Colonia de los hongos aislados de semillas de frijol canario en tubos de ensayo. A Colonia del hongo con formación del micelio rojo algodonoso. B Colonia del hongo con formación del micelio violeta algodonoso

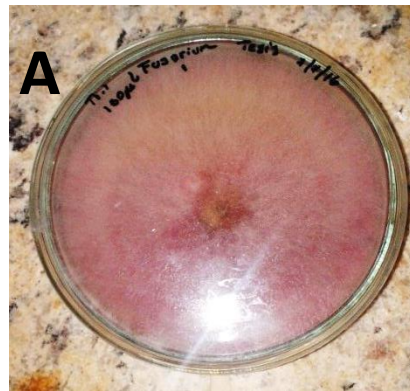


Fig. 2: Colonia en PDA, incubada a 27 °C por 7 días. Colonia del hongo con formación del micelio rojo algodonoso.

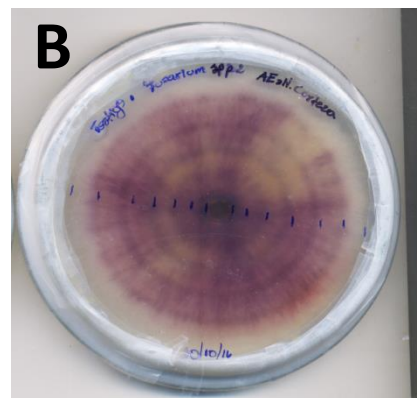


Fig. 3: Colonia en PDA, incubada a 27 °C por 7 días. Colonia del hongo con formación del micelio

Características microscópicas para la identificación taxonómica del aislamiento correspondiente a *Fusarium* spp 1 y *Fusarium* spp 2

La fiálide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios son esporas que presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodoquios) y detalles de las células de los extremos (célula apical y pie). Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), en cadenas largas o cortas. Otro tipo de conidios son los mesoconidios, que son similares pero de menor tamaño que los macroconidios y nunca forman estructuras mucoides. Las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo [43].

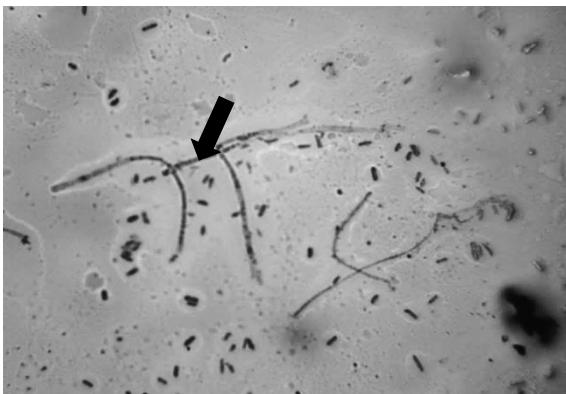


Fig. 1: Filiades Laterales. *Fusarium* spp 1

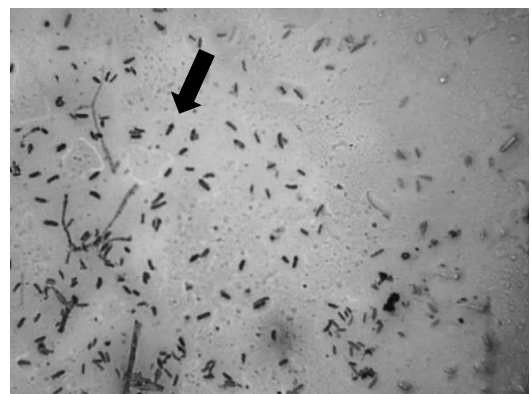


Fig. 2: Microconidias Unicelulares.

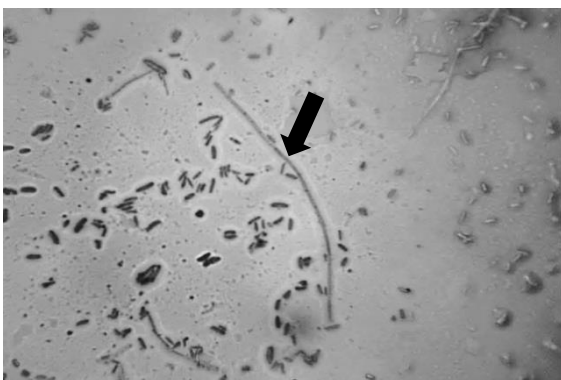


Fig. 3: Fiálides laterales. *Fusarium* spp 2

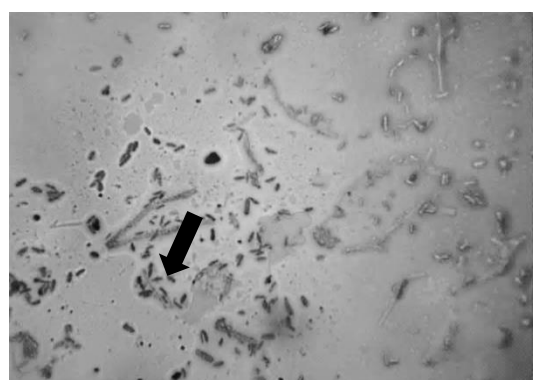


Fig. 4: Microconidias Unicelulares.
Fusarium spp 2

4.1.2. Actividad Antifúngica del aceite esencial de *Citrus sinensis* (Hojas, Corteza y Comercial)

Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* spp 1 durante las 48 horas, 96 horas y 168 horas de medición

La actividad antifúngica del aceite esencial obtenido de hojas de *Citrus sinensis* al 1,5% durante las primeras 48 horas de medición se verifica el 94,44% de inhibición de crecimiento radial, mientras que en concentraciones de 2,5 % y 3,5 % de aceite esencial extraído de hojas se logró inhibir en un 100 % el crecimiento radial. En el aceite esencial extraído de corteza al 1,5 %, se observó una actividad antifúngica de 8,33 % de inhibición de crecimiento radial, sin embargo al usar concentraciones de 2,5% y 3,5% se obtuvo una actividad antifúngica de 16,05% y 66,11 % de inhibición de crecimiento radial respectivamente. El aceite esencial comercial obtuvo el porcentaje más alto de actividad antifúngica con un 100% de inhibición de crecimiento radial.

A las 96 horas la actividad antifúngica del aceite esencial extraído de hojas al 1,5 % mostro el 92,45 % de inhibición de crecimiento radial, mientras que al utilizar el 2,5 % de aceite se verifico el 96,78% de inhibición de crecimiento radial y al usar el 3,5 % de aceite esencial de hojas se obtuvo un 100 % de inhibición. Para el aceite esencial extraído de corteza los resultados fueron: un 4,48 % de actividad antifúngica frente al 8,33 % y al 51,89 % de inhibición de crecimiento radial que presentaron las muestras con sus respectivas concentraciones de aceite. El aceite esencial adquirido en el laboratorio de Isabruk Botanic presento la mayor actividad antifúngica con una inhibición del 100 %.

Los resultados finales a las 168 horas fueron: con una concentración del 1,5 % de aceite esencial extraído de hojas se verifico un 92,7% de inhibición, mientras que en concentraciones del 2,5 %, y 3,5 % su porcentaje de inhibición del crecimiento radial es del 95,22 % y 95,68 %. Mientras que la actividad antifúngica del aceite esencial de corteza de naranja presenta un porcentaje de inhibición del crecimiento radial de 0%, 10,48% y 23,21% en concentraciones del 1,5 %, 2,5 %, y 3,5 % respectivamente. Por último, para el aceite esencial comercial se evidencio una actividad antifúngica del crecimiento radial del 100% en sus tres concentraciones.

Cuadro 4: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* spp 1 mediante prueba de Tukey.

Porcentaje de Inhibición Crecimiento Radial <i>Fusarium</i> spp 1						
Descripción	48 horas	Desviación Estándar	96 horas	Desviación Estándar	168 horas	Desviación Estándar
AEs Hojas 1,5 %	94,44 E	± 2,4	92,45 E	± 0	92,70 E	± 2,3
AEs Hojas 2,5 %	100 E	0	96,78 F	± 1,1	95,22 E	± 2,1
AEs Hojas 3,5 %	100 E	0	100 F	± 0	95,68 E	± 2,9
AEs Corteza 1,5 %	8,33 B	0	4,48 B	± 1,0	0 B	± 0
AEs Corteza 2,5 %	16,05 C	± 6,7	8,33 C	± 2,8	10,48 C	± 1,3
AEs Corteza 3,5 %	66,11 D	± 4,3	51,89 D	± 2,5	23,21 D	± 1,0
AEs Comercial 1,5 %	100 E	0	100 F	± 0	100 F	± 0
AEs Comercial 2,5 %	100 E	0	100 F	± 0	100 F	± 0
AEs Comercial 3,5 %	100 E	0	100 F	± 0	100 F	± 0
Control	0 A	0	0 A	± 0	0 A	± 0

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

Inhibición de germinación de esporas del *Fusarium* spp 1, posterior a las 168 horas

El aceite esencial de hojas (b_0) inhibió significativamente el crecimiento de Esporas, obteniendo un porcentaje del 100% en sus diferentes concentraciones. Por otro lado el aceite esencial de corteza (b_1) obtuvo porcentajes de inhibición del 93,41% 94,5% y 96,27%. Y por último el aceite esencial comercial (b_2) inhibió en su totalidad el Crecimiento de Esporas. Mientras que el control obtuvo un 0% de inhibición.

Cuadro 5: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición de Germinación de Esporas de *Fusarium* spp 1 mediante prueba de Tukey.

Porcentaje de Inhibición de Esporas <i>Fusarium</i> spp 1		
Descripción	168 horas	Desviación Estándar
AEs Hojas 1,5 %	100 D	0
AEs Hojas 2,5 %	100 D	0
AEs Hojas 3,5 %	100 D	0
AEs Corteza 1,5 %	93,41 B	± 0,6
AEs Corteza 2,5 %	94,5 B	± 1,8
AEs Corteza 3,5 %	96,27 C	± 0,2
AEs Comercial 1,5 %	100 D	0
AEs Comercial 2,5 %	100 D	0
AEs Comercial 3,5 %	100 D	0
Control	0 A	0

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* spp 2 durante las 48 horas, 96 horas y 168 horas de medición

La actividad antifúngica del aceite esencial extraído de hojas de naranja presento un 85,69% de inhibición de crecimiento radial durante las 48 horas de medición. Sin embargo la actividad antifúngica fue más alta al utilizar el 2,5% de aceite y 3,5 % es decir; un promedio de 91,54 % y 90,26 % de inhibición radial. El aceite esencial extraído de corteza obtuvo una inhibición de crecimiento micelial del 53,90 % frente al 69,49 % y 66,87 %, resultados que fueron los más bajos en cuanto a la actividad antifúngica del aceite esencial. Sin embargo, el aceite esencial comercial inhibió en su totalidad el crecimiento radial del *Fusarium* spp 2 durante las primeras 48 horas de medición. El control obtuvo un 0 % de inhibición.

