



**Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión**  
**Facultad de Ciencias**  
**Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología**

Actividad antifúngica de extractos de biomasa celular de *Citrus x aurantium*  
“naranja agria” sobre hongos fitopatógenos de *Lactuca sativa* “lechuga”

**Tesis**

**Para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Biotecnología**

**Autores**

Alieska Michelle Salazar Cabrera  
Efrain Alex Arce Gonzales

**Asesora**

Dra. Hermila Belba Díaz Pillasca

UNIV. NAC. JOSÉ F. S. CARRIÓN  
Dra. Hermila B. Díaz Pillasca

**Huacho – Perú**

**2026**



**Reconocimiento - No Comercial – Sin Derivadas - Sin restricciones adicionales**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

**Reconocimiento:** Debe otorgar el crédito correspondiente, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se realizaron cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de ninguna manera que sugiera que el licenciante lo respalda a usted o su uso. **No Comercial:** No puede utilizar el material con fines comerciales. **Sin Derivadas:** Si remezcla, transforma o construye sobre el material, no puede distribuir el material modificado. **Sin restricciones adicionales:** No puede aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros de hacer cualquier cosa que permita la licencia.



# UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

## LICENCIADA

(Resolución de Consejo Directivo N° 012-2020-SUNEDU/CD de fecha 27/01/2020)




### Facultad de Ciencias Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología

#### METADATOS

DATOS DEL AUTOR (ES):		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	FECHA DE SUSTENTACIÓN
Alieska Michelle Salazar Cabrera	72219696	18-02-2026
Efrain Alex Arce Gonzales	73903355	18-02-2026
DATOS DEL ASESOR:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CÓDIGO ORCID
Dra. Hermila Belba Díaz Pillasca	15601607	<a href="https://orcid.org/0000-0002-2491-3774">https://orcid.org/0000-0002-2491-3774</a>
DATOS DE LOS MIEMBROS DE JURADOS		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CODIGO ORCID
Dr. José Luis Romero Bozzetta	15581525	<a href="https://orcid.org/0009-0005-2859-3439">https://orcid.org/0009-0005-2859-3439</a>
Blgo. Luis Alberto La Cruz Arévalo	15612160	<a href="https://orcid.org/0009-0009-4576-5107">https://orcid.org/0009-0009-4576-5107</a>
M(o). Miguel Ángel Castañeda Samanamu	15726159	<a href="https://orcid.org/0000-0001-9883-5759">https://orcid.org/0000-0001-9883-5759</a>

## Efrain Arce & Alieska Salazar

### Actividad antifúngica de extractos de biomasa celular de *Citrus xaurantium* “naranja agria” sobre hongos fitopatógeno...

-  Quick Submit
-  Quick Submit
-  Facultad de Ciencias

#### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::1:3450330243

Fecha de entrega

23 dic 2025, 2:28 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

23 dic 2025, 2:43 p.m. GMT-5

Nombre del archivo

TESIS\_EFRAIN\_ALIESKA.pdf

Tamaño del archivo

1.3 MB

65 páginas

13.611 palabras

79.878 caracteres

## 17% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




#### Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

#### Exclusiones

- ▶ N.º de coincidencias excluidas

#### Fuentes principales

- 16%  Fuentes de Internet
- 5%  Publicaciones
- 10%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

#### Marcas de integridad

##### N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

## **DEDICATORIA**

A Dios todo poderoso, por siempre haber bendecido a nuestras familias, brindando la fuerza y unión necesaria en todo momento.

Les dedicamos el resultado de este trabajo, principalmente a nuestras familias. A nuestros padres que siempre nos apoyaron en todo momento. Estamos muy agradecidos por inculcarnos a afrontar las dificultades sin perder nunca los valores.

Nos han formado para poder ser quiénes somos hoy en día, nos han inculcado principios, valores y perseverancia. Todo esto con mucho amor y sin pedir nunca nada a cambio.

***Alieska Michelle Salazar Cabrera***

***Efrain Alex Arce Gonzales***

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos de todo corazón a nuestros padres, quienes han sido nuestro pilar fundamental, brindándonos siempre su apoyo incondicional y sincero. Con su amor y guía, nos han impulsado a perseguir nuestras metas sin rendirnos ante los desafíos.

Expresamos también nuestra gratitud a nuestra asesora, cuya dedicación y paciencia han sido clave en este proceso. Sus enseñanzas, correcciones y consejos nos han permitido alcanzar este objetivo tan anhelado, y su guía permanecerá con nosotros a lo largo de nuestra trayectoria profesional.

Asimismo, reconocemos a todos los profesores que han formado parte de nuestro camino académico. Gracias a su compromiso y conocimiento, hemos adquirido las herramientas necesarias para enfrentar el futuro con determinación y confianza.

*Alieska Michelle Salazar Cabrera*

*Efrain Alex Arce Gonzales*

## ÍNDICE

Dedicatoria .....	v
Agradecimiento .....	vi
Índice .....	vii
Índice de tablas .....	ix
Índice de figuras.....	x
Resumen.....	xi
Abstract .....	xii
Introducción .....	xiii
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>I</b>
1.1 Descripción de la realidad problemática.....	1
1.2 Formulación de problema.....	2
1.2.1. Problema general.....	2
1.2.2. Problemas específicos .....	2
1.3. Objetivos de la investigación.....	2
1.3.1. Objetivo General.....	2
1.3.2. Objetivos Específicos.....	2
1.4. Justificación de la investigación .....	3
1.5. Delimitación del estudio.....	4
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEORICO .....</b>	<b>5</b>
2.1. Antecedentes de la investigación.....	6
2.1.1. Investigaciones Internacionales.....	6
2.1.2. Investigaciones nacionales .....	7
2.2. Bases Teóricas.....	9
2.2.1. Lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> ).....	9
2.2.2. Descripción botánica de la lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> ).....	11
2.2.3. Importancia de <i>Lactuca sativa</i> .....	11
2.2.4. Problemas que afectan a la <i>Lactuca sativa</i> .....	12
2.2.5. <i>Botrytis</i> sp .....	12
2.2.6. <i>Fusarium</i> sp .....	13

2.2.7.	<i>Citrus x aurantium</i> (Naranja Agria) .....	13
2.2.8.	Descripción botánica de la naranja agria ( <i>Citrus x aurantium</i> ).....	13
2.2.9.	Eficacia antifúngica de ( <i>Citrus x aurantium</i> ).....	14
2.2.10.	Fitoalexinas .....	14
2.2.11.	El cultivo de tejidos vegetales.....	14
2.3.	Definiciones conceptuales .....	14
2.4.	Hipótesis de investigación.....	16
2.4.1.	Hipótesis General.....	16
2.4.2.	Hipótesis Especificas .....	16
2.4.3.	Variables en operacionalización.....	17
CAPÍTULO III: METODOLOGIA .....		18
3.1.	Diseño metodológico.....	18
3.1.1.	Tipo de investigación .....	18
3.1.2.	Nivel de investigación.....	18
3.1.3.	Diseño de la investigación .....	18
3.1.4.	Enfoque de la investigación .....	18
3.2.	Población y muestra .....	19
3.2.1.	Población .....	19
3.2.2.	Muestra .....	19
3.3.	Técnicas de recolección de datos .....	20
3.3.1.	Técnicas a emplear .....	20
3.3.1.1.	Material biológico .....	20
3.3.1.2.	Desinfección de yemas axilares .....	28
3.3.1.3.	Obtención de plántulas in vitro de naranja agria .....	29
3.3.1.4.	Obtención de callos.....	30
3.3.1.5.	Suspensión celular .....	32
3.3.1.6.	Preparación del Extracto Antifúngico de Biomasa Celular.....	32
3.3.1.7.	Identificación y Replicación de hongos fitopatógenos.....	32
3.3.1.8.	Prueba de antibiograma.....	34
3.4.	Técnicas para el procesamiento de la información.....	35

