

Estado de la publicación: No informado por el autor que envía

Efecto biofungicida de dos extractos etanólicos a base de pomelo (*Citrus × Paradisi*) y Tagete (*Tagetes erecta* L.) con Ruda (*Ruta graveolens* L.) sobre moho gris (*Botrytis cinérea*) en condiciones in vitro

Camila Rozas Cifuentes, Álvaro Tapia Arriagada

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.5352>

Enviado en: 2022-12-30

Postado en: 2023-01-11 (versión 1)

(AAAA-MM-DD)

Title:

Biofungicidal effect of two ethanolic extracts based on grapefruit (*Citrus x Paradisi*) and Tagete (*Tagetes erecta* L.) with Ruda (*Ruta graveolens* L.) on gray mold (*Botrytis cinerea*) under in vitro conditions.

Efecto biofungicida de dos extractos etanólicos a base de pomelo (*Citrus x Paradisi*) y Tagete (*Tagetes erecta* L.) con Ruda (*Ruta graveolens* L.) sobre moho gris (*Botrytis cinérea*) en condiciones in vitro.

ROZAS C [1](#), TAPIA A [2](#)

ORCID1: [0000-0003-1643-5765](https://orcid.org/0000-0003-1643-5765). ORCID2: [0000-0002-4962-2877](https://orcid.org/0000-0002-4962-2877).

Área Agroindustrias y medio ambiente, Ingeniería agrícola, Instituto Profesional INACAP, Chile.

Resumen

En vista de la creciente contaminación que genera el uso de pesticidas sintéticos y debido del incremento de la resistencia de fungicidas, ha llevado a desarrollar nuevas alternativas para el control de *Botrytis cinérea*, un hongo de gran importancia agrícola que genera importantes pérdidas económicas. Uno de estos métodos es el uso de extractos naturales para así generar el menor daño ambiental, además su aplicación constituye una alternativa importante en frutas para consumo fresco. Bajo esta premisa, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica in vitro de dos extractos etanólicos de *C. Paradisi* y *T. erecta* L. con *R. graveolens* L. evaluados en medio PDA con tres repeticiones y cuatro tratamientos, los dos extractos (CR y CP), un controlador biológico antagonista *Trichoderma Harzianum* (CB), utilizando como testigo el fungicida comercial químico Captan (CQx). Los resultados obtenidos mostraron que las variables a medir: porcentaje de inhibición, antagonismo del controlador biológico y porcentaje de inhibición del crecimiento micelial tienen una efectividad inhibitoria de CR (22,9%) frente a CQx (25.9%) y CP no fue eficiente en el control in vitro de cinérea. Por otra parte, el tipo de antagonismo de *Trichoderma Harzianum* tampoco fue el esperado para este fitopatógeno.

Palabras Claves: Biofungicidas, *Botrytis cinérea*, *Ruta graveolens*, *Citrus Paradisi*, *Tagetes erecta*, moho gris.

Abstract

In view of the increasing contamination generated by the use of synthetic pesticides and due to the increase in the resistance of fungicides, it has led to the development of new alternatives for the control of *Botrytis cinerea*, a fungus of great agricultural importance that generates significant economic losses. One of these methods is the use of natural extracts to generate the least environmental damage, in addition its application constitutes an important alternative in fruits for fresh consumption. Under this premise, the objective of this work was to determine the in vitro antifungal activity of two ethanolic extracts of *C. paradisi* and *T. erecta* L. with *R. graveolens* L. evaluated in PDA medium with three repetitions and four treatments, the two extracts (CR and CP), an antagonistic biological controller *Trichoderma Harzianum* (CB), using the commercial chemical fungicide Captan (CQx) as a control. The results obtained showed that the variables to be measured: percentage inhibition, antagonism of the biological controller and percentage inhibition of mycelial growth have an inhibitory effectiveness of CR (22.9%) compared to CQx (25.9%) and CP was not efficient in the in vitro control of cinerea. On the other hand, the type of antagonism of *Trichoderma Harzianum* was not as expected for this phytopathogen either.

Keywords: Biofungicides, *Botrytis cinerea*, *Ruta graveolens*, *Citrus Paradisi*, *Tagetes erecta*, gray mold.

Introducción

En Chile y en el mundo *Botrytis cinérea*, es uno de los patógenos más importantes y ampliamente distribuidos, produce el tizón de las inflorescencias, cancrisis, pudriciones del tallo, pudrición de los frutos en pre y postcosecha, ocasionando pudriciones blandas en frutos. Sobre las zonas afectadas se produce una capa de moho gris, preferentemente cuando el clima es húmedo y fresco. Al ser considerado un hongo polífago con un amplio rango de hospedantes, siendo el agente causal de la podredumbre gris en diversos cultivos de importancia económica, tales como el arándano, la vid, el kiwi, la frutilla, el tomate etc. Se han reportado más de 1400 especies de plantas afectadas por *Botrytis*, de 596

géneros, en 170 familias (Fillinger & Elad, 2016).

La uva de mesa tiene gran importancia porque es en donde causa las mayores pérdidas económicas en nuestro país. Existen muchos problemas asociados a la aplicación de fungicidas tradicionales, por la contaminación que provocan en el medio ambiente, ya que al ser mal utilizados pueden contaminar flujos de agua superficiales y subterráneos (Ugalde, 2014), además de ser perjudiciales para la salud humana y de animales (Gonzales, 2019). Por otro lado, la utilización de éstos eleva los costos de producción, ya que los productos tienen altos precios y en ocasiones no son bien aplicados ni bien dosificados. Además, actualmente los mercados de destino de la fruta son cada vez más

exigentes con respecto al nivel y número de moléculas residuales presentes en la fruta exportada. Es por esto que la búsqueda de alternativas menos contaminantes y en lo posible de baja residualidad o libre de residuos, como es el caso de extractos naturales de plantas u hongos, se presenta como una interesante estrategia para el control de enfermedades.

Para el control de *B. cinérea*, el empleo de fungicidas modernos que actúan sobre sitios metabólicos específicos del hongo ha traído como consecuencia la formación de razas resistentes de éste a ciertos productos químicos, en este sentido, ha surgido la necesidad de buscar otros recursos para el manejo integrado de la enfermedad (Larios et al., 2020).

Los biofungicidas a base de extractos vegetales cumplen un papel muy importante en la agroecología, benefician al medio ambiente y a todo el ecosistema que lo rodea, combatiendo enfermedades infecciosas en las plantas causadas por organismos fitopatógenos.

En cuanto a estudios sobre el empleo de extractos vegetales contra hongos en condiciones in vitro, son numerosas las investigaciones, pero sobre *Botrytis* destacan los relacionados con extractos de aceites esenciales, pocos son los estudios sobre *Tagetes* que destacan efecto de total inhibición, aunque en otros trabajos se consigna efecto positivo contra otras especies de hongo (Barajas et al., 2011; López et al., 2018).

Hoy en día existen fungicidas comerciales a base de pomelo hechos a partir de semillas con un alto potencial antibacteriano y antifúngico debido a que es rico en flavonoides y polifenoles (Gonzalez,2011). Los cítricos son plantas que han sido muy estudiadas, encontrando que producen varias sustancias con propiedades antimicrobianas y antifúngicas, razón por la cual se han empleado para fabricar varios productos comerciales como el extracto de semilla de pomelo o toronja elaborado a partir de *Citrus paradisi* (Albornoz,2018)

Ruta Graveolens se seleccionó por la revisión de estudios que caracterizaron los compuestos que presenta la planta “los principales metabolitos secundarios en la fracción hojas - flores de ruda en orden descendente de abundancia son flavonoides, alcaloides, aceites esenciales y cumarinas (Naveda, 2010). También se ha implementado el uso de extractos vegetales para control de enfermedades fungosas, ya que son una rica fuente de productos químicos bioactivos Se le atribuyen varias propiedades terapéuticas que son aprovechadas en medicina natural. En cuanto a *Tagetes*, se ha estudiado que el extracto etanólico de *T. lemmonii* es antifúngico en *Botrytis* y el aceite esencial ocasiona inhibición de *Fusarium oxysporum f. sp. Ricini*,(Larios et al., 2020) este último no se ha explorado contra *B. cinérea*. Se le refiere a *Trichoderma harzianum* como antagonista de *Botrytis* (Merchán, 2014) y en

trabajos realizados en condiciones in vitro, se evidencia la inhibición total del crecimiento del hongo (Calvo, 2012).