Durante las 96 horas el porcentaje de inhibición radial fue de 89,26%, un promedio mayor se obtuvo en 2,5% de aceite esencial extraído de hojas de naranja, es decir, una inhibición radial del 91,49% frente al 91,11%. Los resultados obtenidos para la actividad antifúngica del aceite esencial de corteza fueron relativamente bajos en consideración a los anteriores debido a que solo presentaron una inhibición del crecimiento radial del 13,49 en 1,5% de aceite, mientras que al 2,5% la inhibición radial fue de 51,28 frente al 48,10% de inhibición micelial al 3,5% de aceite esencial.

A las 168 horas la actividad antifúngica del aceite esencial de hojas de *Citrus sinensis* obteniendo porcentajes de inhibición del 80,61%, 91,30%, y 90,96% con las concentraciones de aceite esencial respectivamente. El aceite esencial de corteza con las mismas concentraciones; inhibió el crecimiento radial en 14,11%, 19,49% y 13,11%. Por otro lado, el aceite esencial comercial, inhibió en su totalidad el Crecimiento Radial a una concentración de 3,5 mientras que al 2,5% inhibió un 96,49% y un 90,09% al 1,5% de aceite esencial.

Cuadro 6: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de inhibición del Crecimiento Radial de *Fusarium* spp 2 mediante prueba de Tukey.

Porcentaje de Inhibición Crecimiento Radial <i>Fusarium</i> spp 2						
Descripción	48 horas	Desviación Estándar	96 horas	Desviación Estándar	168 horas	Desviación Estándar
AEs Hojas 1,5 %	85,69 D	± 2,41	89,26 D	± 1,96	80,61 C	± 0,84
AEs Hojas 2,5 %	91,54 D E	± 7,80	91,49 D	± 3,92	91,30 C D	± 1,99
AEs Hojas 3,5 %	90,26 D	± 1,93	91,11 D	± 1,33	90,96 C D	± 1,06
AEs Corteza 1,5 %	53,90 B	± 3,84	13,49	± 10,90	14,11 B	± 9,35
AEs Corteza 2,5 %	69,49 C	± 3,87	51,284 C	± 6,51	19,49 B	± 3,97
AEs Corteza 3,5 %	66,87 C	± 2,06	48,10 C	± 1,85	13,10 B	± 0,09
AEs Comercial 1,5 %	100 E	0	100 D	0	90,09 C D	± 1,97
AEs Comercial 2,5 %	100 E	0	100 D	0	96,49 D	± 6,08
AEs Comercial 3,5 %	100 E	0	100 D	0	100 D	0
Control	0 A	0	0 A	0	0 A	0

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

Inhibición de germinación de esporas del *Fusarium* spp 1, posterior a las 168 horas

El crecimiento de esporas se vio afectado en su totalidad al utilizar las dos concentraciones mas altas de aceite esencial de hojas de *Citrus sinensi*, debido a que se obtuvo un porcentaje de inhibición del 100% frente al 98,08% del 1,5% de aceite esencial. El aceite esencial de corteza tuvo una menor actividad antifúngica, siendo el 91,02% su promedio de inhibición más alto, mientras que para las demás concentraciones la inhibición del crecimiento de esporas fue de 79,80% y 79,31%. El *Fusarium* spp 2 fue sensible ante el aceite esencial comercial debido a que este inhibió en su totalidad el crecimiento de esporas. Obteniendo un porcentaje de inhibición del 100%.

Cuadro 7: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición de Germinación de Esporas de *Fusarium* spp 2 mediante prueba de Tukey.

Porcentaje de Inhibición de Esporas <i>Fusarium</i> spp 2		
Descripción	168 horas	Desviación Estándar
AEs Hojas 1,5 %	98,08 D	± 1,88
AEs Hojas 2,5 %	100 D	0
AEs Hojas 3,5 %	100 D	0
AEs Corteza 1,5 %	91,02 B	± 1,30
AEs Corteza 2,5 %	79,80 B	± 4,23
AEs Corteza 3,5 %	79,31 C	± 14,37
AEs Comercial 1,5 %	100 D	0
AEs Comercial 2,5 %	100 D	0
AEs Comercial 3,5 %	100 D	0
Control	0 A	0

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

4.1.3. Concentraciones de los aceites esenciales (1,5% 2,5% 3,5%) para la inhibición de hongos presentes en el frijol canario (*Phaseolus vulgaris* L.)

Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* spp 1 durante las 48 horas, 96 horas y 168 horas de medición

Las concentraciones utilizadas para inhibir el crecimiento radial de *Fusarium* spp 1; siendo las concentraciones de 2,5% y 3,5% las que presentaron un porcentaje inhibitorio del 100%; frente al 94,44% de inhibición radial que presento la concentración más baja que fue al 1,5% de aceite esencial extraído de hojas. Mientras tanto las concentraciones del aceite esencial de corteza, presentaron porcentajes inhibitorios muy bajos, es decir, a las 48 horas de medición el porcentaje de inhibición radial fue de 8,33% con el 1,5% de aceite esencial, 16,05% con el 2,5% de aceite y 66,11% con 3,5% de aceite extraído de corteza. Sin embargo, utilizando las tres concentraciones del 1,5 2,5% y 3,5% con aceite esencial comercial se inhibe en su totalidad el crecimiento radial.

A las 96 horas de medición del crecimiento micelial, el porcentaje de inhibición del aceite esencial de hojas de naranja al 1,5% 2,5% y 3,5% es de 92,45%, 96,78 y 100% de inhibición radial. Mientras que el 1,5% de aceite esencial extraído de corteza inhibió un 4,48%, y un 8,33% la concentración del 2,5% frente al 51,89% de inhibición radial que se presentó al usar el 3,5% de aceite esencial extraído de corteza. El aceite esencial de corteza se mantuvo al 100% de inhibición radial aun a las 96 horas de medición.

A las 168 horas la concentración del 3,5% de aceite esencial de hojas dio un promedio de 95,68, el más alto con respecto a las demás concentraciones que obtuvieron promedios de inhibición del 95,22% y 92,70% con concentraciones del 2,5% y 1,5% respectivamente. El aceite esencial de corteza aun con la concentración más alta solo inhibió un 23,21%, mientras que al 2,5% de aceite inhibió un 10,48% y al 1,5% de aceite esencial extraído de corteza no se dio ningún efecto inhibitorio en el crecimiento radial. Sin embargo, utilizando las tres concentraciones del 1,5 2,5% y 3,5% con aceite esencial comercial se inhibe en su totalidad el Crecimiento Radial.

Cuadro 8: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición del Crecimiento Radial de *Fusarium* spp 1 mediante prueba de Tukey.

Porcentaje de Inhibición Crecimiento Radial <i>Fusarium</i> spp 1						
Descripción	48 horas	Desviación Estándar	96 horas	Desviación Estándar	168 horas	Desviación Estándar
AEs Hojas 1,5 %	94,44 E	± 2,4	92,45 E	± 0	92,70 E	± 2,3
AEs Hojas 2,5 %	100 E	0	96,78 F	± 1,1	95,22 E	± 2,1
AEs Hojas 3,5 %	100 E	0	100 F	± 0	95,68 E	± 2,9
AEs Corteza 1,5 %	8,33 B	0	4,48 B	± 1,0	0 B	± 0
AEs Corteza 2,5 %	16,05 C	± 6,7	8,33 C	± 2,8	10,48 C	± 1,3
AEs Corteza 3,5 %	66,11 D	± 4,3	51,89 D	± 2,5	23,21 D	± 1,0
AEs Comercial 1,5 %	100 E	0	100 F	± 0	100 F	± 0
AEs Comercial 2,5 %	100 E	0	100 F	± 0	100 F	± 0
AEs Comercial 3,5 %	100 E	0	100 F	± 0	100 F	± 0
Control	0 A	0	0 A	± 0	0 A	± 0

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

Inhibición de germinación de esporas del *Fusarium* spp 1, posterior a las 168 horas

En la inhibición del crecimiento de esporas las concentraciones del 1,5 2,5% y 3,5% obtienen un porcentaje inhibitorio del 100 % ya sea con aceite esencial extraído de hojas o con aceite esencial comercial, mientras que la concentración de 3,5% en el aceite esencial de corteza inhibió en un 96,27% el crecimiento de esporas, un 94,5% se inhibió con una concentración del 2,5% y con el 1,5% de aceite esencial de corteza se logro inhibir un 93,41% la germinación de esporas.

Cuadro 9: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de inhibición de germinación de esporas de *Fusarium* spp 1 mediante prueba de Tukey.

Porcentaje de Inhibición de Esporas.		
Descripción	168 horas	Desviación Estándar
AEs Hojas 1,5 %	100 D	0
AEs Hojas 2,5 %	100 D	0
AEs Hojas 3,5 %	100 D	0
AEs Corteza 1,5 %	93,41 B	± 0,6
AEs Corteza 2,5 %	94,5 B	± 1,8
AEs Corteza 3,5 %	96,27 C	± 0,2
AEs Comercial 1,5 %	100 D	0
AEs Comercial 2,5 %	100 D	0
AEs Comercial 3,5 %	100 D	0
Control	0 A	0

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* spp 2 durante las 48 horas, 96 horas y 168 horas de medición

A las 48 horas de medición de crecimiento radial, las concentraciones del 1,5% 2,5% y 3,5% de aceite esencial extraído de hojas presentaron porcentajes de inhibición del 85,69% 91,54% y 90,26%. Mientras que para el aceite esencial extraído de corteza el porcentaje más bajo de inhibición se obtuvo con el 1,5% de aceite al indicar un porcentaje inhibitorio del 53,90%, resultados similares se obtuvieron al observar los porcentajes inhibitorios de las concentraciones del 2,5% y 3,5% es decir se inhibió un 69,49% y 66,87% del crecimiento micelial respectivamente. Mientras que el aceite esencial comercial en sus tres concentraciones inhibió en su totalidad el crecimiento radial.

A las 96 horas el aceite esencial de hojas al 1,5% inhibió un 89,26% el crecimiento radial, el 2,5% inhibió un 91,49% y el 3,5% de aceite esencial de hojas inhibió el crecimiento radial al 91,11%. La concentración del 2,5% de aceite esencial de corteza dio un promedio de 51,28 % de inhibición, mientras que el 3,5% dio un promedio del 48,10% y un promedio de inhibición más bajo se obtuvo al usar el 1,5% de aceite esencial, es decir un 13,49% de inhibición radial. El aceite esencial comercial se mantuvo con el 100% de inhibición en las tres concentraciones.

La concentración que brindó la mayor inhibición en el crecimiento radial del *Fusarium* spp 2 a las 168 horas de medición fue del 2,5% frente al 3,5% con porcentajes de 91,30% y 90,96% respectivamente. Estas mismas concentraciones usando aceite esencial de corteza no tuvieron un poder inhibitorio frente al crecimiento radial del *Fusarium* spp 2. Mientras que la concentración de 3,5% del aceite esencial comercial inhibió en su totalidad el crecimiento radial.

Cuadro 10: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición del Crecimiento Radial de *Fusarium* spp 2 mediante prueba de Tukey.