CAPÍTULO IV: RESULTADOS..... 40

    4.1. Análisis de resultados ..... 40

CAPÍTULO V: DISCUSION ..... 42

    5.1. Discusión de resultados ..... 42

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... 50

    6.1. Conclusiones ..... 55

    6.2. Recomendaciones ..... 56

REFERENCIAS..... 57

    7.1. Fuentes Bibliográficas ..... 57

ANEXOS ..... 58

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Variables en operacionalización; dimensiones, indicadores y escala de dimensión.	21
<b>Tabla 2.</b> Tratamiento para la inducción de callos.....	25
<b>Tabla 3.</b> Tabla de evaluación de callos.....	26
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos que se aplicarán en el antibiograma.....	28
<b>Tabla 5.</b> Respuesta a los diferentes tratamientos en la formación de callos en explantos de naranja agria en condiciones in vitro.....	30
<b>Tabla 6.</b> Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de formación de callos en explantes de naranja agria en condiciones in vitro.....	31
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza para porcentaje de formación de callos en explantes de naranja agria en condiciones in vitro.....	31
<b>Tabla 8.</b> Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para inhibición del crecimiento de <i>Botrytis sp.</i> ....	36
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza para porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis sp.</i> .....	36
<b>Tabla 10.</b> Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para inhibición del crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> .....	37
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza para porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> .....	37

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diseño experimental de la inducción de callos de naranja agria .....	40
<b>Figura 2.</b> Formación de callos en explantes con 2,4-D. Sin formación de callo (0), Ligera formación de callo (1), formación de callo (2), Abundante formación de callo (3) (Tapia, 2018).....	41
<b>Figura 3.</b> Friabilidad de callos en explantes. callos no friables (1), poco friables (2) y friables(3) (Tapia, 2018).....	41
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de formación de callos en explantes de naranja agria en condiciones in vitro. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	47
<b>Figura 5.</b> Formación de callos de grado 1 en explantes de naranja agria en condiciones in vitro. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	48
<b>Figura 6.</b> Formación de callos de grado 2 en explantes de naranja agria en condiciones in vitro. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	49
<b>Figura 7.</b> Formación de callos de grado 3 en explantes de naranja agria en condiciones in vitro. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	49

## RESUMEN

En el Perú, la lechuga (*Lactuca sativa*) es un cultivo relevante tanto por su valor nutricional como por su uso culinario, aunque enfrenta problemas fitosanitarios causados por hongos como *Botrytis sp.* y *Fusarium sp.* Investigaciones recientes han evidenciado que los cítricos poseen mecanismos de defensa frente a estos fitopatógenos, lo que motivó el presente estudio. El objetivo principal fue evaluar la capacidad antifúngica de extractos alcohólicos obtenidos de la biomasa celular de naranja agria sobre el crecimiento de dichos hongos. Para ello, se emplearon plántulas de lechuga obtenidas in vitro, así como callos y yemas axilares derivadas de estas. Los explantes, de 1,5 cm de longitud, se cultivaron en medio MS al 100% suplementado con sacarosa y se incubaron a 26°C bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 30 días. Posteriormente, las hojas de las plántulas in vitro se diseccionaron y sembraron en placas con 2,4-D, manteniéndose durante 30 días en oscuridad a 26°C. Este procedimiento permitió obtener material vegetal adecuado para evaluar la actividad antifúngica de los extractos de naranja agria frente a los hongos patógenos de la lechuga. Lostratamientos fueron del T0 al T5, siendo este último el que nos dio mejor resultado con un 96% de formación de callos, de los cuáles el 52% fueron de grado 3. Posteriormente, se prepararon 2 matraces que contenían 1g de callos del T5 y 25mL del cultivo líquido suplementado con sacarosa para ser colocado e incubado en un shaker a 110 rpm con temperatura ambiente y ausencia de luz por 15 días, luego se renovó el medio de cultivo para ser incubado por 15 días nuevamente. Obteniéndose que al término de los 30 días se triplicó el peso inicial. Posteriormente, se purificó 3 veces con agua estéril, luego se deshumedeció a 55°C por 48h, se pulverizó y se disolvió 3g de biomasa obtenida en 20mL de etanol 96°, por último, se dejó a temperatura ambiente por 48h. Luego se empleó papel filtro N°4 y se secó a 40° por 18h. Para el antibiograma se utilizaron 1g y 2g del extracto concentrado en 1mL de etanol 70°. Posteriormente se inocularon los hongos a ser evaluados en agar Sabouroud (*Botrytis sp.* y *Fusarium sp.*). Luego se agregaron 5 discos de papel filtro de 6mm a los cuales se les agregó 25uL de cada tratamiento a evaluar y se realizaron 5 repeticiones por cada uno que se incubaron a 37° por 48h. Se evidenció que el T4 para el hongo *Botrytis* tuvo una inhibición del 52%, mientras que para *Fusarium* el T5 obtuvo una inhibición del 68%. Demostrando así la actividad antifúngica de los extractos alcohólicos de biomasa celular de naranja agria.

**Palabras claves:** *Lactuca sativa*, fitopatógenos, *Botrytis sp.*, *Fusarium sp.*, biomasa celular, plántula, antibiograma.

## ABSTRACT

In Peru, lettuce (*Lactuca sativa*) is a relevant crop due to both its nutritional value and culinary uses, although it faces phytosanitary issues caused by fungi such as *Botrytis* sp. and *Fusarium* sp. Recent research has shown that citrus fruits possess defense mechanisms against these phytopathogens, which motivated the present study. The main objective was to evaluate the antifungal capacity of alcoholic extracts obtained from the cellular biomass of sour orange on the growth of these fungi. For this purpose, *in vitro* lettuce seedlings were used, as well as calluses and axillary buds derived from them. The explants, measuring 1.5 cm in length, were cultivated in 100% MS medium supplemented with sucrose and incubated at 26°C under a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness for 30 days. Subsequently, the leaves of the *in vitro* seedlings were dissected and sown in plates with 2,4-D, maintained for 30 days in darkness at 26°C. This procedure allowed for the acquisition of suitable plant material to evaluate the antifungal activity of sour orange extracts against lettuce pathogenic fungi. Treatments ranged from T0 to T5, with the latter yielding the best result, showing 96% callus formation, of which 52% were grade 3. Subsequently, two flasks containing 1g of T5 calluses and 25mL of liquid medium supplemented with sucrose were prepared, placed, and incubated on a shaker at 110 rpm at room temperature and in the absence of light for 15 days; the culture medium was then renewed and incubated for another 15 days. By the end of 30 days, the initial weight had tripled. The material was then purified three times with sterile water, dehydrated at 55°C for 48 hours, pulverized, and 3g of the obtained biomass were dissolved in 20mL of 96° ethanol, and left at room temperature for 48 hours. Filter paper No. 4 was used, and the extract was dried at 40°C for 18 hours. For the antibiogram, 1g and 2g of the concentrated extract were used in 1mL of 70° ethanol. The fungi to be evaluated were then inoculated on Sabouraud agar (*Botrytis* sp. and *Fusarium* sp.). Five 6mm filter paper discs were added, each with 25µL of each treatment to be evaluated, with five replicates for each, incubated at 37°C for 48 hours. It was observed that T4 for *Botrytis* showed 52% inhibition, while T5 for *Fusarium* achieved 68% inhibition, thus demonstrating the antifungal activity of alcoholic extracts from sour orange cellular biomass.

**Keywords:** *Lactuca sativa*, fitopatógenos, *Botrytis* sp., *Fusarium* sp., biomasa celular, plántula, antibiograma.

## INTRODUCCION

La producción de hortalizas es de suma importancia en la ingesta y nutrición de la población alrededor del mundo. La lechuga (*Lactuca sativa L.*) es una importante hortaliza que se siembra en todas las regiones de nuestro país, ya que tiene un gran consumo en la mayor parte del país.

En el Perú, el cultivo de esta hortaliza, está disperso en todo el país debido a su especial ubicación geográfica. La lechuga, es una hortaliza muy perecedera y el ineficiente sistema de transporte no permite su desplazamiento a lugares muy distantes. Es una especie fácil de adaptar en pequeñas zonas de producción como biohuertos caseros, pero también son afectadas por diversas enfermedades y plagas, ya que son factores limitantes de la producción.