Actualmente existe una necesidad evidente de reemplazar los productos químicos por alternativas menos invasivas, erosivas y persistentes en el suelo. Esto debido a las restricciones en el país y en el mundo que exigen la limitación del uso de estos productos por razones toxicológicas y ambientales. También debido al interés que han mostrado los consumidores, quienes exigen alimentos libres de plaguicidas químicos.

En el rubro vitivinícola, esto obliga a desarrollar métodos complementarios a la aplicación de fungicidas, especialmente a partir de envero, cuando el riesgo de aparición de residuos es mayor. Así mismo, existe la voluntad por parte de muchos agricultores de sustituir el uso de fungicidas en lo posible para reducir al máximo su efecto sobre el medio ambiente en el viñedo. Del mismo modo, la necesidad es aún mayor en viticultura ecológica (Garrido, 2013) un sector en continuo crecimiento en el que la aplicación de pesticidas químicos no está permitida y reside en la aplicación de técnicas culturales, pero con un especial énfasis en el manejo de la biodiversidad en el viñedo. Sin embargo, estos métodos de control no son siempre lo suficientemente efectivos y se necesitan tratamientos complementarios para mejorar las defensas de las plantas o suprimir el desarrollo de *Botrytis* hasta límites aceptables.

Por lo que la presente investigación pretende validar métodos alternativos y complementarios de fungicidas aprovechando extractos de las plantas en el control de *Botrytis cinérea* comparando técnicas agroecológicas que permitan disminuir el uso excesivo de fungicidas de manera de confirmar el potencial de estas estrategias, ofreciendo nuevas posibilidades para conseguir, eliminar o alcanzar niveles de *Botrytis* económicamente aceptables.

Hipótesis

Los biofungicidas de extractos vegetales de pomelo, tagete y ruda son tan eficaces como el control tradicional a base de cobre.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la efectividad de 2 biofungicidas de pomelo y tagete con ruda sobre la inhibición del crecimiento in vitro de *Botrytis cinérea*.

Objetivo Específicos

- Evaluar controles curativos de distintos tratamientos utilizando diferentes técnicas.
- Comparar la eficacia de los extractos etanólicos (EE)

frente a métodos tradicionales.

- Determinar la actividad inhibitoria de EE sobre el crecimiento micelial y germinación de conidios en *Botrytis cinérea*.

Materiales y métodos

Ubicación del estudio

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Instituto de formación técnica Inacap, Sede Santiago Sur ubicado en Av. Vicuña Mackenna 3864, Macul, Santiago de Chile (UTM 19 H 349797.18 m E6293185.34 m S).

Material vegetal

El material vegetal *C. paradisi* (pomelo) y *R. graveolens* (ruda) utilizado para la obtención de los extractos etanólicos (EE) se obtuvieron en la vega central ubicada en Dávila Baeza 700, Recoleta, Región Metropolitana (UTM 19 H 346654.28 m E.6300061.38 m S) fueron seleccionados al azar en el mercado. Las semillas de *T. erecta* (tagete) fueron colectadas en la facultad de Ciencias Agronómicas, departamento de hortalizas, Universidad de Chile ubicada en Av. Sta. Rosa 11315, La Pintana, Región Metropolitana (UTM 19 H 348543.19 m E6284354.35 m S) en el mes de agosto.

Material biótico

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinérea* fue proporcionado por el laboratorio de fruticultura, Campus San Joaquín de la Pontificia Universidad Católica de Chile ubicada en Vicuña Mackenna 4860, Macul, Región Metropolitana (350232.58 m E 6292392.08 m S) la muestra venía en una suspensión de tween al 0.05% a una concentración de 10^6 .

El hongo *Trichoderma harzianum* se aisló desde un sustrato de arroz contaminado en su estado de micelio. Se seleccionaron como fuente de inóculo fragmentos de tejido infectado que se establecieron en condiciones asépticas en placas Petri con medio de cultivo de agar Papa-Dextrosa (PDA) e incubadas en una cámara de crecimiento con 25 °C y 80% de humedad relativa, durante 4 días y 1 hora de luz diariamente. La cepa utilizada de controlador biológico fue *Trichoderma harzianum* el cual se obtuvo mediante redes sociales en una página de Facebook "MiColegas" sobre divulgación de información del reino fungi. Para la inoculación se realizó una dilución de esporas aplicando 0.5 mL de suspensión de tween en 1000 mL de agua.

Fungicida químico

El producto químico comercial Captan 13 WP (Captan) de Anasac es un fungicida de contacto, de amplio espectro de control, que posee acción preventiva y previene la generación de resistencia. Este viene en una presentación de polvo mojable, su dosis es para Botrytis en vides es 10 g en 1 lt de agua. Pero se usó una concentración de 10 g en 10 ml. Fue comprado en la tienda Homecenter Sodimac ubicada en Av. Américo Vesputio 7310, La Florida, Región Metropolitana (UTM 19 H 351971.41 m E 6289966.66 m S).

Material de cultivo

Se esterilizaron 50 placas Petri empaquetadas en papel Kraft con cinta de esterilización en autoclave (marca Tuttnauer, modelo 2340M) por 3 horas a 121°C. El medio de cultivo para los hongos correspondió a Agar Papa Dextrosa (PDA) marca Millipore en formato de 500g. Para su preparación se disolvió 50,7 g en 1.100 ml de agua destilada contenida en 2 frascos de laboratorio 45 GL, llevándolo a una placa calefactora (marca LabTech modelo LMS-1003) a máxima temperatura con agitador magnético hasta la disolución completa por 45 minutos aproximadamente o hasta que la solución se vea traslúcida. A continuación, se llevó a autoclave por 15 minutos a 121 °c. Esta disolución fue trasladada al mesón de laboratorio desinfectado con alcohol yodado, donde se creó un área estéril prendiendo dos

mecheros fijados con cinta brindando un margen de seguridad. Finalmente se vierte la solución en placas Petri, donde se dejó enfriar hasta que el medio se solidificó.

Para el método de envenenamiento del medio de cultivo PDA se debe esterilizar en autoclave aplicando 5 ml de los EE y de tratamiento químico Captan, moviendo la placa Petri para facilitar su disolución y se deja enfriar para la posterior siembra del inóculo.

Metodología

El proyecto se analizó por un diseño experimental con 4 controles: fungicida comercial Captan (CQx), biológico en base a *T. Harzianum* (CB) y 2 EE de *C. Paradisi* (CP) y *R. graveolens* con *T. erecta* (CR), con 3 repeticiones por cada tratamiento y 3 testigos absolutos. La unidad experimental consistió en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA incorporando los tratamientos a evaluar.

Preparación de los extractos etanólicos

La elaboración de los extractos se llevó a cabo en el Laboratorio de INACAP.

Extracto de Pomelo (*C. paradisi*)

Se peló un pomelo y medio y se extrajo la parte blanca (mesocarpio) de la cáscara para solo dejar la parte

externa (exocarpo) que tiene mayor contenido de aceites esenciales, también se utilizó la pulpa y jugo (endocarpio), para obtener 300 gr. Se llevó a una licuadora (marca "Fama va" de la línea Metvisa) de 220v. Luego se aplicó 900 ml de etanol de 96% y se dejó macerando por 7 días en oscuridad a temperatura ambiente.

ramas y hojas por último agregando 5 gramos de semillas de tagete (*T. erecta*) las cuales fueron molidas en la licuadora, luego se aplicó 100 ml por cada 10 gramos para completar los 900 ml de alcohol posterior a esto se dejó macerando en etanol al 96% por 8 días en oscuridad a temperatura ambiente.

Extracto de ruda (*R. graveolens*) y tagete (*T. erecta*)

En su totalidad para el extracto de ruda se pesaron 50 gramos de hojas y flores frescas, 35 gramos de ruda seca (*R. graveolens*) añadiendo

Figura 1. Elaboración de extractos etanólicos luego de una semana macerando de *R. graveolens* con *T. erecta* y *C. paradisi* antes y después de filtrar.