Porcentaje de Inhibición Crecimiento Radial <i>Fusarium</i> spp 2						
Descripción	48 horas	Desviación Estándar	96 horas	Desviación Estándar	168 horas	Desviación Estándar
AEs Hojas 1,5 %	85,69 D	± 2,41	89,26 D	± 1,96	80,61 C	± 0,84
AEs Hojas 2,5 %	91,54 D E	± 7,80	91,49 D	± 3,92	91,30 C D	± 1,99
AEs Hojas 3,5 %	90,26 D	± 1,93	91,11 D	± 1,33	90,96 C D	± 1,06
AEs Corteza 1,5 %	53,90 B	± 3,84	13,49	± 10,90	14,11 B	± 9,35
AEs Corteza 2,5 %	69,49 C	± 3,87	51,284 C	± 6,51	19,49 B	± 3,97
AEs Corteza 3,5 %	66,87 C	± 2,06	48,10 C	± 1,85	13,10 B	± 0,09
AEs Comercial 1,5 %	100 E	0	100 D	0	90,09 C D	± 1,97
AEs Comercial 2,5 %	100 E	0	100 D	0	96,49 D	± 6,08
AEs Comercial 3,5 %	100 E	0	100 D	0	100 D	0
Control	0 A	0	0 A	0	0 A	0

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

Inhibición de germinación de esporas del *Fusarium* spp 2, posterior a las 168 horas

Las concentraciones que obtuvieron un porcentaje del 100% en la inhibición del crecimiento de esporas fue del 2,5% y 3,5% en el aceite esencial de hojas. Mientras que la concentración del 1,5% tuvo un porcentaje inhibitorio del 91,02% frente al 79,80% de la concentración del 2,5% del aceite esencial de corteza.

Las concentraciones del 1,5% 2,5% y 3,5% del aceite esencial comercial inhibieron en su totalidad el crecimiento radial de esporas del *Fusarium* spp 2.

Cuadro 11: Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición de Germinación de Esporas de *Fusarium* spp 2 mediante prueba de Tukey.

Porcentaje de Inhibición de Esporas <i>Fusarium</i> spp 2		
Descripción	168 horas	Desviación Estándar
AEs Hojas 1,5 %	98,08 D	± 1,88
AEs Hojas 2,5 %	100 D	0
AEs Hojas 3,5 %	100 D	0
AEs Corteza 1,5 %	91,02 B	± 1,30
AEs Corteza 2,5 %	79,80 B	± 4,23
AEs Corteza 3,5 %	79,31 C	± 14,37
AEs Comercial 1,5 %	100 D	0
AEs Comercial 2,5 %	100 D	0
AEs Comercial 3,5 %	100 D	0
Control	0 A	0

Elaborado: Daquilema, J. (2016)

4.2. Discusión

4.2.1. Hongos aislados de *Phaseolus vulgaris* L

En el aislamiento del hongo en frijol canario almacenado en bodega se pudo identificar dos especies de *Fusarium* spp, mismos resultados que fueron obtenidos por [31] al identificar *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium incarnatum* transmitidos por semillas en el cultivo del frijol.

4.2.2. Actividad Antifúngica de los aceites esenciales

Aceite esencial de Hojas

Con respecto a los resultados obtenidos acerca de la actividad antifúngica del aceite esencial de hojas en *Fusarium* spp 1 se obtuvo un porcentaje de inhibición del crecimiento radial del 92,7% con una concentración del 1,5 %, en concentraciones del 2,5 % y 3,5 % su porcentaje de inhibición es del 95,22 % y 95,68 %. Y un 100% de inhibición en la germinación de Esporas. La actividad antifúngica del aceite esencial de hojas de *Citrus sinensis* mediante la Inhibición del crecimiento radial del *Fusarium* spp 2 obtuvo porcentajes de inhibición del 80,61%, 91,30%, y 90,96%. El crecimiento de esporas se vio afectado en su totalidad con el aceite esencial de hojas de *Citrus sinensis*, debido a que se obtuvo un porcentaje de inhibición del 100%. Resultados similares fueron obtenidos por [39] en donde el crecimiento radial de *Fusarium. oxysporum*, *Alternari. sp* y *Fusarium. sp* y la germinación de esporas de todas las poblaciones de hongos probados fueron significativamente reducidos con aceite esencial de naranja obtenido de hojas.

Aceite esencial de corteza

Mientras que el aceite esencial obtenido de corteza de naranja no presentó actividad antifúngica en las diferentes concentraciones probadas; obteniendo porcentajes de inhibición de crecimiento radial del 0 %, 10,48 % y 23,21 %. Sin embargo el aceite esencial de corteza sí obtuvo porcentajes de inhibición del 93,41 % 94,5 % y 96,27 % en el crecimiento de esporas. Y los resultados constatados por [35] en donde el aceite esencial de corteza de naranja solo mostró actividad antifúngica en *Trichoderma harzianum* mientras que para *Fusarium oxysporum* y *Absidia sp* no fueron afectados por

los componentes de ese aceite esencial en ninguna de las concentraciones evaluadas (de 100 a 12000 ppm).

El aceite esencial de corteza, con las mismas concentraciones; obtuvo un porcentaje inhibitorio bajo, solo logró inhibir el crecimiento radial del *Fusarium* spp 2 en 14,11%, 19,49% y 13,11%. Mientras que el aceite esencial de corteza tuvo un porcentaje de Inhibición de Esporas del 91,02%. Datos similares presenta [38], donde el aceite esencial de *Citrus sinensis* presentó un menor poder inhibitorio del crecimiento micelial de los hongos *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*

Aceite esencial comercial

Por último, el mejor efecto antifúngico en *Fusarium* spp 1 lo obtuvo el aceite esencial comercial debido a que se evidenció una actividad antifúngica del crecimiento radial y del crecimiento de esporas del 100% en sus tres concentraciones. Por otro lado, el aceite esencial comercial, inhibió en su totalidad el crecimiento radial del *Fusarium* spp 2 a una concentración de 3,5%. Este hongo fue sensible ante el aceite esencial comercial debido a que este inhibió en su totalidad la germinación de Esporas. Obteniendo un porcentaje de inhibición del 100%. Siendo estos valores superiores a los alcanzados por [34] debido a que en su estudio; el aceite esencial de *Citrus aurantifolia* no tuvo una actividad antifúngica en las diferentes concentraciones probadas.

4.2.3. Concentraciones de AEs

Concentraciones del AEs Hojas

Las concentraciones que presentaron mayor porcentaje inhibitorio en el crecimiento radial de *Fusarium* spp 1 fueron de 2,5% y 3,5% debido a que estas concentraciones lograron inhibir en 95,22% y 95,68% respectivamente. Mientras que las concentraciones de 1,5 2,5% y 3,5% lograron inhibir en su totalidad la germinación de esporas. En el *Fusarium* spp 2, la concentración que brindó la mayor inhibición en el Crecimiento Radial fue el de 2,5% frente a 3,5% con porcentajes de inhibición del 91,30% y 90,96% respectivamente. Las concentraciones que obtuvieron un porcentaje del 100% en la inhibición de Esporas fue del 2,5% y 3,5% en el aceite esencial de hojas.

Sin embargo concentraciones del 1%, 2,5% y 5% fueron utilizadas por [33] donde los resultados mostraron que existe un efecto inhibitorio del aceite esencial de naranja (AEN) en el crecimiento micelial de *Fusarium solani*, superior al 80% a concentración de AE de 1%, y 100% de inhibición a concentraciones de 2,5% y 5% de AE

Concentraciones del AEs Corteza.

Mientras que el aceite esencial de corteza, en ninguna de sus tres concentraciones obtuvo un porcentaje inhibitorio en el crecimiento radial del *Fusarium* spp 1. Sin embargo con una concentración de 3,5% el aceite esencial de corteza inhibió en un 96,27% la germinación de esporas. Concentraciones mucho más bajas fueron evaluadas por [37] donde también el *Fusarium* spp se encontró resistente al aceite de naranja con concentraciones de 20, 30, 40, 50 y 60 µl de aceite

Utilizando las mismas concentraciones de aceite esencial de corteza frente al crecimiento radial del *Fusarium* spp 2. no se obtuvo un poder inhibitorio. Sin embargo el estudio investigativo realizado por [36], indica que los aceites esenciales de corteza de cítricos inhibían el crecimiento radial de *Fusarium proliferatum* a una concentración de 5% y 6%,

Concentraciones del AEs Comercial.

Utilizando las tres concentraciones del 1,5 2,5% y 3,5% con aceite esencial comercial se inhibe en un 100% el Crecimiento Radial y la Germinación de Esporas del *Fusarium* spp 1 y para el *Fusarium* spp 2 la concentración de 3,5% inhibió en su totalidad el crecimiento radial. Las concentraciones del 1,5% 2,5% y 3,5% de igual manera inhibieron en su totalidad la germinación de esporas. Estas concentraciones se encuentran dentro de los valores aceptables según [44] , en su estudio donde demostró que al utilizar el 1% inhibió un 54% el crecimiento radial de *Fusarium oxysporum*.

4.2.4. Tratamiento de la hipótesis.

Por lo tanto; se aprueba la hipótesis presentada que dice “Las concentraciones de aceites esenciales de naranja inhibirán hongos patógenos en frijol canario almacenados” pues en base a los resultados obtenidos me permito aprobar la misma.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- ✓ Se logra identificar y aislar por caracteres morfológicos dos géneros de hongos. Que corresponde al orden micológico Hypocreales, logrando definir el género *Fusarium* de semillas de frejol canario.
- ✓ Se concluye que el aceite esencial de naranja extraído de hojas tienen mayor actividad antifúngica, logrando inhibir en su totalidad el crecimiento micelial y la germinación de esporas; obteniendo los valores que corresponde: 95,7 % de inhibición de crecimiento micelial y 100 % de inhibición de esporas para *Fusarium sp 1* y un 91,3 % de inhibición de crecimiento radial y un 100 % de inhibición de esporas para *Fusarium sp 2*.
- ✓ Con una concentración del 3,5 % del aceite esencial extraído de hojas se logró inhibir el crecimiento micelial en un 95,7 % y en cualquiera de las tres concentraciones se observó un 100 % de efectividad en la inhibición de esporas del *Fusarium sp 1*. Para el *Fusarium sp 2* una concentración del 2,5 % del aceite esencial de hojas inhibió un 91,3 % de crecimiento micelial y 100 % de inhibición de esporas.

5.2. Recomendaciones

- ✓ Para obtener la especie del género *Fusarium spp* aislados del frijol canario se recomienda realizar un estudio especializado debido a que existe más de 100 especies y las características morfológicas de este género son bastante complejas por lo que se dificulta la identificación de la especie del *Fusarium spp*.
- ✓ Entre los aceites esenciales obtenidos de hojas, corteza de naranja y aceite comercial, se recomienda en cuanto a actividad antifúngica la utilización de aceite esencial destilado de hojas de naranja. Debido a que este presentó una mayor actividad antifúngica en la inhibición de crecimiento radial e inhibición de esporas del *Fusarium spp 1* y *Fusarium spp 2* aislados de frijol canario (*Phaseolus vulgaris* L.) almacenados en bodegas.