La lechuga (*Lactuca sativa*) fue reconocida como una de las hortalizas más utilizadas globalmente, principalmente por su frescura, sabor y aporte nutricional. No obstante, su producción enfrentó diversos retos, destacando las enfermedades fúngicas como uno de los principales factores que comprometieron su desarrollo y calidad. Entre los hongos fitopatógenos más relevantes que la afectaron se encontraron *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, *Sclerotinia spp.*, *Rhizoctonia spp.* y *Botrytis spp.*, los cuales provocaron daños significativos, desde el debilitamiento progresivo de las plantas hasta la pérdida total del cultivo. Estas afecciones resultaron en una disminución considerable de la productividad y ocasionaron importantes pérdidas económicas para los productores. Tradicionalmente, el manejo de estos hongos se basó en la aplicación de fungicidas químicos. Si bien estos productos demostraron ser efectivos, su uso indiscriminado generó preocupaciones relacionadas con la calidad del producto, riesgos para la salud humana y el impacto ambiental. Además, la aplicación continua de estos compuestos favoreció la aparición de resistencias en los patógenos, reduciendo la eficacia de los tratamientos a largo plazo. Frente a este panorama, se planteó la necesidad de investigar alternativas de control más sostenibles y eficientes, que permitieran reducir los efectos negativos asociados al uso de fungicidas convencionales.

Con este propósito, se llevó a cabo una investigación para evaluar la capacidad antifúngica de los extractos alcohólicos obtenidos a partir de biomasa celular de naranja agria (*Citrus x aurantium*). Este estudio se centró en determinar su efecto sobre el crecimiento de *Botrytis spp.* y *Fusarium spp.*, dos de los hongos más agresivos

que afectan a la lechuga. La idea principal fue comprobar si estos extractos podían servir como una alternativa natural y eficiente para combatir estos patógenos sin recurrir a productos químicos sintéticos. Para ello, se realizaron pruebas en condiciones de laboratorio, donde se expusieron cultivos de los hongos a diferentes concentraciones del extracto. Se observó que, en comparación con los controles sin tratamiento, aquellos sometidos a la acción del extracto de naranja agria presentaban una reducción significativa en su crecimiento. Estos resultados sugirieron que los compuestos presentes en la biomasa de la naranja agria poseen propiedades antifúngicas capaces de inhibir la proliferación de *Botrytis spp.* y *Fusarium spp.*

La literatura científica ha documentado que los cítricos contienen diversos metabolitos bioactivos, como flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos, los cuales tienen efectos antimicrobianos y antifúngicos. La inhibición del crecimiento de estos hongos podría estar relacionada con la acción de estos compuestos sobre su estructura celular y su metabolismo, impidiendo que se desarrollen y colonicen el tejido vegetal. Estos hallazgos son prometedores, ya que indican que los extractos de naranja agria podrían utilizarse como un método alternativo de control de enfermedades en la lechuga. Su aplicación podría formar parte de estrategias de manejo integrado, reduciendo la dependencia de los fungicidas convencionales y fomentando una producción agrícola más saludable y respetuosa con el medio ambiente.

No obstante, para llevar esta propuesta a un nivel más práctico, es necesario realizar estudios adicionales en condiciones de campo. Es fundamental evaluar la efectividad del extracto en distintos ambientes, así como determinar las dosis óptimas y la forma más adecuada de aplicación para garantizar su eficacia sin afectar el crecimiento de la lechuga.

Los extractos alcohólicos de biomasa celular de naranja agria han demostrado un potencial significativo como agentes antifúngicos en el cultivo de lechuga. Su competencia para reducir el crecimiento de hongos patógenos sugiere que podrían representar una solución innovadora y sostenible para enfrentar las enfermedades que afectan este cultivo. Con investigaciones adicionales y su posible aplicación en la agricultura, esta alternativa podría convertirse en un recurso valioso para mejorar la producción hortícola sin comprometer la salud de los consumidores ni el equilibrio ambiental.

## CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Descripción de la realidad problemática

En el Perú la lechuga (*Lactuca sativa*) es de gran importancia nutricional y culinaria, sobre todo en la parte de la costa central, gracias a que cuenta con condiciones apropiadas para la ampliación de su cultivo. La hortaliza más común en nuestro país es la lechuga y tiene una mayor ingesta en las épocas de verano (Asto, 2018)

Existe una gran variedad de especies que se ajustan a una extensa gama de climas, dentro de los cuales se puede decir que las lechugas se adaptan mejor a climas templados y húmedos (Maroto y Gómez, 2006). En nuestro país debido a la gran cantidad de climas con los que contamos, se pueden encontrar diversos hongos fitopatógenos que causan daños en los cultivos de lechugas, reduciendo su valor, tanto nutricional como adquisitivo y económico a los productores y/o consumidores (FAO, 2016)

Entre los hongos más comunes que afectan a los cultivos de lechugas encontramos a la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), que infecta los cultivos en cualquier estadio de su desarrollo. Es la enfermedad más reiterativa en estos cultivos, que pueden causar serios daños y así dificultar la comercialización de las lechugas (Pariona et. al.,2008)

Según investigaciones realizadas, se sabe que los cítricos cuentan con mecanismos de defensa contra hongos fitopatógenos, tales como la fitoalexinas, las cuales pueden ser empleadas, en conjunto, como herramientas biotecnológicas para poder mitigar los daños causados por dichos hongos. Una de estas herramientas biotecnológicas son los extractos de biomasa celular, que se pueden obtener a partir de plántulas in vitro (Torres et. al., 2009).

Sin embargo, no existe confirmación científica alguna si el cítrico *C. aurantium* tiene mecanismos de defensa contra los hongos del género *Botrytis* sp. y *Fusarium* sp.; incertidumbre que a través del presente trabajo se pretende resolver.

## 1.2 Formulación de problema

### 1.2.1. Problema general

¿Tendrán capacidad antifúngica los extractos alcohólicos de biomasa celular de naranja agria sobre los hongos fitopatógenos, *Botrytis sp.* y *Fusarium sp.*, de *Lactuca sativa*?

### 1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál será el tratamiento óptimo que induzca a la formación de callos a partir de hojas in vitro de naranja agria?
- ¿Cuál será la cantidad de masa adicional en la suspensión celular a partir de callos de naranja agria?
- ¿Cuál de los tratamientos influirá sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Botrytis sp.* y *Fusarium sp.*, de *Lactuca sativa*?

## 1.3. Objetivos de la investigación

### 1.3.1 Objetivo general

Determinar la capacidad antifúngica de los extractos alcohólicos de biomasa celular de naranja agria sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos; *Botrytis sp.* y *Fusarium sp.* de la *Lactuca sativa*.

### 1.3.1. Objetivos Específicos

- Determinar el tratamiento óptimo que induzca a la formación de callos a partir de hojas in vitro de naranja agria.
- Determinar la cantidad de masa adicional en la suspensión celular a partir de callos de naranja agria.
- Determinar si alguno de los tratamientos influye sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos; *Botrytis sp.* y *Fusarium sp.*, de la lechuga.

#### 1.4. Justificación de la investigación

El Perú, por su ubicación geográfica, posee diversos climas que permiten el cultivo de diferentes hortalizas. La *Lactuca sativa* es una asterácea de gran importancia gastronómica y nutricional en la ciudad de Huacho, ya que está presente en la mayoría de comidas, debido a que contiene vitaminas A, B1, B2, C y E, así como de minerales.

Es afectada en su mayoría por distintos hongos fitopatógenos que disminuyen su valor nutricional; porque estos tienden a proliferar rápidamente debido a que cuentan con las óptimas condiciones climáticas para su desarrollo, por lo tanto, es importante mantener una producción saludable de lechuga para su consumo.

Por otro lado, también se vienen realizando diversas investigaciones para poder preservar la naranja agria en la ciudad de Huacho, la cual es endémica de la zona; contiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales y anticancerígenas, lo que la hace una especie suma importancia; y, que se halla actualmente en peligro de extinción. Debido a esto, científicos de distintos laboratorios nacionales vienen trabajando en la conservación del germoplasma de esta especie.

Por lo tanto, la presente investigación se centrará en obtener alguna solución en contra de estos hongos fitopatógenos que afectan a la *Lactuca sativa*, a partir de extractos de biomasa celular de naranja agria endémica de la ciudad de Huacho, ya que no existen trabajos relacionados con la lechuga de esta ciudad empleando herramientas biotecnológicas.

Este estudio ofrecerá una alternativa para el control de hongos fitopatógenos y fomentará el interés en la conservación de la naranja agria en Huacho. Además, sentará las bases para futuras investigaciones enfocadas en la preservación de este recurso genético, contribuyendo así al aprovechamiento sostenible y a la protección de la biodiversidad local.