Fuente: Elaboración propia (2022).

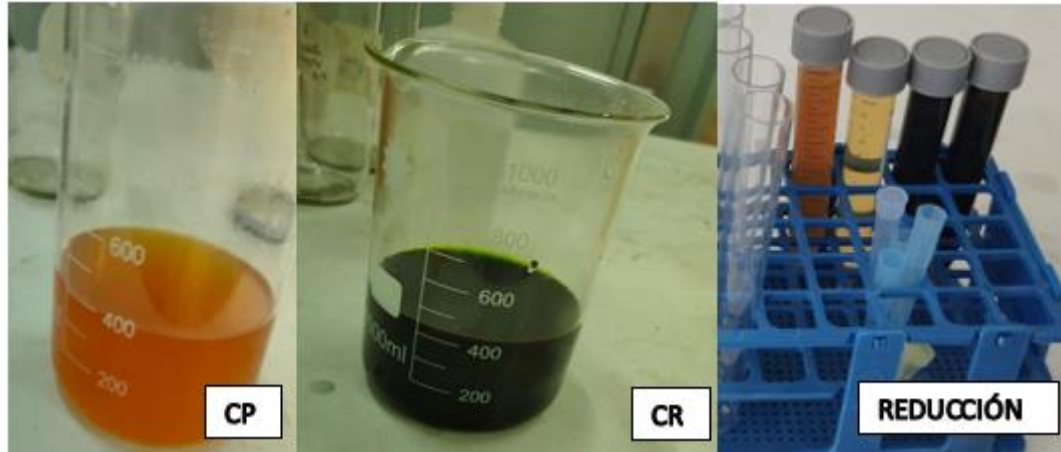
Una vez transcurrido el tiempo de maceración, las soluciones obtenidas se filtraron para eliminar excedentes sólidos, mediante el

método de filtrado al vacío, empleando un embudo Büchner, matraz Kitasato, papel filtro N°125 mm (ADVANTEC MFS ®) y una bomba de vacío (MOD BOECO R-300).

Estas extracciones normalmente se realizan a temperatura ambiente protegido de la luz, consisten en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua, etanol o glicerina) hasta que éste penetre y disuelve las porciones solubles, tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto.

Posterior al proceso de filtrado se llevó ambas soluciones a un proceso de reducción y concentración, donde por medio de un rotavapor marca (Winkler, modelo RE-2000A), se separó el contenido de aceites esenciales y etanol, por un tiempo aproximado de 4 horas a una temperatura de 97°C y con una velocidad de 66 RPM. Como resultado final se obtuvo una muestra de 400 ml en ambos. Se midió pH con un medidor edge® blu con Electrodo de pH (Hanna Smart HI2202) dando como resultado pH 4,2 EE de pomelo y pH 5,6 EE de ruda los cuales se mantuvieron en un lugar oscuro y tapados hasta la realización de los tratamientos.

Figura 2. Extractos etanólicos reducidos.



Fuente: Elaboración propia (2022).

Metodología de siembra

Al igual que en la preparación de los medios de cultivo se realizó la desinfección del mesón con alcohol yodado, donde se creó un área estéril, para las 50 placas Petri se sembró depositando con una micropipeta estéril 10 ul de cada dilución del fitopatógenos al centro de la placa con PDA, esta gota con el inóculo se extiende cuidadosamente sobre la superficie del medio de cultivo con la ayuda asa de Drigalski previamente desinfectada con etanol y flameada en el mechero (hasta el rojo vivo), luego se tapan las placas Petri, para finalmente se llevar a incubación en un horno (Binder modelo ED 115) a 20° C por una semana.

Pruebas y tratamientos

Con el fin de determinar el efecto de los biofunguicidas sobre *B. cinérea* se realizaron pruebas in vitro en el laboratorio para determinar el efecto de los EE. Utilizando la técnica del antifungigrama que mide la actividad antifúngica de los controles y susceptibilidad de *B. cinérea* frente a los distintos tratamientos. Por medio de discos fabricados con papel absorbente estéril de diámetro 6,5 mm e impregnados con las soluciones a concentraciones previamente establecidas. (La capacidad de absorción del papel será medida por el método de comparación donde se calculará la diferencia entre “peso seco” y “peso mojado” lo que dará resultado a la capacidad de absorción). Comparándolos con un control Biológico y un control químico.

Los tratamientos y los testigos se evaluarán de la siguiente forma:

-Se colocarán discos de papel absorbente impregnados con los EE. y fungicida químico en el centro de la placa Petri con el hongo *B. cinérea*.

-Mediante la técnica de cultivo dual la cual consiste en colocar en ambos extremos ecuatoriales de la placa Petri un inóculo de fitopatógeno y el antagonista para luego medir la confrontación entre ambos.

-Mediante el método de envenenamiento del medio de cultivo papa dextrosa agar se determinará la inhibición de la germinación de esporas.

Variables a medir

Porcentaje de inhibición

Las variables por evaluar serán el diámetro del halo de inhibición midiendo con pie de metro vernier digital. El porcentaje de inhibición (% I) se determinó aplicando la fórmula de Folkman (1973), citado por Kagezi et al. (2015).

$$\% I = \frac{D1-D2}{D1} (100)$$

Donde: %I= porcentaje de inhibición del crecimiento micelial; D1= diámetro del crecimiento micelial del testigo (mm); D2= diámetro del crecimiento micelial del influenciado (mm).

Antagonismo del controlador biológico

Para determinar la clase de antagonismo en condiciones de crecimiento dual, se tomó en cuenta

la escala propuesta por Bell et al. (1982)

1. El antagonista sobre crecer al fitopatógeno y cubre 100% de la caja Petri
2. El antagonista cubre 75% de la placa Petri, detiene al fitopatógeno y puede sobre crecer y esporular sobre él.
3. Ningún organismo es dominante, cada uno cubre 50% de la superficie (antagonista y patógeno).
4. El fitopatógeno cubre 75% de la placa Petri y detiene el crecimiento del antagonista y lo puede sobre crecer y esporular sobre este.
5. El fitopatógeno sobre crecer al antagonista y cubre 100% de la placa Petri.

Para el análisis del antagonista *T. Atroviride* se realizará un estudio extra donde se hará en una placa Petri una competencia antagónica para ver la eficacia en condiciones estándar de temperatura aquí se medirá la velocidad de crecimiento diametral (mm día⁻¹) y evaluar en qué momento se da el contacto hifal entre *B. cinérea* y *T harzianum*.

Para evaluar la eficacia del antagonista seleccionado se midió el crecimiento radial del patógeno. El cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) se llevó a cabo mediante la fórmula de Van Den Heuvel, que se muestra en la Ecuación 2 citada por Bustamante en donde la inhibición se expresa en porcentajes y se encuentra definida por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 * (R - r) / R$$

Ecuación 1. Fórmula de Van Den Heuvel Donde: R = Medida de radio del crecimiento de los micelios del patógeno testigo. r = Medida de radio del crecimiento del patógeno en enfrentamiento con el antagonista.

Germinación de esporas

Se realizaron ensayos de inhibición por medio de la técnica del medio enmendado o envenenado, considerando la metodología descrita anteriormente, para ello se realizó un conteo de germinación con una UFC determinada en 10^6 esto con el fin de ver la inhibición de germinación Se utilizaron 3 placas Petri. Previamente realizada la siembra sobre tres medios PDA envenenado (CP, CR, CQ) sembrado con *B. cinérea*, usando el método drigalsky y transcurridas 120 horas de incubación a 22°C. Se añadió 10 ml de una solución tween 80 con agua estéril en la proporción de 0,5 ml:1 L a la placa Petri con hongo patógeno, para extraer con una pipeta las esporas. Con el fin de soltar las conidios y esporas del micelio repitiendo hasta 3 veces. Una vez filtrada la muestra con gasa previamente esterilizada se realizó un conteo en la cámara Neubauer generando un promedio de 22 a 20 esporas por zona de conteo, donde se utilizó como criterio de conteo las líneas superiores e inferiores de la cuadrícula. Para alcanzar la concentración esperada y resembrar en un medio de cultivo PDA sin

tratamiento para ver si hay crecimiento micelial. Las placas se incubaron a 25 °c, en oscuridad, y se evaluó el crecimiento micelial o la ausencia del mismo desde las 24 horas hasta el quinto día después de la inoculación.