- ✓ Es recomendable utilizar una concentración de aceite esencial obtenido de hojas al 3,5% para la inhibición de crecimiento radial, mientras que para la inhibición de germinación de esporas su concentración inhibitoria es del 1,5% para *Fusarium sp* 1. Para *Fusarium sp* 2 es recomendable aplicar una concentración del 2,5% para inhibición de crecimiento radial e inhibición de germinación de esporas.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFIA:

- [1] A. Arce y A. Soto, «Citrus Essential Oil: Extraction and Deterpenation,» *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, vol. 2, nº 1, pp. 1-9, 2008.
- [2] J. Ulloa, P. Ulloa, J. Ramírez y B. Ulloa, «El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos,» *Revista Fuente*, vol. 3, nº 8, pp. 5-9, 2011.
- [3] C. Araya y J. Hernandez, Guía para la identificación de las enfermedades del frijol mas comunes en Costa Rica, Costa Rica: UPIAV/Reconversión, 2006, p. 44.
- [4] J. Olivero, K. Caballero, B. Jaramillo y E. Stashenko, «Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst,» vol. 49, nº 3, pp. 244-250, 2009.
- [5] H. Peredo, E. Palou y A. López, «Aceites Esenciales: Métodos de Extracción,» vol. 3, nº 1, 2009.
- [6] E. Reyes, L. Padilla, O. Pérez y P. López, «Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol,» vol. 4, nº 3, 2008.
- [7] FAOSTAT, «FAO,» FAO, 2010. [En línea]. Available: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>. [Último acceso: 23 Noviembre 2016].
- [8] M. Cerutti y F. Neumayer, «INTRODUCCIÓN A LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN,» nº 12, pp. 149-155, 2004.
- [9] C. Armijo, V. E., P. Romero, C. Otiniano, C. C. y R. Hilario, «MODELAMIENTO Y SIMULACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES MEDIANTE LA DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR,» vol. 15, nº 2, 2012.
- [10] I. Cerón y C. Cardona, «Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja,» vol. 7, nº 13, pp. 65-86, 2011.
- [11] Ferhat, Mohamed, B. Meklati y F. Chemat, «Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation,» vol. 22, nº 6, pp. 494-504, 2007.
- [12] M. Ortuño, Manual Practico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes, vol. II, Ediciones Aiyana, 2006.
- [13] H. Bassolé y R. Juliani, «Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties,» *Molecules*, vol. 17, nº 12, pp. 3989-4006, 12 Abril 2012.

- [14] Y. Sánchez, O. Pino, T. Correa, E. Naranjo y A. Iglesia, «ESTUDIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper auritum* KUNTH (CAISIMÓN DE ANÍS),» vol. 24, nº 1, 2009.
- [15] M. Ramos, S. Bautista, L. Barrera, E. Bosquez, I. Alia y M. Estrada, «Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas,» vol. 28, nº 1, 2010.
- [16] K. Suhr y P. Nielsen, «Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi,» vol. 94, nº 4, 2003.
- [17] S. E. Rodríguez, «USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA CONSERVACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS,» vol. 7, nº 1, 2011.
- [18] M. Isman, «Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world.,» *Annual Review of Entomology*, vol. 51, pp. 45-66, January 2006.
- [19] M. A. Martínez, «Universidad de Antioquia,» Universidad de Antioquia, Febrero 2003. [En línea]. Available: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>. [Último acceso: 23 Noviembre 2016].
- [20] O. H. FONG, «UMP Library,» Universiti Malaysia PAHANG, 2012. [En línea]. Available: http://umpir.ump.edu.my/3557/1/ONG_HUI_FONG.PDF. [Último acceso: 22 Noviembre 2016].
- [21] D. Djenane, «Chemical Profile, Antibacterial and Antioxidant Activity of Algerian Citrus Essential Oils and Their Application in *Sardina pilchardus*,» *Foods*, vol. 4, nº 1, 2015.
- [22] «Univerdidad Publica de Navarra,» Universidad Publica de Navarra, 16 Agosto 2010. [En línea]. Available: http://www.unavarra.es/genmic/microgral/01_morfologia_y_estructura.pdf. [Último acceso: 23 Noviembre 2016].
- [23] N. Montaña, A. Sandoval, S. Camargo y J. Sánchez, «Los microorganismos: pequeños gigantes,» vol. 77, nº 17, pp. 15-23, 2010.
- [24] R. Pelczar, C. Reid y E. Chain, «Hongos,» de *Microbiología*, México-Buenos Aires, Mc Graw-Hill, 1997, pp. 247-257.
- [25] A. Higuera, J. Fontalvo, L. Niño, J. Sanchez, A. Delgado, R. Villalobos y M. Montiel, «Crecimiento de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* en medios de cultivo de harina de semillas de frijol *Vigna unguiculata* (L.) Walp., frijol chino *Vigna radiata* L. y quinchoncho *Cajanus cajan* (L.) Millsp.,» vol. 11, nº 1, 2003.

- [26] Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A.C., «NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS,» Colpos , Agosto 2002. [En línea]. Available: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>. [Último acceso: 29 Noviembre 2016].
- [27] I. Lépiz, «Simposio: Contribución de la fitopatología al mejoramiento de los cultivos agrícolas. El caso del frijol.,» vol. 17, pp. 54-72, 2000.
- [28] R. LARDIZABAL, S. ARIAS y R. SEGURA, «Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG),» Producciones SAG.GOB.HN, 13 Mayo 2013. [En línea]. Available: <file:///C:/Users/HERMANOS%20BU%C3%91AY/Downloads/Manual-Frijol-ACCESO.pdf>. [Último acceso: 26 Septiembre 2016].
- [29] Ministerio de Agricultura y Riego, «MINAGRI,» MINAGRI, Junio 2016. [En línea]. Available: www.minagri.gob.pe. [Último acceso: 29 Noviembre 2016].
- [30] M. Tequida, M. Cortez, E. Rosas, S. López y C. Corrales, «Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*,» vol. 19, pp. 84-88, 2002.
- [31] «Catálogo de Hongos en Semillas de Frijol (*Phaseolus vulgaris*) en Nicaragua,» vol. 1, 2013.
- [32] R. Montes, V. Cruz, G. Martínez, G. Sandoval, R. García, S. Zilch, L. Bravo, K. Bermúdez, H. Flores y M. Carvajal, «Propiedades Atifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retroespectivo de Investigaciones,» *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 18, nº 002, pp. 125-131, 2000.
- [33] C. Guédez, L. Cañizalez, L. Avendaño, J. Scorza, C. Castillo, R. Olivar, Y. Méndez y L. Sánchez, «Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.),» vol. 34, nº 2, 2014.
- [34] L. Barrera y L. García, «Antifungal activity of essential oils and their compounds on the growth of *Fusarium* sp. isolate from papaya (*Carica papaya*),» vol. 8, nº 1, pp. 33-41, 2009.
- [35] N. Giraldo, K. López, A. Marín y W. Murillo, «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,» *Ciencias-Química*, vol. 1, nº 4, 2009.
- [36] E. Mahmoud, «Effect of Essential Oils Extracted from the Peels of Two Species of Citrus on Some Fungi».
- [37] S. SONI y U. SONI, «IN-VITRO ANTI-BACTERIAL AND ANTI-FUNGAL ACTIVITY OF SELECT

- ESSENTIAL OILS,» *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 6, nº 6, pp. 1-6, 2014.
- [38] M. De Souza, M. Das Graças, P. De Souza, S. Machado, L. Silva, M. Teixeira, J. De Andrade, C. De Miranda y M. Andrade, «Multivariate analysis of the essential oil components of the genus *Citrus* and their antifungal activity,» vol. 41, nº 2, 2013.
- [39] H. Zohra, A. Rachida, M. Malika, S. Benali, A. Samir y B. Meriem, «Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils of Algerian *Citrus*,» *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, nº 12, pp. 1048-1055, 2015.
- [40] M. Torrenegra, C. Granados, M. R. Osorio y G. León, «Comparación de la Hidro-destilación Asistida por Radiación de Microondas (MWHD) con Hidrodestilación Convencional (HD) en la Extracción de Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*,» vol. 26, nº 1, 2015.
- [41] G. Castellanos, C. Jara y G. Mosquera, «Guía Practica 4: *Fusarium oxysporum*. Manejo del hongo en el Laboratorio,» 2013.
- [42] Y. Duarte, O. Pino y B. Martínez, «Efecto de cuatro aceites esenciales sobre hongos asociados al manchado del arroz,» vol. 29, nº 1, 2014.
- [43] J. F. Leslie y B. A. Summerell, *The Fusarium Laboratory Manual*, Wiley- Blackwell. , 2006.
- [44] J. BECERRA, M. BITTNER, V. HERNÁNDEZ, C. BRINTRUP, J. BECERRA y M. SILVA, «Actividad de aceites esenciales de Canelo, Queule, Bailahuén y Culén frente a hongos fitopatógenos.,» *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 9, nº 3, pp. 2-5, 2010.
- [45] O. Voysest, *Variedades de Frijol en América Latina y su origen*, Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1983, p. 87.
- [46] F. Narváez, «Univerdidad Técnica Estatal de Quevedo,» Producciones UTEQ, 2015. [En línea]. Available: <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/616>. [Último acceso: 23 Noviembre 2016].
- [47] M. Box, *Leguminosas de Grano*, Primera ed., Madrid (España): Salvat Editores, 1961, p. 452.
- [48] E. Peralta, J. Vásquez, J. Pinzón y R. Lépez, «INIAP-411 Imbabello: Variedad de Frejol Arbustivo,» 1991.
- [49] O. Pino, Y. Sánchez, M. Rojas, H. Rodríguez, Y. Abreu, Y. Duarte, B. Martínez, B. Peteira, T. Correa y D. Martínez, «COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD PLAGUICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake,» vol. 26, nº 3, 2011.

- [50] D. Daferera, B. Ziogas y M. Polissiou, «The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*,» vol. 22, nº 1, pp. 39-44, 2003.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

ANEXO 1: Crecimiento radial del Fusarium spp 1

Tratamiento	Hongo	AE	Concentracion	Repeticion	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
T1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	150 ul	1	0,6	0,8	0,9	1	1,1	1,1	1,1
T1.1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	150 ul	2	0,6	0,7	0,7	1	1	1	1,1
T2	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	250 ul	1	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8
T2.1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	250 ul	2	0,6	0,6	0,7	0,7	0,9	1	1,1
T3	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	350 ul	1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,8	0,9	1
T3.1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	350 ul	2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
Testigo (Sin Control)	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)				1,4	2,6	4,4	5,3	5,8	6,2	6,5
Testigo (Sin Control)	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)				1,8	2,5	4,3	4,8	5,3	5,8	6,1
T4	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	150 ul	1	0,6	2,8	2,8	5,6	7,5	8,8	9
T4.1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	150 ul	2	0,6	2,8	2,9	5,7	7,5	9	9
T5	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	250 ul	1	0,6	2,5	2,8	5,3	6,8	7,6	8
T5.1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	250 ul	2	0,9	2,8	2,8	5,6	7	8	8,2
T6	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	350 ul	1	0,6	1,5	1,5	3	4	5,5	7
T6.1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	350 ul	2	0,6	1,3	1,4	3,2	4,3	5,2	7
Testigo (Sin Control)	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)				0,9	2,4	4,5	5,4	6,3	7,2	7,3
Testigo (Sin Control)	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)				1	3,2	5,2	5,6	6	6,4	6,7
T7	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	150 ul	1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
T7.1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	150 ul	2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
T8	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	250 ul	1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
T8.1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	250 ul	2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
T9	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	350 ul	1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
T9.1	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	350 ul	2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Testigo (Sin Control)	Fusarium spp 1 (Phaseolus vulgaris L.)	-	-	1	1,2	3	3,6	5,9	7,7	9	9

Elaborado: Daquilema, J. (2016).