### **1.5. Delimitación del estudio**

Nuestra investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión de la provincia de Huacho, con jefe y responsable del laboratorio la Mg. Hermila Belba Díaz Pillasca, quien nos asesoró durante el desarrollo de toda la investigación. De igual manera, nuestra investigación se ejecutó en dicho ambiente por contar con los equipos y reactivos que nos permitieron aplicar nuestros conocimientos para conseguir nuestros objetivos planteados.

## CAPÍTULO II: MARCO TEORICO

### 2.1 Antecedentes de la investigación

#### 2.1.1. Investigaciones Internacionales

Uno de los grandes problemas que perjudican a los agricultores de lechuga en la ciudad de Huacho, es la pérdida de sus cultivos ocasionados por distintos hongos fitopatógenos los cuales aumentan los costos de producción, entre los más conocidos tenemos a *Botrytis sp.* y *Fusarium sp.* Al respecto, existen investigaciones basadas en el uso <de herramientas biotecnológicas, para controlar hongos fitopatógenos empleando extractos alcohólicos de diversas especies florísticas; no obstante, ninguno de ellos aborda el tema propuesto en este trabajo.

Iglesias et al. (2017) llevaron a cabo un estudio para evaluar la actividad antifúngica “in vitro” de extractos de hojas de *Citrus spp.* sobre el hongo *Sclerotium solani*. La extracción de los compuestos se realizó mediante ultrasonido, seguida de la cuantificación de fenoles totales. Se determinó la concentración mínima inhibitoria y se evaluó el porcentaje de inhibición tanto del crecimiento micelial como del desarrollo de los brotes de conidios en cada extracto. Los resultados mostraron que todos los extractos contenían más de 36 mg de fenoles totales por mililitro, expresados en ácido gálico. Excepto el extracto de *Citrus x aurantium L.* en etanol, el resto logró una inhibición total (100%) del crecimiento micelial. Sin embargo, solo los extractos de *Citrus x aurantium var. Sinensis* en etanol y *Citrus reticulata* en metanol inhibieron completamente la germinación de conidios, con una eficacia similar al fungicida comercial Tebuconazol. Estos resultados indicaron que dichos extractos podrían ser una alternativa viable para el control agroecológico de este patógeno.

Sánchez y Alvarenga (2015) describieron a *Uncaria tomentosa* como una planta medicinal originaria de Perú, reconocida por sus propiedades antiinflamatorias, inmunoestimulantes, antioxidantes y citotóxicas en diversas líneas celulares cancerígenas, incluyendo HL-60, A549 y HEP-3. Para aislar y estudiar sus compuestos activos, desarrollaron estrategias biotecnológicas y estandarizaron protocolos para la inducción de callos y el establecimiento de cultivos en suspensión celular. En su investigación, aplicaron dos protocolos de inducción de callo utilizando secciones

foliares de plantas cultivadas in vitro. Posteriormente, establecieron cultivos celulares en suspensión y evaluaron las cinéticas de crecimiento en ambas etapas. Determinaron que el medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1 mg/L de ácido 3-indolbutírico (AIB), fue el más efectivo para inducir callos, ya que promovió una mayor producción de biomasa y generó callos friables, adecuados para el cultivo en suspensión. En esta última etapa, emplearon el mismo medio de cultivo. Finalmente, observaron dos tipos predominantes de estructuras celulares en los callos y suspensiones, con características variables según la fase del cultivo.

Chávez et al. (2011) investigaron diferentes métodos de desinfección de yemas apicales de limón criollo (*Citrus limon*) para su establecimiento in vitro. Evaluaron combinaciones de hipoclorito de sodio al 1,0 % durante 20 minutos, bicloruro de mercurio al 0,1 % por 10 minutos y sulfato de cobre al 2,0 % durante una hora. Además, analizaron el efecto de distintas concentraciones de picloram (0,0; 0,02; 0,05 y 0,1 mg/L) y 2,4-D (0,0; 0,1; 0,5 y 1,0 mg/L) sobre la callogénesis y organogénesis a partir de cotiledones. Los resultados indicaron que picloram indujo la formación de callos en el 100 % de los casos, sin importar la concentración. Por su parte, la aplicación de 0,1 mg/L de 2,4-D permitió la obtención de un 44,4 % de brotes, 33,3 % de hojas y 55,5 % de raíces. Con base en estos datos, concluyeron que bajas concentraciones de 2,4-D, iguales o menores a 0,1 mg/L, fueron óptimas para inducir la organogénesis en cotiledones de limón criollo.

Bernabe et. al. (2021) en su artículo “Establecimiento de un cultivo de suspensión celular de *Eysenhardtia platycarpa*: Cribado fitoquímico de extractos y evaluación de la actividad antifúngica” tuvo como objetivos principales plantear establecer un cultivo de suspensión celular a partir de segmentos internodales de *E. platycarpa* y explorar la actividad biológica de los extractos frente a los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium cepivorum*. Se establecieron callos friables y CSC con 2 mg/L de ácido 1-naftalenoacético más 0,1 mg/L de kinetina. El contenido fenólico total más alto del CSC fue de 15,6 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de peso seco y el contenido total de flavonoides osciló entre 56,2 y 104,1 µg de equivalentes de quercetina (QE)/g de peso seco. El análisis GC-MS mostró que los extractos diclorometánicos de CSC, albura y duramen tienen una elevada cantidad de ácido hexadecanoico (22,3-35,3%) y esteroides (13,5-14,7%). Los extractos metanólicos de hoja mostraron sobre todo azúcares y algunos polioles, principalmente

D- pinitol (74,3%). En comparación con la planta intacta, los extractos diclorometánicos y hexánicos grasos de CSC presentaron porcentajes de inhibición superiores para *Sclerotium cepivorum*: 71,5% y 62,0%, respectivamente. La máxima inhibición para *Rhizoctonia solanise* produjo con extractos de hexano graso de la albura (51,4%). Su estudio sugiere que los extractos de CSC podrían utilizarse como posible alternativa complementaria a los fungicidas sintéticos.

Rodríguez et al. (2017) estudiaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y fracciones obtenidas con n-hexano, acetato de etilo, diclorometano y mezcla agua-etanol a partir de semillas y cáscaras de *Citrus limonia* y *Citrus sinensis*. Evaluaron estos extractos contra fitopatógenos como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamoni* y *Rhizopus oryzae*, analizando el crecimiento micelial, la esporulación y daños micromorfológicos mediante técnicas de densidad óptica y difusión en agar. Mediante cromatografía de capa fina, identificaron metabolitos secundarios, incluyendo flavonoides, alcaloides y limonoides. Los resultados evidenciaron que la actividad antimicrobiana fue dependiente de la concentración, observándose daños en hifas y estructuras reproductivas a concentraciones cercanas a 7 mg/mL. Destacaron que las fracciones diclorometánicas de las cáscaras, especialmente de *C. limonia*, mostraron la mayor actividad antimicrobiana. Estos hallazgos sugirieron que los residuos agroindustriales de cítricos, en particular las cáscaras, podrían constituir una fuente valiosa de metabolitos con potencial para el control de fitopatógenos agrícolas.

### 2.1.2. Investigaciones Nacionales

Sánchez y Alvarenga (2015) describieron a *Uncaria tomentosa* como una planta medicinal originaria de Perú, reconocida por sus propiedades antiinflamatorias, inmunoestimulantes, antioxidantes y citotóxicas en diversas líneas celulares cancerígenas, incluyendo HL-60, A549 y HEp-3. Para investigar y extraer sus compuestos bioactivos, desarrollaron estrategias biotecnológicas y estandarizaron protocolos para la inducción de callos y el establecimiento de cultivos celulares en suspensión. En su estudio, aplicaron dos protocolos de inducción de callo utilizando secciones foliares de plantas cultivadas in vitro. Posteriormente, establecieron cultivos en suspensión y evaluaron las cinéticas de crecimiento en ambas etapas. Determinaron que el medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1 mg/L de ácido 3-indolbutírico (AIB), fue el más adecuado para inducir callos, ya que promovió una mayor producción de biomasa y generó callos friables, ideales para el cultivo en suspensión. En esta última fase, emplearon el mismo medio. Finalmente, observaron dos tipos predominantes de estructuras celulares en callos y suspensiones, con características variables según la etapa del cultivo.