Análisis estadístico

Para la evaluación estadística del experimento, los datos se someterán a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey paramétrica con un nivel de significancia del $p \leq 0,05$. Todos los análisis se realizaron en el programa InfoStat (InfoStat, 2011).

Resultados y discusión

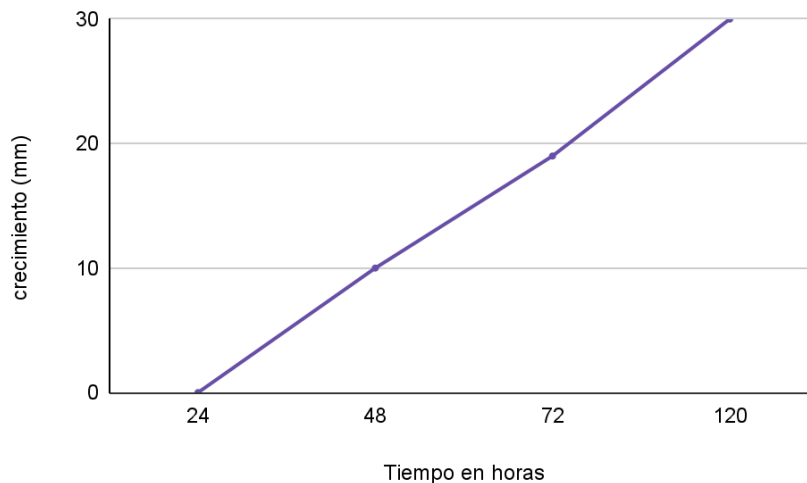
Caracterización de Botrytis cinérea bajo condiciones de laboratorio.

Considerando la dinámica de la velocidad de crecimiento del micelio (VCM) evaluadas durante los 4 días presentó tendencias particulares. La velocidad de crecimiento micelial coincide con los parámetros descritos en la literatura, en condiciones in vitro el fitopatógeno puede llegar a medir un diámetro de 6 cm o más en 10 días a 20°C (Elad et al., 2007). Los resultados obtenidos muestran un crecimiento sostenido desde el día 2 hasta el 3 (10 mm día⁻¹) alcanzando 19 mm en

promedio, pero al 4 y 5 día subió ligeramente (8 mm día⁻¹) y siguió aumentando con tendencia lenta

durante los días subsecuentes llegando a medir en total 30 mm.

Figura 3. Velocidad de crecimiento radial del micelio en PDA (mm-día⁻¹) de *Botrytis cinérea*.

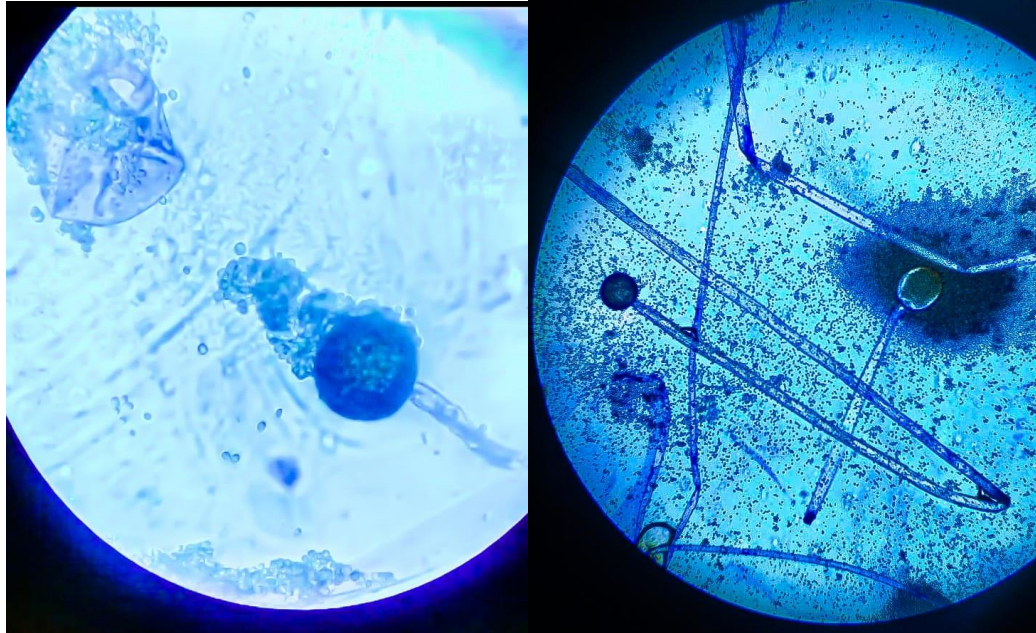


Fuente: Elaboración propia (2022).

En cuanto a la morfología de la cepa En condiciones de in vitro, *B. cinérea* desarrolla inicialmente micelio hialino, para luego tornarse gris, en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Las conidias (estructuras reproductivas asexuales) son unicelulares, hialinas, ligeramente coloreadas, de borde lisos, y formas ovoides a elipsoides, que generalmente miden entre 6-102 x 7,5-14 μm (Sutton et al., 2014). Las conidias se forman desde conidióforos que son erectos

(aéreos), libres y ramificados, produciendo las conidias tipo racimos (Latorre, 2004; Sutton et al., 2014).

Figura 4. Conidióforos y esporas cinérea vista en microscopio con aumento 100x.



Fuente: Elaboración propia (2022).

Halos de inhibición

Hasta el primer día todos los tratamientos tuvieron similar respuesta generando un halo de inhibición, siendo el más efectivo CQx (24 mm día⁻¹), en cuanto a CR (20,8 mm día⁻¹), mientras la menor actividad inhibitoria corresponde a CP (12 mm día⁻¹) en promedio. Pero en el segundo día la velocidad de crecimiento de *B. cinérea* con el tratamiento CR generó una respuesta similar a la obtenida con el producto fungicida CQx, que fue disminuyendo su diámetro desde

20,8 a 13,7 mm y CR de 24,4 a 15 mm; por otra parte CP mostró que el efecto inhibitorio fue nulo y este se sostuvo hasta el final del estudio. Los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (PICM) obtenidos al finalizar el ensayo mostraron una efectividad similar entre CR (22,9%) y CQx (25,9%).

Cuadro 1. Valores estadísticos para los halos de inhibición (mm) de *Botrytis cinérea* en PDA en los tratamientos de extractos etanólicos de *C. Paradisi* (CP) y *T. erecta* L con *R. graveolens* L (CR) frente a control químico Captan (CQx) en diferentes tiempos de evaluación.

Tratamientos	Tiempo (horas)			
	24	48	72	120
CP	12,00 Ab	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
CR	20,83 Ab	13,67 Ba	10,33 Ba	10,33 Ba
CQx	24,43 Aa	15,00 Ba	13,00Ba	11,67 Ba

NOTA: Los valores corresponden a las medias (n=3). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos. Las letras minúsculas representan diferencias significativas en el tratamiento a lo largo del tiempo en este estudio, mediante prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) (NS= no significativo).

Fuente: Elaboración propia (2022).

El análisis de varianza y comparación de medias (cuadro 1) pudo identificar al CR como aquel extracto con mejores propiedades de control, igualando en algunas variables al agente fungicida CQx que siempre se mantuvo por encima de los demás tratamientos. Además nos permite evidenciar que CP no presentó niveles de control fungicida para *B. cinérea*.