ANEXO 2: Crecimiento Radial del *Fusarium* spp 2 durante los 7 días de medición.

Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	150 ul	1	0,6	1	1,1	1,3	1,4	1,8	2,1
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	150 ul	2	0,6	0,9	1	1,1	1,2	1,6	2
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	250 ul	1	0,6	0,6	0,7	0,9	1	1,1	1,1
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	250 ul	2	0,6	1	1,2	1,3	1,4	1,4	1,4
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	350 ul	1	0,6	0,8	1,1	1	1,2	1,3	1,3
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	350 ul	2	0,6	0,9	1	1,1	1,2	1,2	1,2
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			1	1	1,5	2,8	3,6	5,2	6	6,9
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			2	1	1,8	2,5	3,8	5,5	6,5	7
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	150 ul	1	0,6	1,9	4,9	5,7	6	6,2	6,5
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	150 ul	2	0,7	1,7	3,1	4,6	5,9	7	7,9
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	250 ul	1	0,6	1,3	2,5	3,6	4,6	5,8	7
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	250 ul	2	0,7	1,5	2,2	2,9	4	5,4	6,4
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	350 ul	1	0,6	1,4	2,5	3,5	4,8	5,9	7,2
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	350 ul	2	0,7	1,5	2,5	3,3	4,5	6	7,2
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			1	0,8	1,7	3,6	5,3	5,6	5,8	6
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			2	0,9	1,8	3,9	4,5	4,7	5,3	8,5
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	150 ul	1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	1,5
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	150 ul	2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	1,2
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	250 ul	1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	1,4	1,4
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	250 ul	2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	350 ul	1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	350 ul	2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			1	1	3,2	4,2	6	6,5	7	8,2
Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			2	1	2	3,5	4,1	4,5	4,6	5,1

Elaborado: Daquilema, J. (2016).

ANEXO 3: Crecimiento radial de esporas del *Fusarium spp 1*

Esporas de <i>Fusarium spp 1</i> (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)										
Tratamientos	Hongo	AE	Concentracion	Repeticion	Cont. 1	Cont. 2	Cont. 3	Cont. 4	Cont. 5	Total
T1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	1	0	0	0	0	0	0
T1.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	2	0	0	0	0	0	0
T2	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	1	0	0	0	0	0	0
T2.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	2	0	0	0	0	0	0
T3	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	1	0	0	0	0	0	0
T3.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	2	0	0	0	0	0	0
Testigo	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			1	2250	2153	1859	1125	2248	9635
Testigo	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			2	1478	1895	1487	1580	1987	8427
T4	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	1	155	142	112	177	166	752
T4.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	2	115	137	108	108	178	646
T5	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	1	118	142	110	112	170	652
T5.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	2	72	81	90	60	86	389
T6	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	1	71	83	95	63	75	387
T6.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	2	70	86	89	75	82	402
Testigo	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)				1748	1879	2187	2128	1890	9832
Testigo	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)				896	1589	1589	2105	1874	8053
T7	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	1	0	0	0	0	0	0
T7.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	2	0	0	0	0	0	0
T8	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	1	0	0	0	0	0	0
T8.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	2	0	0	0	0	0	0
T9	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	1	0	0	0	0	0	0
T9.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	2	0	0	0	0	0	0
Testigo	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			1	2458	1983	2890	2569	1971	11871
Testigo	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			2	2108	2325	2387	2115	2023	10958

Elaborado: Daquilema, J. (2016).

ANEXO 4: Germinación de esporas del *Fusarium* spp 2

Tratamientos	Hongo	AE	Concent.	Repet.	Cont. 1	Cont. 2	Cont. 3	Cont. 4	Cont. 5	Total
T10	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	150 ul	1	59	46	73	81	81	340
T10.1	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	150 ul	2	0	0	0	0	0	0
T11	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	250 ul	1	0	0	0	0	0	0
T11.1	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	250 ul	2	0	0	0	0	0	0
T12	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	350 ul	1	0	0	0	0	0	0
T12.1	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Hojas	350 ul	2	0	0	0	0	0	0
Testigo	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			1	1685	1503	1520	1422	1583	7713
Testigo	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			2	1587	1840	1729	1735	1569	8460
T13	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	150 ul	1	155	148	113	120	142	678
T13.1	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	150 ul	2	253	156	142	160	140	851
T14	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	250 ul	1	247	306	276	246	336	1411
T14.1	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	250 ul	2	484	342	341	382	343	1892
T15	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	350 ul	1	822	546	539	670	572	3149
T15.1	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Corteza	350 ul	2	101	68	114	127	146	556
Testigo	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			1	1480	1350	1421	1328	1334	6913
Testigo	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			2	1293	1487	1503	1572	1561	7416
T16	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	150 ul	1	0	0	0	0	0	0
T16.1	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	150 ul	2	0	0	0	0	0	0
T17	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	250 ul	1	0	0	0	0	0	0
T17.1	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	250 ul	2	0	0	0	0	0	0
T18	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	350 ul	1	0	0	0	0	0	0
T18.1	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)	Comercial	350 ul	2	0	0	0	0	0	0
Testigo	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			1	1752	1638	1735	1958	1942	9025
Testigo	Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.)			2	1621	1825	1839	1720	1836	8841

Elaborado: Daquilema, J. (2016).

ANEXO 5: Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* spp 1

% de Inhibición Crecimiento Radial para <i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)							
Tratamientos	Hongo	AE	Concentración	Repet.	48 h PROM. %	96 h PROM. %	168 h PROM. %
T1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	1	91,67	92,45	94,05
T1.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	2	95,83	92,45	94,05
T2	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	1	100	96,23	97,62
T2.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	2	100	98,11	94,05
T3	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	1	100	100	95,24
T3.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	2	100	100	98,81
T4	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	1	8,33	5,66	0
T4.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	2	8,33	3,77	0
T5	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	1	20,83	11,32	11,90
T5.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	2	8,33	5,66	9,52
T6	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	1	62,50	54,72	23,81
T6.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	2	70,83	50,94	23,81
T7	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	1	100	100	100
T7.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	2	100	100	100
T8	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	1	100	100	100
T8.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	2	100	100	100
T9	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	1	100	100	100
T9.1	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	2	100	100	100
Testigo (SC)	Fusarium spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			1	0	0	0

Elaborado: Daquilema, J. (2016).

ANEXO 6: Inhibición del crecimiento radial de *fusarium* spp 2

% de Inhibicion Crecimiento Radial para FUSARIUM spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)							
Tratamientos	Hongo	AE	Concent.	Repet.	48 h PROM %	96 h PROM. %	168 h PROM. %
T1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	1	84,62	87,04	80,26
T1.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	2	88,46	90,74	81,58
T2	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	1	100	94,44	93,42
T2.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	2	84,62	87,04	89,47
T3	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	1	92,31	92,59	90,79
T3.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	2	88,46	90,74	92,11
T4	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	1	50	5,56	22,37
T4.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	2	57,69	25,93	3,95
T5	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	1	73,08	44,44	15,79
T5.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	2	65,38	57,41	23,68
T6	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	1	69,23	46,30	13,16
T6.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	2	65,38	50	13,16
T7	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	1	100	100	88,16
T7.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	2	100	100	92,11
T8	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	1	100	100	89,47
T8.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	2	100	100	100
T9	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	1	100	100	100
T9.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	2	100	100	100
Testigo (SC)	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			1	0	0	0

Autora: Daquilema, J. (2016).

ANEXO 7: Inhibición de germinación de esporas de *Fusarium* spp 1

CONCENTRACIÓN DEL INOCULO PARA <i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)						
Tratamientos	Hongo	AE	Concentracion	Repeticion	Conidias Total	% de Inhibición de esporas
T1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	1	0	100
T1.1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	2	0	100
T2	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	1	0	100
T2.1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	2	0	100
T3	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	1	0	100
T3.1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	2	0	100
T4	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	1	376000	93,14
T4.1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	2	323000	94,10
T5	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	1	326000	94,05
T5.1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	2	194500	96,45
T6	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	1	193500	96,47
T6.1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	2	201000	96,33
T7	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	1	0	100
T7.1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	2	0	100
T8	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	1	0	100
T8.1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	2	0	100
T9	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	1	0	100
T9.1	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	2	0	100
Testigo (SC)	<i>Fusarium</i> spp 1 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	-	-	1	5479000	0

Elaborado: Daquilema, J. (2016).

ANEXO 8: Inhibición de germinación de esporas de *Fusarium* spp 2

CONCENTRACIÓN DEL INOCULO PARA <i>Fusarium</i> spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)						
Tratamientos	Hongo	AE	Concentracion	Repeticion	Conidias Total	% de Inhibición de esporas
T1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	1	170000	96,23
T1.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	150 ul	2	0	100
T2	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	1	0	100
T2.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	250 ul	2	0	100
T3	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	1	0	100
T3.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Hojas	350 ul	2	0	100
T4	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	1	339000	92,49
T4.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	150 ul	2	425500	90,57
T5	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	1	705500	84,37
T5.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	250 ul	2	946000	79,04
T6	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	1	1574500	65,11
T6.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Corteza	350 ul	2	278000	93,84
T7	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	1	0	100
T7.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	150 ul	2	0	100
T8	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	1	0	100
T8.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	250 ul	2	0	100
T9	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	1	0	100
T9.1	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Comercial	350 ul	2	0	100
Testigo (SC)	Fusarium spp 2 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			1	4512500	0

Elaborado: Daquilema, J. (2016).

ANEXO 9: Fotos de la fase experimental.

Extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis*. (Hojas y Corteza)



Preparación de TWEEN 20



Tween 80



Dilución

Desinfección del frijol Canario (*Phaseolus vulgaris*)



Granos de frijol Canario sumergidos en solución de hipoclorito de sodio y agua destilada

Muestras de frijol canario sembradas en cajas petri con PDA



Muestras de cajas madre del hongo *Fusarium* spp 1 y *Fusarium* spp 2



Aislamiento del Hongo



Repique de hongos



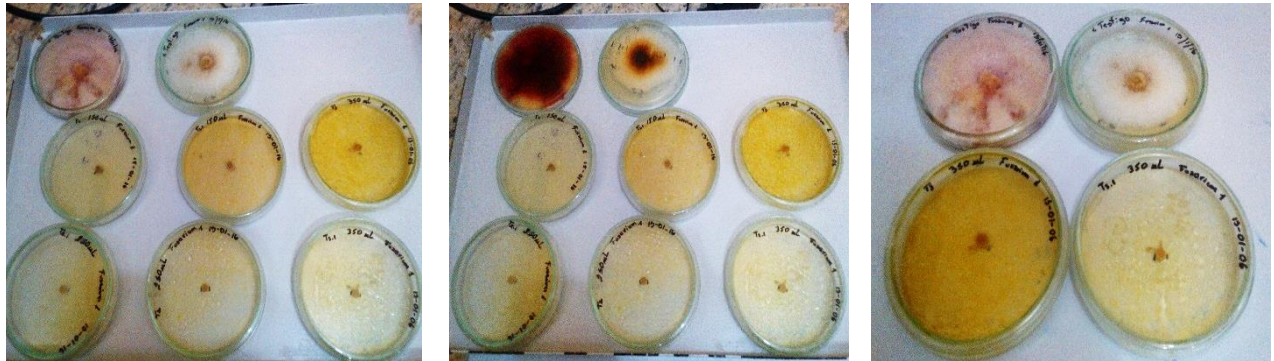
Dilucion del aceite esencial de naranja en PDA



Hongos sembrados en cajas Petri diluidos con aceite esencial

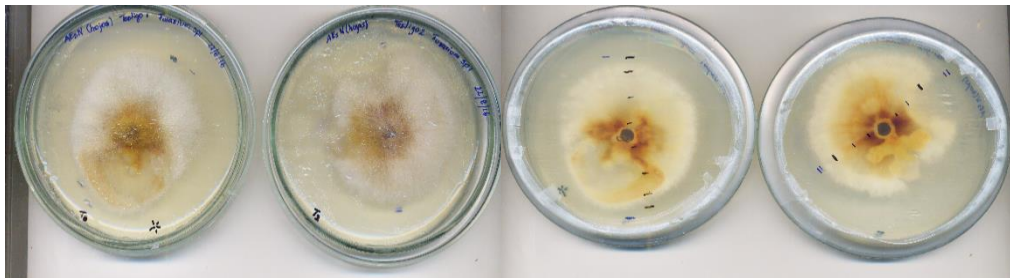


Muestras de *Fusarium* spp1 a los 7 días de medición.

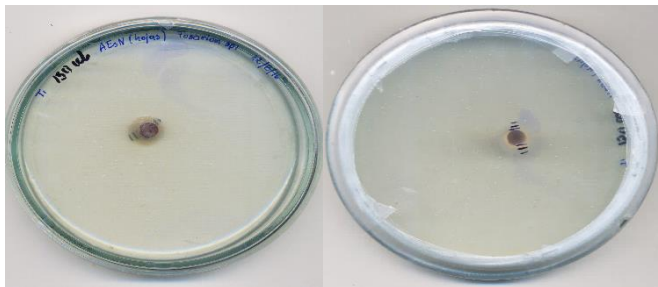


Aceite esencial de naranja comercial en sus tres concentraciones.

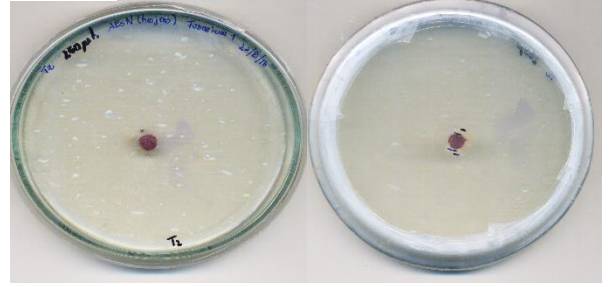
Muestras de *Fusarium* spp1 a los 7 días de medición.



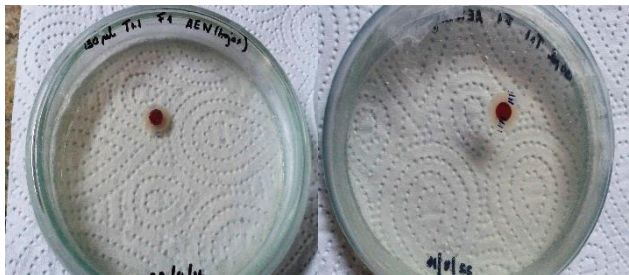
Control *Fusarium* spp1



T1 1,5% de AEs Hojas *F. spp1*



T2 2,5% de AEs Hojas *F. spp1*

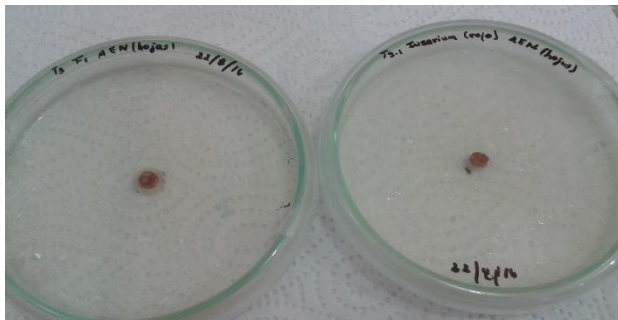


T1.1 1,5% de AEs Hojas *F. spp1*

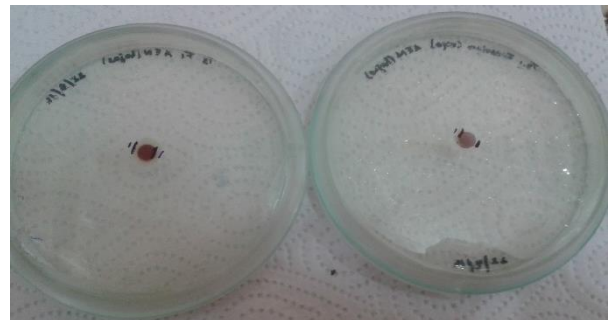


T2.1 2,5% de AEs Hojas *F. spp1*

Muestras de *Fusarium* spp1 a los 7 días de medición.

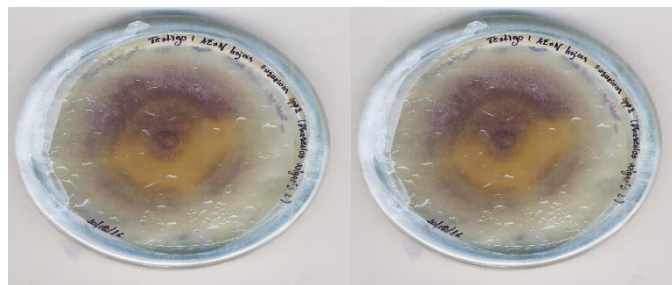


T3 3,5% de AEs Hojas *F. spp1*

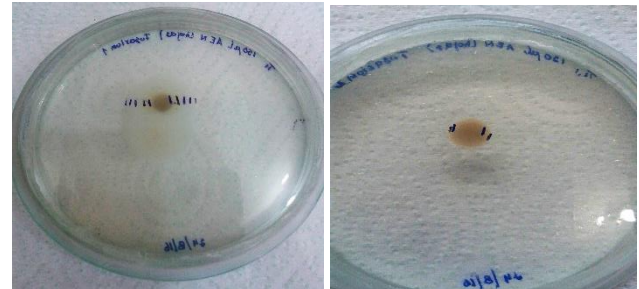


T3.1 3,5% de AEs Hojas *F. spp1*

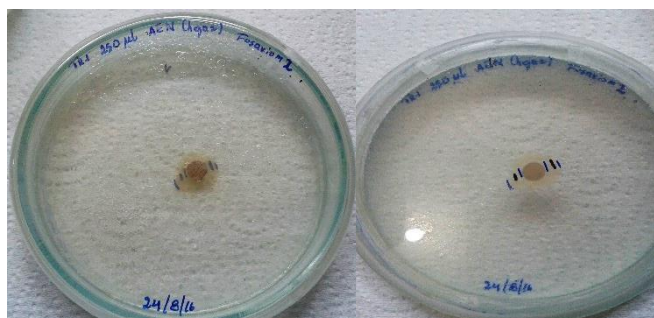
Muestras de *Fusarium* spp2 a los 7 días de medición.



Control *Fusarium* spp2



T1 y T1.1 1,5% de AEs Hojas *F. spp2*



T2.1 21,5% de AEs Hojas *F. spp2*



T3 y T3.1 3,5% de AEs Hojas *F. spp2*

Muestras de *Fusarium* spp1 a los 7 días de medición



T1.1 1,5% de AEs Corteza
F. spp 1

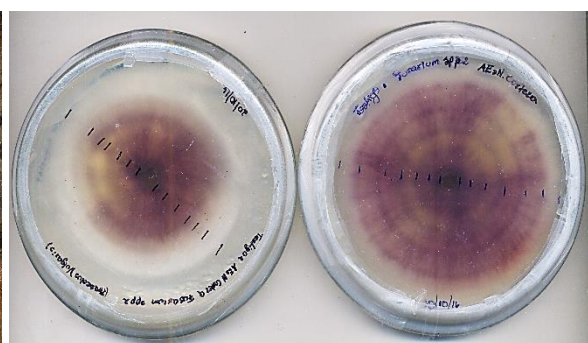
Tratamientos de AEs Corteza *F. spp 1*



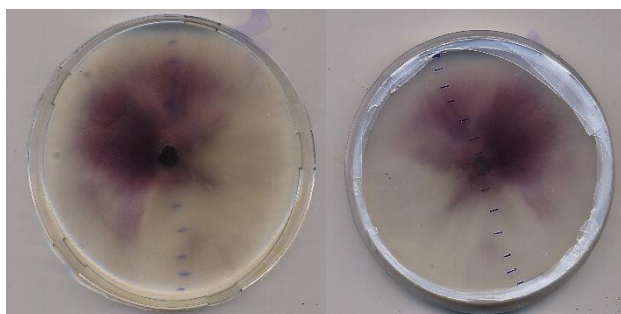
T2.1 2,5% de AEs
Corteza *F. spp 1*



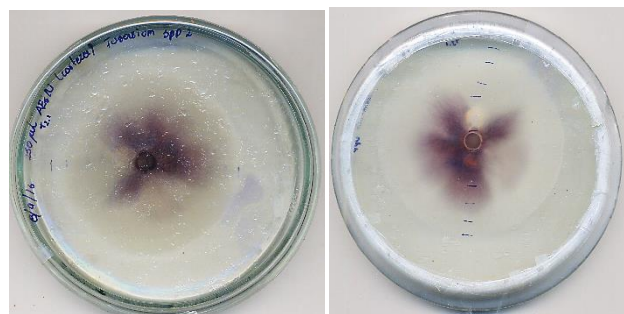
T3 3,5% de AEs
Corteza *F. spp 1*



Control *Fusarium. spp 2*

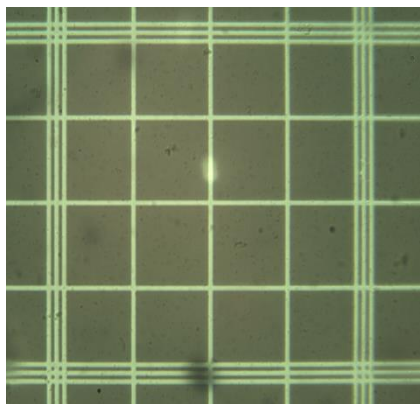


T1.1 1 1,5% de AEs Corteza *F. spp 2*

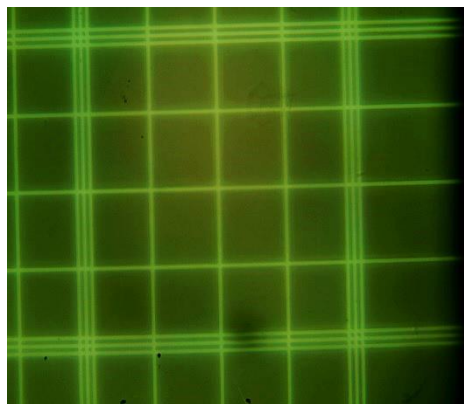


T2.1 2,5% de AEs Corteza *F. spp 2*

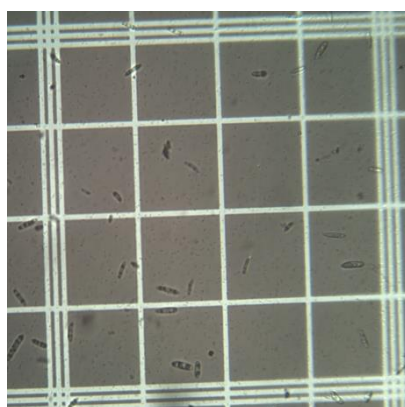
Visualización de esporas posterior a los 7 días de medición.