Gómez (2014) evaluó el efecto antifúngico del aceite esencial de cáscara de "naranja" (*Citrus aurantium* L.) contra la cepa de *Fusarium semitectum*, probando concentraciones de aceite al 1%, 2%, 4% y 8%. La evaluación se realizó utilizando las metodologías de Lozina (2005) y Gimferrer (2008), con un control previo. Los resultados mostraron que el aceite esencial a una concentración del 8% presentó la mayor actividad antifúngica en comparación con las demás concentraciones, con un halo de inhibición de 0,61 mm, aunque menor al obtenido con el control utilizado.

Córdova et al. (2014) realizaron un estudio con el objetivo de desarrollar un método eficiente para inducir la formación de callos in vitro a partir de distintos tipos de explantes de *Myrciaria dubia* (*M. dubia*). Utilizaron explantes provenientes de hojas, nudos de ramas cultivadas in vitro y pulpa de frutos recolectados en campo. Previamente a su cultivo, los explantes fueron sometidos a un proceso de desinfección y luego colocados en medio Murashige-Skoog suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), bencilaminopurina

(BAP) y kinetina (Kin). Inicialmente, los explantes se incubaron a  $25\pm 2$  °C en oscuridad durante dos semanas, para posteriormente ser expuestos a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante seis semanas. El tratamiento que contenía 2 mg/L de 2,4-D y 0,1 mg/L de BAP resultó ser el más efectivo, promoviendo la mayor formación de callos en los tres tipos de explantes. Se observó que los callos comenzaron a desarrollarse en los nudos desde la primera semana, en las hojas a partir de la cuarta semana y en la pulpa a la sexta semana. En cuanto a la textura, los callos derivados de hojas y nudos fueron friables, mientras que los de pulpa presentaron una consistencia no friable. Los autores concluyeron que el método fue eficaz para inducir callogénesis in vitro, destacando a los explantes de hojas y obtener callos friables.

Jaime (2015) se propuso evaluar la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* (naranja) frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*. Para ello, extrajo el aceite esencial mediante el método de arrastre por vapor y utilizó doce muestras de uñas infectadas con micosis. Tras aislar e identificar los hongos, la cepa seleccionada fue sembrada en Agar Sabouraud Glucosado y, posteriormente, se aplicaron discos impregnados con diferentes concentraciones del aceite esencial. Los resultados indicaron que las concentraciones del 30% y 50% del aceite esencial superaron significativamente al clotrimazol, demostrando así un notable efecto antifúngico frente a *Trichophyton mentagrophytes*.

Mantilla (2018), en su tesis titulada “Determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* (‘tangelo’) frente a *Staphylococcus aureus* in vitro”, investigó la actividad antibacteriana de este aceite, el cual fue obtenido mediante destilación por arrastre de vapor. Para su estudio, empleó concentraciones del 25%, 50% y 75%, evaluando su efecto sobre *Staphylococcus aureus* a través de la medición de los halos de inhibición formados alrededor de discos impregnados con cada concentración. Mediante la realización de un antibiograma, observó que, después de 48 horas de incubación, la concentración del 25% generó el mayor halo de inhibición, con un promedio de 1,8 mm en los cultivos bacterianos. En cambio, las concentraciones del 50% y 75% evidenciaron una menor actividad antibacteriana, existiendo diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición obtenidos.

## 2.2 Bases Teóricas

### 2.2.1. Lechuga (*Lactuca sativa*)

*Lactuca sativa* es una planta herbácea anual fue descrito por Carlos Linneo y publicados en *Species Plantarum* en 1753, que fue una de las obras más importantes del sigloXVIII, ya que se estableció la nomenclatura binomial, que se utilizó en el futuro para nombrar otras especies (Buenaño, 2019).

No existía un consenso definitivo respecto al centro de origen de la lechuga, aunque se consideraba probable que procediera de Asia Menor. No obstante, algunos autores sostenían que su origen podía encontrarse en Asia Central o en la región del Mediterráneo. Su antigüedad era considerable, como lo evidenciaban vestigios de pinturas rupestres datadas en el año 4,500 a.C., halladas en tumbas egipcias, y ya se conocía como alimento alrededor del 500 a.C. (López, 2007). Se reconocía que la lechuga (*Lactuca sativa* L.) se había originado a partir de la lechuguilla silvestre (*Lactuca serriola* L.), mediante procesos de hibridación con diversas variedades (Casseres, 1966).

El origen de la lechuga data de hace aproximadamente 2,500 años, y tanto los antiguos romanos como los griegos ya estaban familiarizados con ella. Sin embargo, su procedencia sigue siendo incierta, ya que algunos autores sugieren que proviene de la India en Asia Central. Actualmente, existe desacuerdo entre los botánicos, debido a que se considera que la lechuga tiene un segundo antecesor, *Lactuca scariola* L., una especie silvestre que se encuentra en diversas zonas templadas. Se indica que las variedades cultivadas en la actualidad son resultado de hibridaciones entre especies diferentes. En América, su cultivo comenzó en Haití en 1565 (Delgado, 2016).

En el Perú, la lechuga es de gran relevancia en la Costa Central, ya que las condiciones de esta zona son ideales para su cultivo. Es una de las hortalizas más populares y utilizadas en el país, ya que se incorpora en una amplia variedad de platos (Florindez, 2016).

Según la clasificación filogenética de las angiospermas, *Lactuca sativa* tiene la siguiente categorización taxonómica: (APG IV, 2016):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Lactuca*

Especie: *Lactuca sativa*

La lechuga incluye entre 23,000 y 30,000 especies, y se considera una de las familias de plantas más grandes debido a su amplia variedad de colores, texturas y formas. Las variedades de lechuga (*Lactuca sativa*) se han clasificado en seis tipos principales en función de la morfología de su tallo y la forma de su cabeza. Entre estas, se encuentran la lechuga crujiente (*var. capitata L. nidus jaggeri Helm*), caracterizada por sus hojas gruesas y crujientes; la lechuga mantecosa (*var. capitata L. nidus tenerrima Helm*), que destaca por su textura suave y sabor delicado; la lechuga romana o cos (*var. longifolia Lam., var. romana Hort*), con hojas alargadas y firmes; la lechuga de hoja o cortada (*var. acephala Alef., sin. var. secalina Alef., sin. var. crispa L.*), que no forma una cabeza compacta y permite cosechas continuas; la lechuga de tallo (*var. angustana Irish ex Bremer, sin. var. asparagina Bailey, sin. L. angustana Hort. In Vilm.*), apreciada por su tallo comestible y su uso en la cocina asiática; y la lechuga latina, una variedad menos común, pero con características intermedias entre la romana y la mantecosa (Kim et al., 2016).

Para esta investigación, se trabajará con tres variedades específicas de *Lactuca sativa*: *var. Capitata*, conocida por su forma redonda y compacta, que la hace ideal para ensaladas y sándwiches; *var. Crispa*, de hojas rizadas y sueltas, ampliamente utilizada en mezclas de hojas verdes; y *var. Butterhead*, con una textura tierna y mantecosa que la convierte en una de las variedades más apreciadas en la gastronomía. Estas variedades han sido seleccionadas debido a su relevancia comercial, su adaptabilidad a distintas condiciones de cultivo y su alto contenido en compuestos bioactivos beneficiosos para la salud.

Además de su diversidad morfológica, las lechugas presentan una amplia gama de perfiles nutricionales, aportando vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes. En este estudio, se evaluarán características agronómicas y propiedades funcionales de estas tres variedades, con el objetivo de contribuir al conocimiento sobre su cultivo y sus beneficios para la alimentación humana.

### **2.2.2. Descripción botánica de la lechuga (*Latuca sativa*)**

La lechuga posee un rizoma pivotante con muchas ramificaciones laterales, aunque su profundidad no supera los 25 cm. Sus hojas se disponen en una roseta y, dependiendo de la variedad, pueden permanecer extendidas o cerrarse posteriormente. El color de las hojas varía entre verde amarillento y morado claro, según la variedad. Los bordes de las hojas pueden ser lisos, ondulados o aserrados. El tallo es corto, cilíndrico y sin ramificaciones, y presenta inflorescencias con flores amarillas agrupadas en racimos o corimbos. Las semillas tienen un vilano plumoso. (Manrique y Roldan, 2013)

### **2.2.3. Importancia de *Lactuca sativa***

La lechuga (*Lactuca sativa*) es una hortaliza ampliamente consumida a nivel mundial, con una producción anual promedio que alcanza los 17 millones de toneladas. Su consumo es clave para la salud humana, ya que posee una gran cantidad de propiedades nutricionales. Es una fuente importante en vitaminas del complejo B, como B1, B2, B9 y B3, así como en vitaminas A, C y E.