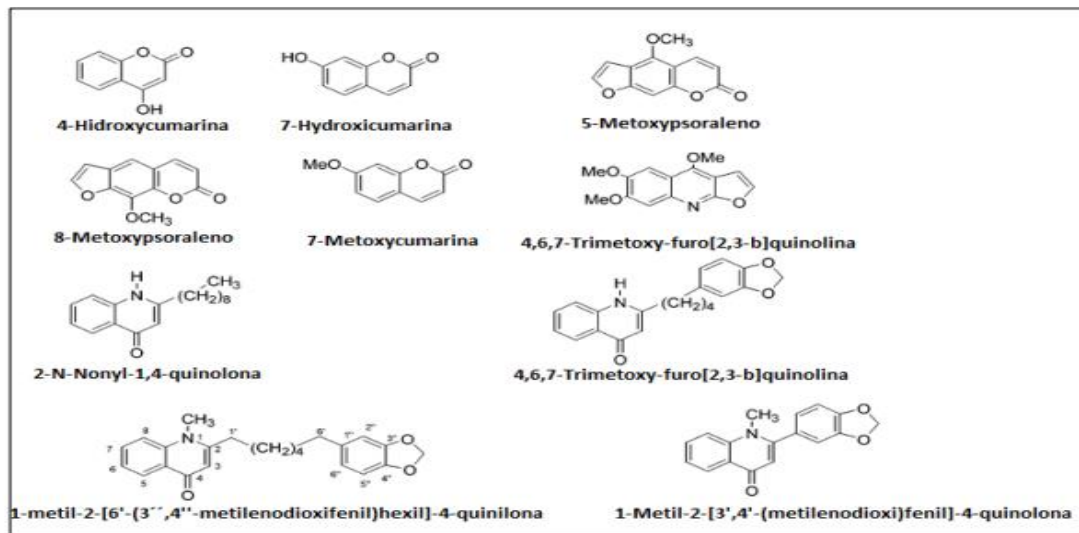
Los metabolitos secundarios son responsables de la actividad terapéutica de las drogas vegetales. Las rutas metabólicas básicas constituyen los orígenes del metabolismo secundario de las plantas, dando lugar a una variada serie de compuestos, por lo que algunos de estos son responsables de olores, colores de los vegetales,

otros 16 son responsables de virtudes culinarias, medicinales o venenosas. Los metabolitos secundarios se pueden acumular en grandes cantidades en las células vegetales o ser expulsados fuera de estas (Ari, 2022)

La determinación de los grupos de metabolitos secundarios inhibitorios en extractos etanólicos de ruda (*Ruta graveolens* L.) presenta más de 15 compuestos registrados en la literatura con propiedades antifúngicas, entre ellos se encuentran los alcaloides acridona, cumarinas, furanocumarinas, flavonoides, entre otros, así como también aceites esenciales los cuales también tienen el efecto de inhibir la germinación y la velocidad de crecimiento radical de diversas plantas (Oliva et al., 2003; Hale et al., 2004).

En la figura 5 se muestran las estructuras aisladas de las fracciones con actividad fungicida sobre algunos de los hongos mencionados anteriormente:

Figura 5. Estructuras de compuestos con actividad fungicida aislados de las hojas de *R. graveolens*.



Fuente: Oliva et al., (2003).

Con estos resultados, es posible inferir el efecto inhibitorio sobre *Botrytis cinérea* del extracto de ruda el cual contiene abundancia de grupos de metabolitos con capacidades para poder controlar el hongo. Diversos estudios han demostrado que el mayor constituyente de las cumarinas es el glucósido rutarin (0,9%), Otros furanocumarinas comunes en ruda son bergapteno, psoraleno, xantotoxina, isopimpinellin y rutaretin. Oliva et al. (2003) determinó la actividad fungicida de extractos de ruda en *Botrytis* y otros hongos filamentosos considerados como los principales patógenos de plantas en todo el mundo.

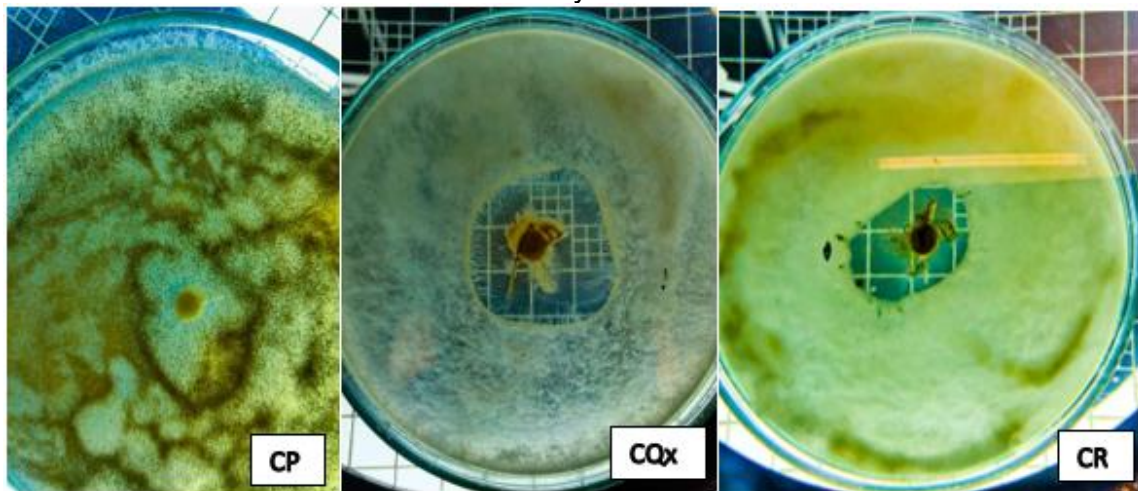
Son pocas las especies de *Tagetes* en las que se han descrito propiedades contra *Botrytis*; la más ampliamente estudiada ha sido *Tagetes erecta* L. que actúa sobre 8 especies fitopatógenas.

Además se evidenció el efecto de aceites esenciales en la producción de esclerocios de *S. rolfsii*, el aceite esencial de otra especie de *tagetes* *T. filifolia* inhibió en todos los aislamientos el crecimiento micelial totalmente durante ocho días, similar a los efectos presentados en nuestro estudio, pero al momento incubar por 30 días se presentó crecimiento micelial y producción de esclerocios, por lo que su efecto fue fungistático.(Barajas, 2011) contra

Botrytis, resultado que por vez primera se reporta; la presencia de dihidrotagetona, (E) tagetona y (E) ocimenona en el aceite esencial (Tucker y Marciarello, 1996) posiblemente sean las sustancias responsables de la actividad biológica descrita. El estudio mencionado mostró que los tratamientos con aceites esenciales de *T. erecta* inhibieron la producción de esclerocios en tres aislamientos. Además, la reducción en la producción de esclerocios fue reportada previamente por Montes-Belmont y Prados-Ligero (2006).

Por lo que la reducción o inhibición de la producción de esclerocios con los tratamientos con Tagetes es una característica relevante, ya que esto disminuye significativamente la fuente de inóculo primaria del patógeno *B. cinérea* para el desarrollo de la enfermedad. La tendencia observada en la disminución del crecimiento micelial que logró CR permite suponer que con mayores concentraciones de extracto se podría lograr la inhibición total de crecimiento y quizá la muerte del fitopatógeno.

Figura 6. Comparación de halos de inhibición 120 h en tratamientos CP, CR y CQx.



Fuente: Elaboración propia (2022).

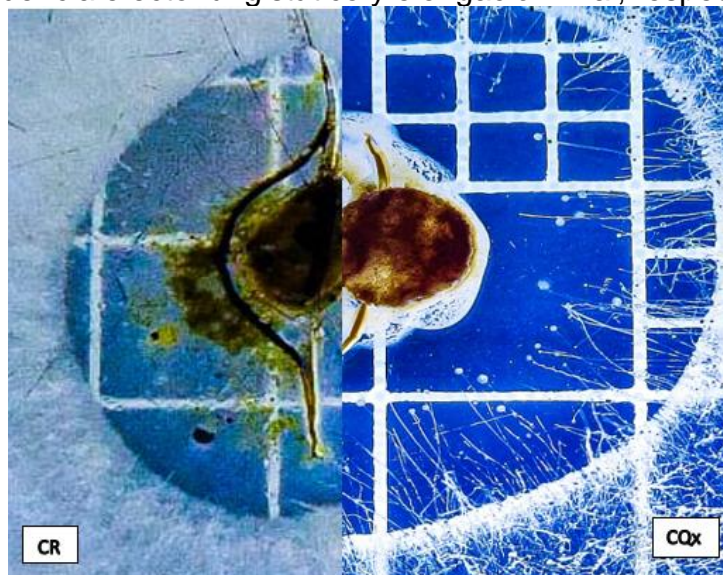
En cuanto al sobresaliente resultado obtenido sobre el efecto de inhibitorio del EE de tagete con ruda, similar al producido por el producto Captan. podemos mencionar que las propiedades de tagete y ruda son inhibitorias para el patógeno, y que

se presenta una oportunidad para realizar un control orgánico al ser un biofungicida. Por otra parte, el agroquímico tuvo efecto inmediato; sin embargo, la implicación negativa al humano y al ambiente son tema de reflexión.