T. 2 2,5% AEs Hojas F. sp2

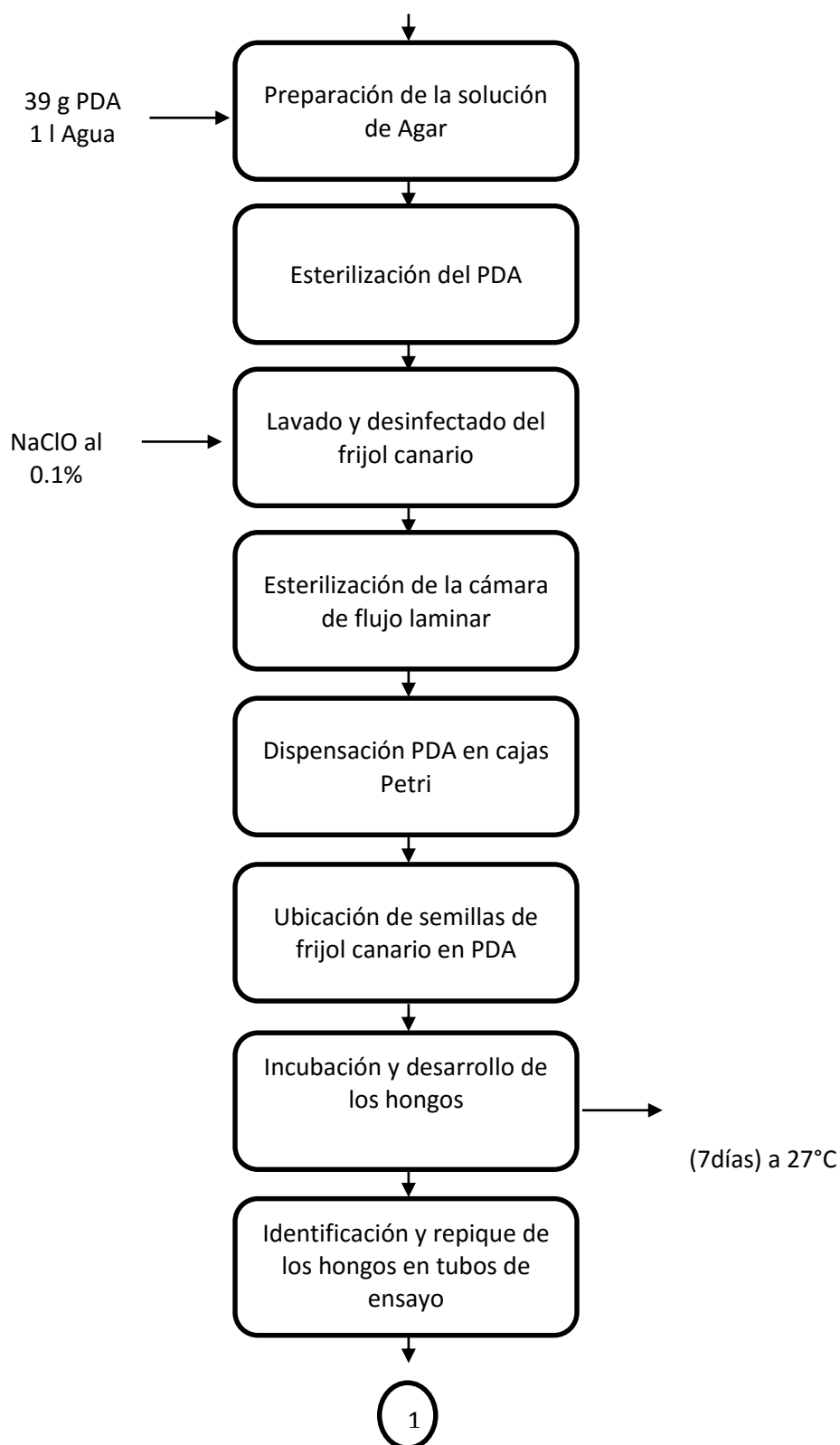


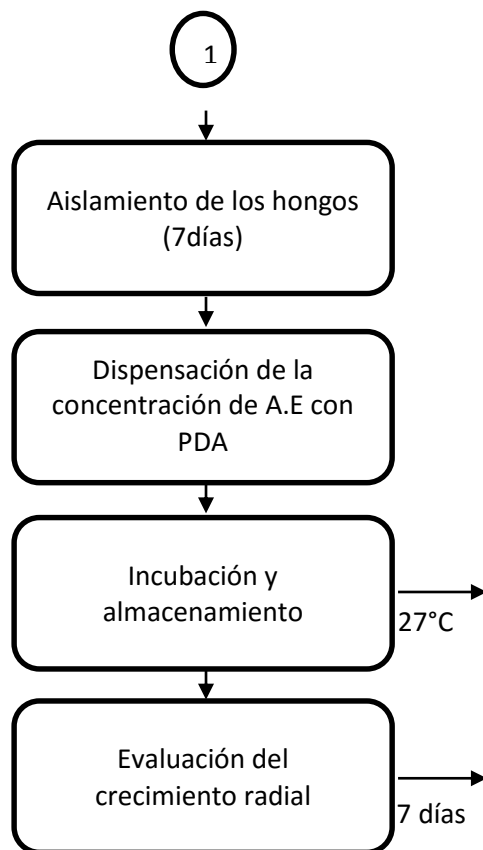
T. 3 3,5% AEs Comercial F. sp2



T. 1.1 1,5% AEs Corteza F. sp2

ANEXO 10: Diagrama de bloques para la determinación de la concentración óptima de aceite esencial de *Citrus sinensis*. (Naranja) en la inhibición de *Fusarium spp* presente en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol canario).



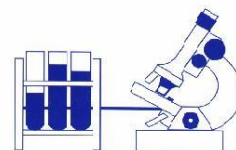


ANEXO 11: TÉCNICA DE LABORATORIO PARA CRECIMIENTO RADIAL



LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

TECNICA PARA EL CRECIMIENTO RADIAL



- **OBJETIVO**

- Determinar el crecimiento radial de los hongos durante siete días

- **INSTRUMENTAL**

- Contador de colonia
- Marcador indeleble
- Incubadora

Nota: Todos los procedimientos se deben ejecutar dentro de la cámara de flujo laminar; además, deben cumplirse todas las condiciones de asepsia y esterilidad que se exigen en un laboratorio. En otras palabras, se aplican siempre las buenas prácticas microbiológicas (BPM).

- **PROCEDIMIENTO**

- **Paso 1:** Desinfectar las manos y el área de trabajo.
- **Paso 2:** Colocar el contador de colonia en un lugar amplio y estéril.
- **Paso 3:** Colocar las cajas en el contador de colonia y verificar su crecimiento señalando con un marcador.
- **Paso 4:** Se aplica la fórmula correspondiente para verificar el porcentaje de inhibición.

$$T - Tr / T * 100$$

Dónde:

T = Testigo

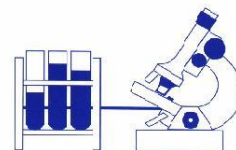
Tr = Tratamiento

ANEXO 12: TÉCNICA DE LABORATORIO PARA CRECIMIENTO DE ESPORAS



LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

TECNICA PARA CONTAR ESPORAS



- **OBJETIVO**

- Determinar el número de esporas en los hongos después de los siete días.

- **INSTRUMENTAL**

- Contador de Neubauer
- Microscopio
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Pipetas pasteur
- Vaso de precipitación
- Tween 80
- Gasa estéril
- Microtubos eppendorf
- Agitador Vórtex
- Varilla de agitación
- Mechero

Nota: Todos los procedimientos se deben ejecutar dentro de la cámara de flujo laminar; además, deben cumplirse todas las condiciones de asepsia y esterilidad que se exigen en un laboratorio. En otras palabras, se aplican siempre las buenas prácticas microbiológicas (BPM).

- **PROCEDIMIENTO**

- **Paso 1:** Dependiendo del tipo de muestra medir, se ha de haberá de preparar una muestra con una concentración apta para su recuento.
- **Paso 2:** Retirar con cuidado la tapa de la caja petri en donde se encuentran los hongos.
- **Paso 3:** En una probeta de 10 ml colocar agua estéril, para adicionar sobre el hongo.
- **Paso 4:** Con la varilla esparcir el micelio del hongo.

- **Paso 5:** Con la micropipeta absorber el líquido de la caja petri para colocar en el microtubo eppendorf previamente colocado una gasa estéril para evitar filtrar micelio.
- **Paso 6:** Sellar y colocar el microtubo eppendorf en el agitador Vórtex para tener una solución homogénea.
- **Paso 7:** Finalmente la muestra se coloca en el contador de Neubauer para observar en el microscopio la cantidad de esporas obtenidas del hongo.
- **Paso 8:** Para tener el porcentaje de esporas si se realizó el conteo en cuadros grandes se multiplica por 2000 y en cuadros pequeños se multiplica por 50000, aplicando la fórmula del crecimiento radial.

$$T - Tr / T * 100$$

Dónde:

T = Testigo

Tr = Tratamiento

ANEXO 13: Certificado de Laboratorio



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

Coordinación General de Investigación, Desarrollo e Innovación

Km. 1 ½ Vía Quevedo-Santo Domingo de los Tsáchilas

Teléfonos: (593 5) 2757463 Fax: (593 5) 2753303

Quevedo-Los Ríos-Ecuador



Dr. Byron Oviedo Bayas

COORDINADOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO (UTEQ).