La lechuga posee un rizoma pivotante con muchas ramificaciones laterales, aunque su profundidad no supera los 25 cm. Sus hojas se disponen en una roseta y, dependiendo de la variedad, pueden permanecer extendidas o cerrarse posteriormente. El color de las hojas varía entre verde amarillento y morado claro, según la variedad. Los bordes de las hojas pueden ser lisos, ondulados o aserrados. El tallo es corto, cilíndrico y sin ramificaciones, y presenta inflorescencias con flores amarillas agrupadas en racimos o corimbos. Las semillas tienen un vilano plumoso. (Muñoz, 2017; León y Torres, 2020).

#### 2.2.4. Problemas que afectan a la *Lactuca sativa*

Las enfermedades que aquejan a la lechuga durante su cultivo y en la mayoría de las hortalizas de ciclo corto, son los hongos fitopatógenos, esto se debe a que las condiciones climáticas donde se desarrolla el cultivo, también son las favorables para la aparición y proliferación de estos patógenos. En nuestra tesis estudiaremos a *Botrytis cinerea* este hongo fitopatógeno dañan los cultivos de la *Lactuca sativa*.

#### 2.2.5. *Botrytis* sp.

El género del hongo *Botrytis* fue descrito por Micheli en 1729. A comienzos del siglo XIX, Persoon incluyó cinco especies dentro de este género, y en 1793 Hennebert lo redefinió, incorporando 22 especies, cada una con diferentes denominaciones para sus formas anamórfica y teleomórfica (Cáceres, 2020; López, 2019).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Leotiomycetes

Orden: Heliales

Familia: Sclerotiniacea

Género: *Botrytis*

Fuente: Garcés y Orozco, 2004

Dentro del género encontramos a *Botrytis cinerea* agente causal de la “podredumbre gris”, que genera importantes pérdidas monetarios pre y post-recolección. Este patógeno puede arremeter al cultivo en cualquier estadio de desarrollo y a la vez puede infectar cualquier porción de la planta; infecta a más de 200 especies vegetales distintas, las más comunes en infectarse son los cultivos de vid, tomate, fresa y ornamentales, este patógeno está distribuido por todo el mundo. Es una enfermedad severa, favorecida por los climas muy húmedo y las bajas temperaturas, es una enfermedad que se presenta con machas de apariencia húmeda de color. (Pucuna, 2020) (Benito, 2019)

Los primeros síntomas aparecen en las hojas más viejas, donde se pueden ver manchas irregulares y húmedas con una capa verde-grisácea y pulverulenta, lo que provoca el amarillamiento y, eventualmente, el desecamiento de las hojas y tallos. En condiciones de gran humedad, las cabezas de la lechuga se encubren rápidamente con un micelio blanquecino, sobre el cual se forman cuerpos negros, duros e irregulares, que se encuentran incrustados en los tejidos descompuestos; estos son las esclerocios del hongo, estructuras que sirven para la conservación del patógeno. Además, este hongo causa chupadura y muerte en las plántulas (INIA, 2001).



Referencia: Foto tomada de la guía “Lechuga en invernadero” de Baffoni, 2018.

#### 2.2.6. *Fusarium* sp.

El género se describió por primera vez en 1809 por Link y validado por Fries en 1821. Según el *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*, se han descrito 178 especies dentro de este género, aunque Aoki et al. (2014) afirman que *Fusarium* abarca unas 300 especies filogenéticamente diferentes, las cuales han sido identificadas mediante filogenia molecular, aunque muchas aún no han sido completamente descritas.

Este género de hongos filamentosos tiene una distribución global por su gran capacidad para desarrollarse en amplias variedades de sustratos y su eficiente mecanismo de dispersión. Diversas especies del género *Fusarium* causan enfermedades en una gran cantidad de plantas, provocando importantes pérdidas económicas, ya que los daños que generan en las plantas suelen ser irreversibles. Entre las especies más relevantes se encuentran *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticilloides*.

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Fuente: Roskov et al., 2016

### 2.2.7. *Citrus x aurantium* (Naranja Agria)

La palabra cítrico deriva del latín citrus. Carlos Linneo le otorgo el nombre científico *Citrus x aurantium* a la naranja agria en 1753 en su publicación *Species Plantarum*, que fue una de las obras más importantes del siglo XVIII, ya que se estableció la nomenclatura binomial, que se utilizó en el futuro para nombrar otras especies. (Buenaño, 2019)

En la actualidad, la naranja agria (*C. aurantium L.*) se cultiva en más de un centenar de países con climas tropicales y subtropicales, alcanzando una producción mundial promedio de 124 millones de toneladas al año. Sin embargo, el origen de esta fruta es poco conocido, aunque se cree que probablemente proviene del noreste de India y el sudeste asiático.

La información que se tiene de cómo fue su distribución desde su punto de origen, data que desde Asia fueron llevados al norte de África y al sudeste de Europa. Los europeos posteriormente introdujeron la especie en América, alrededor de 1500. (Fabiani et. al., 1996)

La producción de los cítricos es abundante en el mundo, pero se sabe que el Perú comprende el 1% del mercado mundial en cítricos y naranjas, aunque ha tenido un notable crecimiento durante la última década.

Al igual que en el resto de América, los españoles introdujeron los primeros cítricos en Perú en 1609. Gradualmente, su cultivo se extendió por

todo el país, comenzando en la Costa, luego en algunos valles de la sierra y finalmente en el área de la selva. Actualmente, Perú produce un millón de toneladas de cítricos cada año (Jaime, 2015; Pérez, 2020).

De acuerdo con la clasificación filogenética de las angiospermas, el *Citrus x aurantium* se clasifica de la siguiente manera según el sistema APG IV (2016):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: Citrus L.

Especie: *Citrus x aurantium*

#### 2.2.8. Descripción botánica de la naranja agria (*Citrus x aurantium*)

La naranja agria, *Citrus x aurantium*, pertenece a la familia Rutaceae. Estos árboles del género alcanzan entre 3 y 10 metros de altura, con un tronco mediano y robusto. Sus ramas son regulares y los tallos flexibles, con entrenudos de 5 a 7 cm, cada uno limitado por una hoja en sus extremos. En la axila de las hojas se localizan varias yemas y espinas de tamaño moderado.

Las hojas son de forma lanceolada, de tamaño moderado, con una base ancha y convexa, y un peciolo alado que se conecta de manera ajustada tanto al tallo como al limbo. Las flores, que son hermafroditas, se agrupan en racimos o aparecen solas en las axilas de las hojas. Su diámetro es de 3 a 4 cm, con cinco pétalos blancos separados y 24 estambres; solo entre el 5% y el 12% de las flores son masculinas (Estrada, 2015).

El fruto es carnoso, con forma de baya o redonda, de aproximadamente 7-8 cm de diámetro. Su capa exterior es rugosa y de un color naranja brillante cuando está

maduro. Además, posee glándulas que contienen un líquido aromático. En su interior, se encuentran varios gajos carnosos, cubiertos por una membrana fina, con un sabor amargo y ácido, y contiene varias semillas de forma pear-shaped u ovalada (Gómez, 2014).

#### **2.2.8. Eficacia antifúngica de (*Citrus x aurantium*)**

Las plantas están compuestas por una amplia variedad de sustancias y nutrientes, lo que las convierte en una fuente de alimento para muchos organismos. A lo largo de la evolución, esto las ha llevado a implementar diversos mecanismos de protección, no solo frente a agentes bióticos, sino también contra factores abióticos que puedan generar adversidades para su crecimiento. Estos mecanismos están organizados de manera jerárquica y vinculada.

Estos mecanismos de defensa se dividen en dos categorías: defensas constitutivas e inducidas, que pueden ser tanto físicas como químicas, según su naturaleza. Investigaciones han demostrado que la naranja agria posee actividad antifúngica frente a ciertos mohos, como *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* (Gómez, 2014).

#### **2.2.9. Fitoalexinas**

Las fitoalexinas se definieron como mecanismos defensivos utilizados por las plantas para protegerse. El término fue acuñado hace aproximadamente 70 años por Müller y Borger para referirse a sustancias antimicrobianas. Se demostraron evidencias claras mediante experimentos con *Solanum tuberosum*, donde al exponer la planta al hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans*, se produjo compuestos fungicidas que inhibían el crecimiento del hongo. Asimismo, se descubrió que los cítricos generaban una fitoalexina llamada escoparona, inducida por patógenos como *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* y *Phytophthora citrophthora*. (Ramírez, 2018).