A pesar de que no fue una variable considerada para estudiar en el bioensayo, la “inhibición de la elongación en el tubo germinativo” es indispensable para entender el modo de acción de un fungicida y saber cómo interfiere en el ciclo de vida del hongo, principalmente durante los procesos de germinación de conidias, desarrollo el tubo germinativo, penetración y desarrollo del micelio dentro de los tejidos de la planta.

Durante las evaluaciones se determinó una diferencia entre los halos de inhibición de CR y CQx, donde el crecimiento de *Botrytis* en CQx presentaron el largo y ancho de las hifas de mayor tamaño que en CR y creciendo hacia el interior del halo (Cuadro 7) a pesar de que no se logró cuantificar ni medir, es evidente la inhibición de la elongación de las hifas que genero CR alrededor del halo inhibitorio.

Figura 7. Comparación de halos de inhibición CR Y CQx, donde se evidencia efecto fungistático y elongación hifal, respectivamente.



Fuente: Elaboración propia (2022).

Esto nos invita reflexionar sobre evaluar la efectividad de las pruebas en el tiempo de los fungicidas comerciales, donde inicialmente tienen muestran una eficiente inhibición de patógenos, pero con el pasar de los días las moléculas químicas podrían volverse menos estables. Como se menciona por

Quintín et al año (2015) La eficacia de diferentes tratamientos disminuyó a medida que transcurrió el tiempo.

Esto también se puede asociar al fenómeno de resistencia que es provocado en gran medida por el uso reiterado de los fungicidas en épocas y dosis inadecuadas, además el no considerar los antecedentes de

resistencia de los aislados locales conlleva a diseñar programas de control inapropiados y poco eficientes (ESTERIO et al., 2010). Sin embargo, el desarrollo de resistencia de *B. cinérea* a los grupos de fungicidas asociadas al fungicida químico que se usó (dicarboximidas, benzimidazoles, hydroxianilidas y anilinoimidazoles), hace más difícil su control a pesar de la gran cantidad de alternativas disponibles.

Para optimizar el manejo de este fitopatógeno, se hace necesario evaluar el estado de sensibilidad de este hongo a las dosis comúnmente utilizadas de los fungicidas ya que cuando los distintos fungicidas son utilizados inadecuadamente y no se hace caso de las recomendaciones de los fabricantes, se genera una pérdida de la vida útil de las moléculas comerciales por la mutación de los patógenos, esto puede darse por distintos factores; ya sea una dosis inadecuada, una época de aplicación fenológica no correspondiente con la acción de la molécula si está en germinación conidial o efecto sobre el crecimiento micelial si el producto afecta uno o más genes (mono sitio o multisitio) resistencia del patógeno múltiples hospederos alta variabilidad genética. (Mesterio, et. al. 2022).

Botrytis cinérea v/s Trichoderma harzianum

Utilizando la técnica de cultivo dual se evaluó las confrontaciones in vitro

entre *Botrytis* y *Trichoderma*, se indica que la temperatura óptima para *Trichoderma* es de 25 a 30° C (Merchán, 2014). En cuanto a el efecto de inhibición de *Trichoderma* se establece que produce sustancias antibióticas como peptaibol, trichozianinas A1 y B1, que son responsables del efecto de inhibición de la germinación de esporas y elongación de hifas de otros hongos como *B. cinérea* por Calvo et al. (2012).

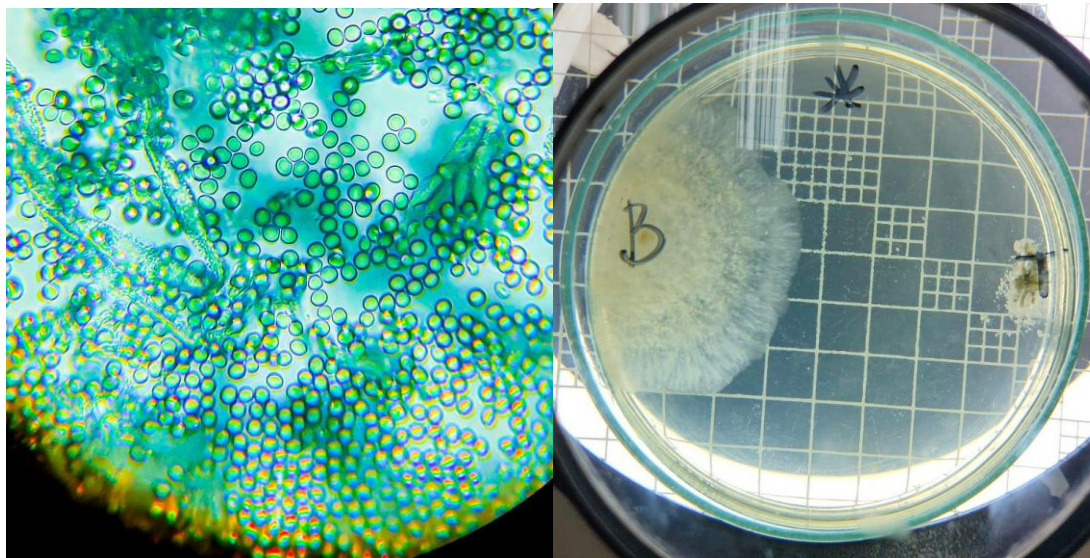
Los resultados muestran que no se logró evidenciar un efecto antagónico por parte de *Trichoderma* contra *B. cinérea*, no obstante, este resultado tampoco fue favorable para disminuir o sustituir productos fungicidas, ya que el crecimiento de *Botrytis* superó de manera exponencial al hongo antagonista. Según Larios (2020) establece que en una evaluación in vitro de métodos contra *B. cinérea*, el agente antagónico *T. Harzianum* controló el crecimiento del micelio inhibiendo en 36%, aunque su velocidad de crecimiento fue menor (7.44 mm día⁻¹) que la del patógeno en el tratamiento testigo (9.80 mm día⁻¹).

Estos resultados no coinciden con lo evaluado en nuestro ensayo, donde de manera competitiva se coinóculo *Botrytis* y *Trichoderma* con el fin de obtener las medias de crecimiento demostrando así la voracidad de *Botrytis* a la hora de acaparar el medio de cultivo y la poca capacidad de propagación de *Trichoderma*. En el tratamiento con *Trichoderma* se presentó un menor control de la

enfermedad, ya que la *B. cinérea* mostró una incidencia de crecimiento micelial de 66,6% frente a *Trichoderma* con un 10,4%, sin embargo, el crecimiento posterior a

las 24h no fue el esperado ya que se mantuvo con el mismo diámetro (5 mm) hasta el final del ensayo (Figura 8).

Figura 8. Vista microscópica con lente 100x del antagonista *Trichoderma Harzianum* y cultivo dual entre el antagonista y patógeno *B. cinérea*.



Fuente: Elaboración propia (2022).

Pruebas realizadas por Pincay et. al. (2021) confirman a *Trichoderma sp.* como antagonista grado I en la escala de Bell, donde el antagonista inhibió el crecimiento de *B. cinérea* en un 73.7%. Distinta tendencia de resultados se demostró en los realizados en nuestro estudio ya que los resultados mostraron un efecto antagonista grado IV en la escala de Bell, demostrando así que el fitopatógeno coloniza dos terceras partes del medio y limita el crecimiento de *Trichoderma*, debido a su lento crecimiento no lo califica como un buen antagonista. Se puede atribuir de este resultado al tiempo de evaluación del ensayo, puesto que

estudios confirman que el máximo potencial antagonista se alcanza a los 20 días de evaluación y también a los 7 y 12 días posteriores a la inoculación como indica el protocolo propuesto por Skidmore y Dickinson (1976). Sin embargo, cabe destacar que la aislado de *Trichoderma* logró alcanzar este valor máximo de crecimiento a los 7 días, razón por la cual tendría mayor efectividad.