CERTIFICO:

Que la Srta. Jessica Alexandra Daquilema Rga con número de identificación 120745615-1 Egresada de la Facultad de Ciencias Ingeniería de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial realizó la investigación en el tema titulado "EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) EN LA INHIBICIÓN DE HONGOS PATÓGENOS EN *Phaseolus vulgaris* L. (FRÍJOL CANARJO) ALMACENADOS EN LAS BODEGAS DEL CANTÓN QUEVEDO 2016", bajo la dirección del Director de Proyecto de Investigación Ing. Flor Marina Fon Fay Vásquez M.Sc, desde el 04 de diciembre del 2015 hasta el 02 de diciembre del 2016, en el área de "Biotecnología" Biología Molecular, Microbiología, Cultivo de Tejido.

Autorizo la Srta. Jessica Alexandra Daquilema Rga hacer uso de la presente certificación en la forma que estimare conveniente a sus intereses personales.

Quevedo, diciembre 13 del 2016

Dr. Byron Oviedo Bayas

Coordinador General de Investigación, Desarrollo e Innovación

E-mail: boviedo@uteq.edu.ec

Universidad Técnica Estatal de Quevedo

Km. 1 ½ vía Quevedo-Santo Domingo de los Tsáchilas, CP. 73

Teléfonos: (593 5) 2757463 Fax: (593 5) 2753303



ANEXO 14: Resultados obtenidos a partir de los datos del porcentaje de inhibicion de crecimiento radial y germinacion de esporas de Fusarium spp 1 y Fusarium spp 2 (Phaseolus vulgaris L.) durante las primeras 48, 96 y 168 horas de incubación.

Summary Statistics for fusa1 48 horas								
Tratam	Count	Promedio	Desviación Estandar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Std. skewness
1	3	94,4444	2,40563	2,55%	91,6667	95,8333	4,16667	-1,22474
2	3	100	0	0,00%	100	100	0	
3	3	100	0	0,00%	100	100	0	
4	3	8,33	0	0,00%	8,33	8,33	0	
5	3	16,0556	6,75017	42,04%	8,33333	20,8333	12,5	-1,12389
6	3	66,1111	4,27633	6,47%	62,5	70,8333	8,33333	0,770952
7	3	100	0	0,00%	100	100	0	
8	3	100	0	0,00%	100	100	0	
9	3	100	0	0,00%	100	100	0	
10	3	0	0	%	0	0	0	

Summary Statistics for Fusarium 1 96 horas								
Tratam.	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
1	3	92,4528	0	0,00%	92,4528	92,4528	0	
2	3	96,7799	1,16024	1,20%	96	98,1132	2,11321	1,17248
3	3	100	0	0,00%	100	100	0	
4	3	4,47799	1,03022	23,01%	3,77358	5,66038	1,88679	1,15853
5	3	8,32704	2,84433	34,16%	5,66038	11,3208	5,66038	0,361031
6	3	51,8868	2,49599	4,81%	50	54,717	4,71698	1,03086
7	3	100	0	0,00%	100	100	0	
8	3	100	0	0,00%	100	100	0	
9	3	100	0	0,00%	100	100	0	
10	3	0	0	%	0	0	0	

Summary Statistics for fusa1 168 horas								
Trata	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
1	3	92,6984	2,33689	2,52%	90	94,0476	4,04762	-1,22474
2	3	95,2222	2,07585	2,18%	94	97,619	3,61905	1,22402
3	3	95,6825	2,93015	3,06%	93	98,8095	5,80952	0,471538
4	3	0	0	%	0	0	0	
5	3	10,4762	1,25988	12,03%	9,52381	11,9048	2,38095	1,03086
6	3	23,2063	1,04473	4,50%	22	23,8095	1,80952	-1,22474
7	3	100	0	0,00%	100	100	0	
8	3	100	0	0,00%	100	100	0	
9	3	100	0	0,00%	100	100	0	
10	3	0	0	%	0	0	0	
Total	30	61,7286	44,7679	72,52%	0	100	100	-1,06808

Summary Statistics for fusaiu1 conte de espora								
Trata	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
1	3	100	0	0,00%	100	100	0	
2	3	100	0	0,00%	100	100	0	
3	3	100	0	0,00%	100	100	0	
4	3	93,4141	0,602096	0,64%	93	94,1048	1,10476	1,15335
5	3	94,5	1,76852	1,87%	93	96,4501	3,45008	0,757266
6	3	96,2666	0,240808	0,25%	96	96,4683	0,468334	-0,794804
7	3	100	0	0,00%	100	100	0	
8	3	100	0	0,00%	100	100	0	
9	3	100	0	0,00%	100	100	0	
10	3	0	0	%	0	0	0	
Total	30	88,4181	30,0835	34,02%	0	100	100	-6,19944

Summary Statistics for Fusa2 48 horas								
Trata	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
1	3	85,6923	2,41788	2,82%	84	88,4615	4,46154	1,1361
2	3	91,5385	7,80684	8,53%	84,6154	100	15,3846	0,602708
3	3	90,2564	1,93585	2,14%	88,4615	92,3077	3,84615	0,41407
4	3	53,8974	3,84718	7,14%	50	57,6923	7,69231	-0,0847699
5	3	69,4872	3,87171	5,57%	65,3846	73,0769	7,69231	-0,41407
6	3	66,8718	2,06597	3,09%	65,3846	69,2308	3,84615	1,10363
7	3	100	0	0,00%	100	100	0	
8	3	100	0	0,00%	100	100	0	
9	3	100	0	0,00%	100	100	0	
10	3	0	0	%	0	0	0	

Summary Statistics for Fusa2 96 horas

trata	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
1	3	89,2593	1,95982	2,20%	87,037	90,7407	3,7037	-1,03086
2	3	91,4938	3,92668	4,29%	87,037	94,4444	7,40741	-1,04095
3	3	91,1111	1,33539	1,47%	90	92,5926	2,59259	0,814636
4	3	13,4938	10,9034	80,80%	5,55556	25,9259	20,3704	1,08868
5	3	51,284	6,51108	12,70%	44,4444	57,4074	12,963	-0,345703
6	3	48,0988	1,85383	3,85%	46,2963	50	3,7037	0,169044
7	3	100	0	0,00%	100	100	0	
8	3	100	0	0,00%	100	100	0	
9	3	100	0	0,00%	100	100	0	
10	3	0	0	%	0	0	0	
Total	30	68,4741	36,6748	53,56%	0	100	100	-1,94608

Summary Statistics for fusa2 168 horas

trata	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
1	3	80,614	0,845934	1,05%	80	81,5789	1,57895	1,09276
2	3	91,2982	1,99051	2,18%	89,4737	93,4211	3,94737	0,466064
3	3	90,9649	1,06354	1,17%	90	92,1053	2,10526	0,510608
4	3	14,1053	9,35555	66,33%	3,94737	22,3684	18,4211	-0,618
5	3	19,4912	3,97023	20,37%	15,7895	23,6842	7,89474	0,387673
6	3	13,1053	0,0911606	0,70%	13	13,1579	0,157895	-1,22474
7	3	90,0877	1,97515	2,19%	88,1579	92,1053	3,94737	0,141038
8	3	96,4912	6,07737	6,30%	89,4737	100	10,5263	-1,22474
9	3	100	0	0,00%	100	100	0	
10	3	0	0	%	0	0	0	
Total	30	59,6158	40,4864	67,91%	0	100	100	-0,975988

Summary Statistics for fusaiu2 conte de espora								
trata	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
1	3	98,0776	1,88485	1,92%	96,2327	100	3,76731	0,130718
2	3	100	0	0,00%	100	100	0	
3	3	100	0	0,00%	100	100	0	
4	3	91,0194	1,30307	1,43%	90	92,4875	2,48753	0,965853
5	3	79,8006	4,23491	5,31%	76	84,3657	8,36565	0,555732
6	3	79,3158	14,3683	18,12%	65,108	93,8393	28,7313	0,0699007
7	3	100	0	0,00%	100	100	0	
8	3	100	0	0,00%	100	100	0	
9	3	100	0	0,00%	100	100	0	
10	3	0	0	%	0	0	0	
Total	30	84,8213	30,1194	35,51%	0	100	100	-5,37666

ANEXO 15: Tablas de rangos múltiples para fusarium spp 1 durante las primeras 48, 96 y 168 horas.

Multiple Range Tests for fusa1 48 by trata			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
Tratam.	Count	Mean	Homogeneous Groups
10	3	0	X
4	3	8,33	X
5	3	16,0556	X
6	3	66,1111	X
1	3	94,4444	X
7	3	100	X
3	3	100	X
9	3	100	X
8	3	100	X
2	3	100	X

Multiple Range Tests for Fu1 96 h by trata			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
trata	Count	Mean	Homogeneous Groups
10	3	0	X
4	3	4,47799	X
5	3	8,32704	X
6	3	51,8868	X
1	3	92,4528	X
2	3	96,7799	X
7	3	100	X
3	3	100	X
9	3	100	X
8	3	100	X

Multiple Range Tests for fusa1 168 ho by trata			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
trata	Count	Mean	Homogeneous Groups
10	3	0	X
4	3	0	X
5	3	10,4762	X
6	3	23,2063	X
1	3	92,6984	X
2	3	95,2222	X
3	3	95,6825	X
7	3	100	X
9	3	100	X
8	3	100	X

Multiple Range Tests for fusa1 conteo de espo by trata			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
trata	Count	Mean	Homogeneous Groups
10	3	0	X
4	3	93,4141	X
5	3	94,5	X
6	3	96,2666	X
3	3	100	X
7	3	100	X
9	3	100	X
8	3	100	X
2	3	100	X
1	3	100	X

Multiple Range Tests for Fusa2 48 hor by trata			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
trata	Count	Mean	Homogeneous Groups
10	3	0	X
4	3	53,8974	X
6	3	66,8718	X
5	3	69,4872	X
1	3	85,6923	X
3	3	90,2564	X
2	3	91,5385	XX
7	3	100	X
9	3	100	X
8	3	100	X

Multiple Range Tests for Fusa2 96 horas by trata			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
trata	Count	Mean	Homogeneous Groups
10	3	0	X
4	3	13,4938	X
6	3	48,0988	X
5	3	51,284	X
1	3	89,2593	X
3	3	91,1111	X
2	3	91,4938	X
7	3	100	X
9	3	100	X
8	3	100	X

Multiple Range Tests for fusa2 168 hora by trata			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
trata	Count	Mean	Homogeneous Groups
10	3	0	X
6	3	13,1053	X
4	3	14,1053	X
5	3	19,4912	X
1	3	80,614	X
7	3	90,0877	XX
3	3	90,9649	XX
2	3	91,2982	XX
8	3	96,4912	X
9	3	100	X

Multiple Range Tests for fusa1 conteo de espo by trata			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
trata	Count	Mean	Homogeneous Groups
10	3	0	X
4	3	93,4141	X
5	3	94,5	X
6	3	96,2666	X
3	3	100	X
7	3	100	X
9	3	100	X
8	3	100	X
2	3	100	X
1	3	100	X