### **2.2.10. El cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos es una técnica que implica aislar una parte de la planta, llamada explante, que puede ser una yema, célula, tejido u órgano. Este procedimiento se realiza en condiciones químicas y físicas controladas para que las células manifiesten su potencial, ya sea natural o inducido. Es esencial que el desarrollo ocurra en un ambiente estéril para prevenir contaminaciones microbianas. La totipotencia celular, la capacidad de las células para generar una planta completa, es la base de la multiplicación in vitro. (Delgado, 2004; Vargas, 2014).

## **2.3 Definiciones Conceptuales**

### **Hongos fitopatógenos**

Los hongos son organismos eucariotas, que pueden ser unicelulares o multicelulares, y crecen en ambientes húmedos con poca luz. Las células de los hongos multicelulares se agrupan en estructuras filamentosas conocidas como hifas, las cuales, al unirse, forman lo que se denomina micelio. (Agrios, 2005)

### **Cultivo de yemas axilares in vitro**

El cultivo de yemas axilares in vitro consiste en la multiplicación de yemas preformadas, sin que se forme callo en el proceso. Este tipo de cultivo implica la inducción de tejido meristemático en una ubicación específica mediante el uso de reguladores de crecimiento, lo que promueve la diferenciación del primordio y el desarrollo del brote. (Vargas, 2014)

### **Callogénesis**

La callogénesis es un proceso que facilita la formación de embriones somáticos, caracterizados por una textura granulada y desmenuzable, con colores cremosos o verde amarillento. Estos embriones se desarrollan en un medio semisólido que contiene carbohidratos, minerales, vitaminas y aminoácidos, además de reguladores de crecimiento vegetal. Estos reguladores modifican su forma, lo que permite la propagación masiva de la planta. (Matos, 2022)

## **Cultivo de células en suspensión**

Las suspensiones celulares consisten en un conjunto de células indiferenciadas, ya sea libres o agrupadas, distribuidas en un medio de cultivo líquido homogéneo que está en constante agitación, y se utilizan para mantener y propagar células vegetales. La agitación se lleva a cabo con agitadores orbitales para facilitar la dispersión celular y mejorar el intercambio de gases. Las velocidades de agitación varían entre 30 y 150 revoluciones por minuto (rpm), según la especie vegetal y el volumen de operación. (Sánchez, 2019)

## **Auxinas**

Las auxinas son hormonas vegetales naturales que regulan diversos procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. La auxina principal es el ácido indolacético (IAA), conocido por su alta actividad biológica y presente en concentraciones nanomolares. Además del IAA, existen otras auxinas naturales como el ácido 4-cloro-indolacético (4-ClIAA), el ácido fenilacético (PAA), el ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA), que también desempeñan funciones importantes en las plantas. (Ludwig-Müller & Cohen, 2002)

## **Antibiograma**

El propósito del antibiograma es evaluar la sensibilidad de una cepa bacteriana o de un hongo fitopatógeno frente a uno o varios antibióticos o antifúngicos. Por lo tanto, la sensibilidad in vitro es un requisito esencial para determinar la efectividad in vivo de un tratamiento específico. (Cuesta, 2012)

## **2.4 Hipótesis de investigación**

### **2.4.1. Hipótesis General**

El extracto alcohólico de biomasa celular de naranja agria (*Citrus x aurantium*) tiene capacidad antifúngica sobre los hongos fitopatógenos *Botrytis* sp. y *Fusarium* sp. de *Lactuca sativa*.

#### 2.4.2. Hipótesis Específicas

- El tratamiento óptimo inducirá la formación de callos a partir de hojas de naranja agria.
  
- El mejor tratamiento permitirá tener un óptimo crecimiento de la suspensión celular a partir de callos de naranja agria.
  
- Al menos uno de los tratamientos tendrá efecto sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos; *Botrytis* sp. y *Fusarium* sp. de la lechuga.

### 2.4.3. Variables en operacionalización

**Tabla 1.** Variables en operacionalización; dimensiones, indicadores y escala de dimensión

Variables	Dimensiones	Indicadores	Escala de dimensión
<ul style="list-style-type: none"> <li>Variable independiente: extracto alcohólico de biomasa celular de naranja agria</li> </ul>	Extracto alcohólico de naranja agria	Porcentaje de extracto por volumen de alcohol	%
	biomasa celular de naranja agria	Germinación de las yemas axilares	%
	-Estadio de las plántulas in vitro de naranja agria	Etapa de desarrollo de las plántulas	Ordinal
	-Tratamientos para la inducción de callos	Número de callos friables por tratamiento	%
<ul style="list-style-type: none"> <li>Variable dependiente: hongos fitopatógenos <i>Botrytis cinérea</i>, <i>Fusarium oxysporum</i>, de <i>Lactuca sativa</i></li> </ul>	Tratamientos de control	Halo de inhibición de crecimiento del hongo en agua destilada, etanol 96%, extracto alcohólico de biomasa celular y antifúngico comercial	%
	Tratamientos de concentración de extracto alcohólico de naranja agria	Halo de inhibición de crecimiento del hongo según concentración del extracto (100%, 75%, 50% y 25 %)	%

## **CAPÍTULO III: METODOLOGIA**

### **3.1. Diseño metodológico**

#### **3.1.1. Tipo de investigación**

La presente investigación de tesis será de tipo básica, debido a la generación de extractos de biomasa celular a partir de plántulas in vitro, las cuales se podrán emplear en futuras investigaciones que se relacionen con el control de diferentes hongos y/o bacterias patógenas que afecten a distintos organismos.

#### **3.1.2. Nivel de investigación**

La tesis por desarrollar será de nivel explicativa, de manera que estará enfocada en encontrar el mejor tratamiento empleando extracto de biomasa celular a partir de plántulas in vitro de naranja agria, para lograr controlar los daños ocasionados por los hongos fitopatógenos que aquejan a la lechuga.

#### **3.1.3. Diseño de la investigación**

La investigación de tesis utilizará un diseño experimental y herramientas biotecnológicas para identificar los tratamientos óptimos para inducir callos en plántulas in vitro de naranja agria y controlar hongos fitopatógenos que afectan la lechuga mediante extractos de biomasa celular

#### **3.1.4. Enfoque de la investigación**

La tesis por desarrollar será de planteamiento cuantitativa, ya que primordialmente para este procedimiento se emplearán instrumentos matemáticos que serán evaluadas mediante herramientas estadísticas, que tendrán en consideración la causa y efecto de la variable independiente respecto a la variante dependiente.

## **3.2. Población y muestra**

### **3.2.1. Población**

La población usada para este experimento estará conformada por plántulas in vitro de naranja agria, las cuales fueron obtenidas de plantas cultivadas en el biohuerto de la Escuela de Biología con especialización en biotecnología de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, ubicada en la ciudad de Huacho, además de los callos formados a partir de las hojas de estas plántulas in vitro.

### **3.2.2. Muestra**

La muestra estuvo definida por los segmentos foliares de naranja agria que se emplearán para la formación de callos que permitirán trabajar en las suspensiones celulares.

## **3.3. Técnicas de recolección de datos**

### **3.3.1. Técnicas a emplear**

#### **3.3.1.1. Material biológico**

Se emplearán inicialmente yemas axilares obtenidas del biohuerto de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión de la de la ciudad de Huacho. Luego se trasladarán a las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho.

#### **3.3.1.2. Desinfección de yemas axilares**

Las yemas axilares de naranja agria fueron obtenidas del biohuerto y fueron colocadas en un frasco con agua corriente para ser transferidas al laboratorio, y luego se realizó la desinfección. Luego de ser trasladada en agua corriente se procedió a sumergirlas en alcohol al 70% durante un minuto, posteriormente fueron inmersas en hipoclorito de sodio al 1% durante 10 min. en continua agitación, por último, se hicieron tres enjuagues con agua estéril por 5 min. cada uno.