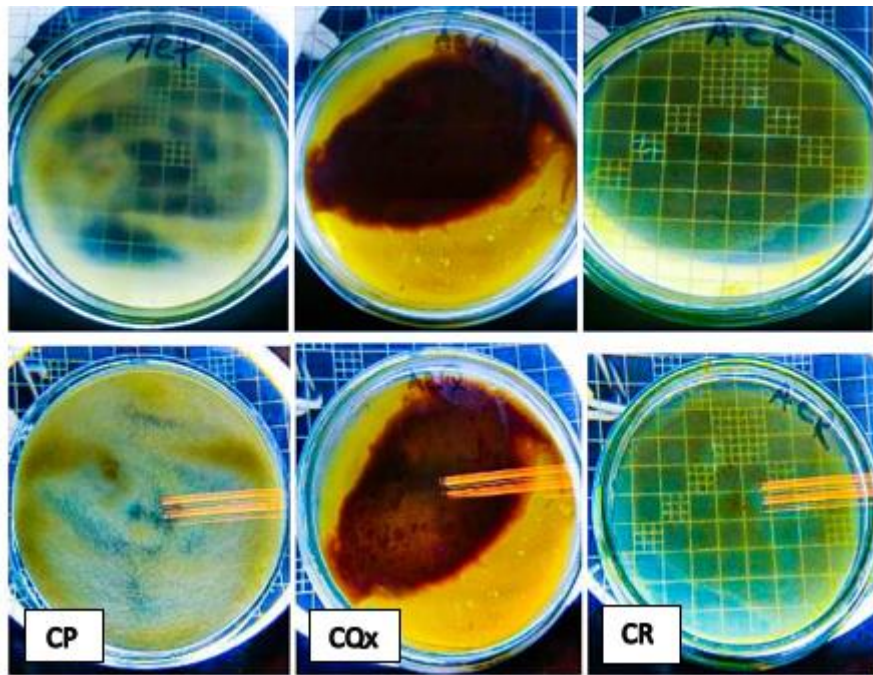
Inhibición de la germinación

Los resultados de inhibición de germinación obtenidos desde los agares envenenados demostraron que solo hubo germinación de esporas en CP, a partir de las 24

horas. Esta germinación se completó a las 48 horas después de inoculadas, cuando las esporas

germinadas colonizaron de micelio completamente la placa de Petri (Figura 8).

Figura 9. Comparación de inhibición de germinación de esporas y conidias de *B. cinérea* en medio PDA envenenado con tratamientos CP, CQx y CR.



Fuente: Elaboración propia (2022).

La efectividad de CR sobre la inhibición fue 100% exitosa, respuesta estadísticamente igual que el testigo absoluto CQx (Cuadro 2). Mientras que CP fue el menos efectivo, presentando un porcentaje de inhibición promedio de 0%.

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición germinación de esporas de *B. cinérea* obtenido en la prueba de resembrado in vitro de agares envenenados con EE de pomelo, ruda con tagete y fungicidas aplicados durante el ensayo.

Tratamientos	Tiempo (horas)			
	24	48	72	120
CP	2.00B	2.00B	2.00B	2.00B
CR	1.00 A	1.00 A	1.00A	1.00A
CQx	1.00 A	1.00 A	1.00A	1.00A

NOTA: Los valores corresponden a las medias (n=3). Las letras diferentes en sentido vertical representan diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en prueba de Tukey probabilidad ($p > 0.05$).

Fuente: elaboración propia (2022).

Estudios previos confirman que sí hubo un efecto significativo en la inhibición de la germinación de esporas con una inhibición de 42.1% para el día 2, 64.9% para el día 3 y 70% en el día 4. El efecto inhibitorio en la germinación de esporas puede deberse a que existen registros previos de la presencia de diferentes alcaloides con propiedades antifúngicas aislados de la planta de *R. graveolens*, como son la quinolina y quinolona los cuales han demostrado tener

Efectos significativos en contra de diversos hongos filamentosos (Oliva et al., 2003). Se confirma que CR tuvo mayor efecto sobre la germinación de esporas ya que estas fueron altamente sensibles al efecto de este extracto.

Se puede deducir la ineficacia de CP debido a la falta de coformulantes como cobre ya que estudios demuestran que se debe tener en cuenta que generalmente en precosecha para prevenir pudrición ácida o *Botrytis* se utilizan algunas mezclas de extractos de cítricos con cobre o productos en base a sales de

cobre, y que el uso de cobre afecta los *Bacillus* en el caso que se añadiera algún controlador biológico (Mesterio, 2021).

Conclusiones

De acuerdo con la metodología y los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir que:

- Los resultados obtenidos en este estudio solo permiten comprobar parcialmente la hipótesis planteada, ya que sí bien sólo el control de extracto de *Ruta graveolens* L con *Tagetes erecta* L inhibe el crecimiento de micelio y la germinación de conidias, no es capaz de realizar un control curativo del fitopatógeno *Botrytis cinérea*.
- El extracto etanólico más efectivo para inhibir crecimiento del micelio de *Botrytis cinérea* es de *Ruta graveolens* L con *Tagetes erecta* L, siempre en relación con el testigo absoluto, con

una inhibición de hasta un 23% y 26%, respectivamente. Por otro lado, el extracto a base de *Citrus x Paradisi* no alcanzó la inhibición del crecimiento micelial sobre el aislamiento.

- Se evaluaron respuestas del micelio de *B. cinérea* y se evidenció efecto antagonista tipo 4 de *T. harzianum* demostrando el detenimiento del antagonista y el crecimiento exponencial del fitopatógeno. Esto comparado con otros estudios requiere la necesidad de realizar más investigación dirigida a mejorar el manejo integrado de esta enfermedad.
- Los extractos etanólico de hojas de ruda y Tagetes mostraron actividad antifúngica in vitro contra *B. cinérea*; particularmente debido a los compuestos flavonoides, alcaloides, aceites esenciales y cumarinas en los extractos de dicha accesión y se sugiere la participación de estos fenoles contra *Botrytis cinérea*.
- Los extractos de plantas tienen bajo riesgo de generar resistencias ya que no solamente actúan a través de metabolitos primarios, sino que también por metabolitos secundarios que activan mecanismos de defensa y de

resistencia sistémica adquirida lo que significa que en la planta su efecto protector puede ser incluso más potente que al momento mismo de la aplicación, además su aplicación tiene un bajo periodo de carencia, residualidad y son amigables con el medio ambiente.

Recomendaciones

1. Utilizar semillas de tagete seca con el fin de obtener otros tipos de metabolitos secundarios y una mayor concentración de estos.
2. Utilizar la metodología de discos de papel remojados durante 1 día para optimizar la absorción del compuesto con el objetivo de verificar si se obtienen mejores resultados.
3. Emplear más cantidad de pericarpio y semillas de pomelo en relación con pulpa (3:1) para obtener mayor cantidad de aceites esenciales, además se recomienda mayor reducción de modo de obtener resultados óptimos.
4. Se recomienda realizar pruebas en campo y post cosecha con los EE que demuestren su potencial inhibidor y establecer la concentración de inhibición (LD50), además de su evaluación toxicológica in vivo.

Conflictos de interés

los autores declaran no tener conflictos de interés.

Contribución de la autoría

Rozas Camila Cifuentes: Conceptualización, curación de datos, análisis formal, adquisición de fondos, investigación, metodologías, administración de proyecto, recursos, software, supervisión, validación, visualización, escritura - borrador original, redacción: revisión y edición.

Tapia Álvaro Arriagada:

Conceptualización, curación de datos, análisis formal, adquisición de fondos, investigación, metodologías, administración de proyecto, recursos, software, supervisión, validación, visualización, escritura - borrador original, redacción: revisión y edición.

Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Referencias

Barajas Pérez, J. S., Montes-Belmont, R., Castrejón Ayala, F., Flores-Moctezuma, H. E., & Serrato Cruz, M. Á. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista mexicana de Micología: órgano oficial de la Sociedad Mexicana de Micología*, 34, 85–91. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802011000200010

Reyes-Quintanar, C. K., Martínez-Carrera, D., Morales Almora, P., Sobal Cruz, M., Escudero-Urbe, A. H., & Ávila-Acevedo, J. G. (2014). Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(8), 1433–1446.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000800008

Albornoz, S., & Audrey, S. (2018). Actividad Antifúngica In Vitro del extracto Etanólico de semilla de *Citrus Paradisi* “Toronja” sobre *Cándida Albicans* ATCC 10231 comparado con Clotrimazol. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/2996098?show=full>

Reyes-Quintanar, C. K., Martínez-Carrera, D., Morales Almora, P., Sobal Cruz, M., Escudero-Urbe, A. H., & Ávila-Acevedo, J. G. (2014). Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(8), 1433–1446.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000800008

Díaz, P. A. U. (2014). *Efecto in vitro e in vivo de extractos de macro hongos sobre el desarrollo de Botrytis cinérea Y Penicillium expansum* [UNIVERSIDAD DE CHILE].

<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/149055/Ugalde-%20Efecto%20in%20vitro%20%282014%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Fillinger, S., & Elad, Y. (2016). *Botrytis – The fungus, the pathogen, and its management in agricultural systems* (Sabine Fillinger & Y. Elad, Eds.; 1a ed.). Springer International Publishing.

<https://books.google.at/books?id=ACk3CwAAQBAJ>

González Ulibarry, P. (2019). *Efecto de los plaguicidas sobre la salud humana*

[ArchivoPDF]. https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/26823/2/Efecto_de_los_plaguicidas_en_la_Salud.pdf

Larios-Palacios, O. E., López-Vázquez, É. Y., Curiel Rodríguez, A., Ruíz-Espinoza, F. D. J., Solano-Vidal, R., & Serrato-Cruz, M. Á. (2020). *Evaluación in vitro de métodos contra Botrytis cinérea*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(3), 593–606.

<https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077>

Calvo-Araya, J. A., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S., & Orozco-Rodríguez, R. (2, julio-diciembre 2012). *ANÁLISIS Y EVALUACIÓN IN VITRO DE ANTAGONISTAS DE Botrytis cinérea EN MORA*. Universidad de Costa Rica.

<https://www.redalyc.org/pdf/437/43724664001.pdf>

JULIA BIBIANA MERCHÁN-GAITÁN ROSA LILIA FERRUCHO JAVIER GIOVANNI ÁLVAREZ-HERRERA. (2014). Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinérea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.). *REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLA*.

<https://doi.org/10.17584/rcch.2014v8i1.2799>

D. K. Bell, H. D. W. y. C. R. M. (1982). “In vitro” antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. University of Georgia. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.pdf

Garrido, C. C. (2013). Control de la podredumbre por *Botrytis cinérea* mediante la aplicación de *Cándida*

Sake CPA-1 y otras estrategias alternativas a los fungicidas químicos en uva de vinificación. Universidad de Lleida. <https://www.tdx.cat/handle/10803/134607>

González, J. D. A. (2011). *Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de las cáscaras y semillas de tres especies de cítricos contra el hongo fitopatógeno Fusarium roseum*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD

JAVERIANA FACULTAD DE
CIENCIAS CARRERA DE
BIOLOGÍA. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8842>

Reyes-Quintanar, C. K., Martínez-Carrera, D., Morales Almora, P., Sobal Cruz, M., Escudero-Uribe, A. H., & Ávila-Acevedo, J. G. (2018). Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(8), 1433–1446. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i8.821>

Rojas, G. Y. A. (2022). “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA in vitro DE EXTRACTOS DE *Ruta graveolens* (Linneo, 1753) EN *Candida albicans* (Berkhout, 1923).” UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12773/14642/Blarogy.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Oliva A, Meepagala KM, Wedge DE, Harries D, Hale AL, Aliotta G, Duke SO. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J Agric Food Chem*. 2003 Feb 12;51(4):890-6. doi: 10.1021/jf0259361. PMID: 12568545

Barajas Pérez, J. S., Montes-Belmont, R., Castrejón Ayala, F., Flores-Moctezuma, H. E., & Serrato

Cruz, M. A. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. Sociedad Mexicana de Micología.

Montes-Belmont, R., A.M. Prados-Ligero, 2006. Influence of plant extracts on *Sclerotium cepivorum* development. *Journal of Plant Pathology* 5 (3): 373–377. [<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012054236>]

Mesterio, M., Donoso, E., Elmer, P., Mundy, D. (30 de noviembre de 2022). Manejo integrado de Botrytis: Programas sustentables y óptimos de control aplicando lo justo, en vides de mesa y viníferas. [Seminario]. Seminario de la Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Esterio, M. (2021). *Botrytis en uva de mesa aprendizaje de la temporada anterior*. Red agrícola. https://www.redagricola.com/cl/assets/uploads/2021/07/ra-120_botritis-esterio.pdf

Yagui, A. T. (2019). *Nueva y eficaz herramienta para controlar importantes enfermedades en frutales*. Red agrícola. https://www.redagricola.com/cl/assets/uploads/2019/06/2_alejandro_toro_2019.pdf

Ana Pincay, Michelle Noboa, William Viera, Karen Herrera, Antonio León, Trevor Jackson. (2021). *Evaluación in vitro del potencial antagonista de Trichoderma sp. y hongos endófitos de mora (Rubus glaucus Benth) para el control de Botrytis cinerea*.

JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH.

<https://doi.org/10.5281/zenodo.4917695>

-Elad, Y., Williamson, B., Tundzinski, P and Delen, N. (2007). Botrytis spp. and Diseases they cause in Agricultural Systems. En: Botrytis: Biology, Pathology and Control. Ed. Springer. Netherlands. (Pag. 412) .

Quintín, A., Mondaca, E. C., Ángel, M., Sánchez, A., Leal León, V. M., Valenzuela Escoboza, F. A., César, Y., & Palacios Mondaca, A. (2015.). Efectividad de fungicidas convencionales y biorracionales sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro* Bio-rational and conventional fungicides effectiveness on in vitro *Sclerotinia sclerotiorum*. Redalyc.Org. Retrieved December 15, 2022, from <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263138103011.pdf> (Pag.7)

Este preprint fue presentado bajo las siguientes condiciones:

- Los autores declaran que son conscientes de que son los únicos responsables del contenido del preprint y que el depósito en SciELO Preprints no significa ningún compromiso por parte de SciELO, excepto su preservación y difusión.
- Los autores declaran que se obtuvieron los términos necesarios del consentimiento libre e informado de los participantes o pacientes en la investigación y se describen en el manuscrito, cuando corresponde.
- Los autores declaran que la preparación del manuscrito siguió las normas éticas de comunicación científica.
- Los autores declaran que los datos, las aplicaciones y otros contenidos subyacentes al manuscrito están referenciados.
- El manuscrito depositado está en formato PDF.
- Los autores declaran que la investigación que dio origen al manuscrito siguió buenas prácticas éticas y que las aprobaciones necesarias de los comités de ética de investigación, cuando corresponda, se describen en el manuscrito.
- Los autores declaran que una vez que un manuscrito es postado en el servidor SciELO Preprints, sólo puede ser retirado mediante solicitud a la Secretaría Editorial deSciELO Preprints, que publicará un aviso de retracción en su lugar.
- Los autores aceptan que el manuscrito aprobado esté disponible bajo licencia [Creative Commons CC-BY](#).
- El autor que presenta el manuscrito declara que las contribuciones de todos los autores y la declaración de conflicto de intereses se incluyen explícitamente y en secciones específicas del manuscrito.
- Los autores declaran que el manuscrito no fue depositado y/o previamente puesto a disposición en otro servidor de preprints o publicado en una revista.
- Si el manuscrito está siendo evaluado o siendo preparando para su publicación pero aún no ha sido publicado por una revista, los autores declaran que han recibido autorización de la revista para hacer este depósito.
- El autor que envía el manuscrito declara que todos los autores del mismo están de acuerdo con el envío a SciELO Preprints.