### **3.3.1.3. Obtención de plántulas in vitro de naranja agria**

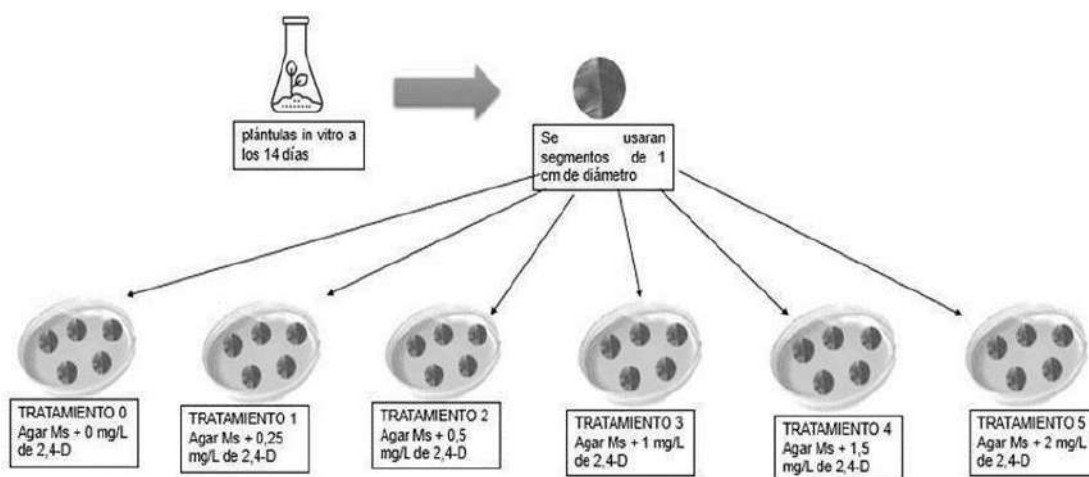
Tras la desinfección, las yemas axilares se cortaron en segmentos de aproximadamente 1.5 cm. Estos explantes se colocaron en frascos con medio de cultivo MS al 100% de concentración, suplementado con 20 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar, ajustado a un pH de 5.7. Posteriormente, los frascos se ubicaron en una cámara de crecimiento, donde se mantuvieron a 26°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 30 días.

### 3.3.1.4. Obtención de callos

Luego de la obtención de plántulas *in vitro*, se colectaron hojas y fueron diseccionadas en pequeños segmentos (1cm. aprox.) los cuales se sembraron en placas con diferentes tratamientos con 2, 4-D (Tabla 1), por cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones (Figura 2). Se incubaron por 30 días a una temperatura de 26° C en ausencia de luz.

**Tabla 2.** Tratamiento para la inducción de callos.

Tratamiento	Medio de cultivo
T0	MS + 0.00 mg/L 2,4-D
T1	MS + 0.25 mg/L 2,4-D
T2	MS + 0.50 mg/L 2,4-D
T3	MS + 1.00 mg/L 2,4-D
T4	MS + 1.50 mg/L 2,4-D
T5	MS + 2.00 mg/L 2,4-D



**Figura 1.** Diseño experimental de la estimulación de callos de naranja agria.



### **3.3.1.5. Suspensión celular**

Una vez elegido el mejor tratamiento para la inducción de callos, se procedió a realizar la suspensión celular de la siguiente manera:

Se incubaron 2 matraces que contenían 1gr. de callos y 25 ml de medio de cultivo líquido MS, suplementado con sacarosa al 30 g/L, posteriormente se colocaron en un agitador orbital rotatorio a 110 rpm y se incubaron a temperatura ambiente, los matracesse mantuvieron cubiertos con papel aluminio por un periodo de 30 días, en los cuales se realizó el cambio de medio en los primeros 15 días.

Se realizó la evaluación del peso inicial con el final luego de los 30 días, para evidenciar crecimiento de la biomasa.

### **3.3.1.6. Preparación del Extracto Antifúngico de Biomasa Celular**

Al obtener la biomasa luego del periodo de incubación se lavó 3 veces con agua estéril para proceder a secarla, una vez lavada se colocó en una estufa a 55 °C durante 48 h para realizar el secado y posteriormente pulverizarlo, se disolvió 3 g de la biomasa obtenida en 20 ml de etanol de 96°, y se dejó a temperatura ambiente durante 48h.

Luego se filtró con papel N° 4, se secó a 40 °C por 18h, para activarlo al momento de la prueba de antibiograma se disolvió 1g el extracto concentrado en 1 ml de etanol 70° y se mantienen en envases oscuros, mientras que para el segundo extracto se utilizó2gr del extracto concentrado con 1ml de etanol 70°.

### **3.3.1.7. Identificación y Replicación de hongos fitopatógenos**

Se llevó a cabo la identificación del género del hongo a partir de las muestras aisladas, utilizando tinciones con azul de lactofenol, y observando las características macroscópicas de las colonias y la esporulación.

Una vez identificado el hongo, se procedió a la resiembra de las colonias fúngicas que estaban claramente diferenciadas y suficientemente separadas entre sí. Estas colonias se aislaron mediante resiembra en medio PDA y se incubaron durante 3 días a 28°C.

### 3.3.1.8. Prueba de antibiograma

Se agregó una solución salina al 8% a los tubos que contenían el hongo inoculado, se evaluó que el inóculo tenga una turbidez de 0,5 según la escala de Mcfarland (1907), posteriormente se inoculó en agar sabouraud con un hisopo estéril. Cada disco de papel filtro 6 mm se le agregó 25 µL de cada tratamiento (Tabla 4), y se realizaron 5 repeticiones por tratamiento. Se incubaron los medios de cultivo en estudio por 48 horas a 37°C

Tratamientos	Composición
T1	Control con agua estéril
T2	Control con etanol 70 °
T3	Antifúngico comercial
T4	Suspensión de callos (1g) + etanol 70° (1ml)
T5	Suspensión de callos (2g) + etanol 70° (1ml)

**Tabla 4.** Tratamientos que se aplicaran en el antibiograma.

### 3.4. Técnicas para el procesamiento de la información

Se utilizó un diseño al azar (DCA) para los tratamientos de inducción de callos y de extracto de biomasa celular (antifúngico).

Cada tratamiento contó con 10 repeticiones. Para la inducción de callos, la unidad experimental consistió en una placa Petri con cinco segmentos de hojas de naranja agria. En el caso de la evaluación del extracto de biomasa celular, la unidad experimental fue una placa Petri con cinco discos que contenían dicho extracto.

Se utilizarán los siguientes modelos estadísticos:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ : Es el comportamiento que se observó en la unidad experimental, con el  $i$ -ésimo tratamiento con la  $j$ -ésima repetición.

$\beta_j$ : Efecto del  $j$ -ésimo tratamiento

$\mu$ : Efecto de la media general.

$\alpha_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$\epsilon_{ijk}$ : Efecto del error experimental.

Los datos fueron analizados utilizando los paquetes estadísticos *agricolae* y *car* en la interfaz gráfica RStudio (versión 1.4.1103) del software libre R (versión 4.2.1). Se efectuó un Análisis de Varianza (ANVA) para identificar el tratamiento que indujo el mayor número de callos y el tratamiento con la mayor efectividad del extracto de biomasa celular. Para aquellos resultados que mostraron significancia, se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Análisis de resultados

#### 4.1.1. Formación de callos

Se realizaron 6 tratamientos a base de la hormona 2,4-D + medio MS (Tabla 2). De estos tratamientos se evidenció que el tratamiento más óptimo fueron los tratamientos 4 y 5, los cuales obtuvieron un mayor porcentaje de formación de callos a partir de explantes de naranja agria en condiciones in vitro (Tabla 5).

**Tabla 5.** *Respuesta a los diferentes tratamientos en la formación de callos en explantes de naranja agria en condiciones in vitro.*

Tratamientos Con 2,4-D	Nº Placas	Presencia de callos	Porcentaje de callos	Escala de Formación de Callos (%)			Tiempo de Crecimiento
(mg/L)	Nº	SP/NP	%	1	2	3	Tiempo
0	10	NP	0%	-	-	-	30 días
0,25	10	SP	14%	100%	-	-	30 días
0,5	10	SP	40%	90%	10%	-	30 días
1	10	SP	100%	56%	36%	8%	30 días
1,5	10	SP	78%	27%	62%	11%	30 días
2	10	SP	96%	23%	25%	52%	30 días

Previo al análisis de varianza se confirmó que los datos presentaban normalidad y homogeneidad de varianza (Tabla 6). Estadísticamente se pudo determinar que existe al menos un tratamiento que difiere de los demás mediante el análisis de varianza (Tabla 7).

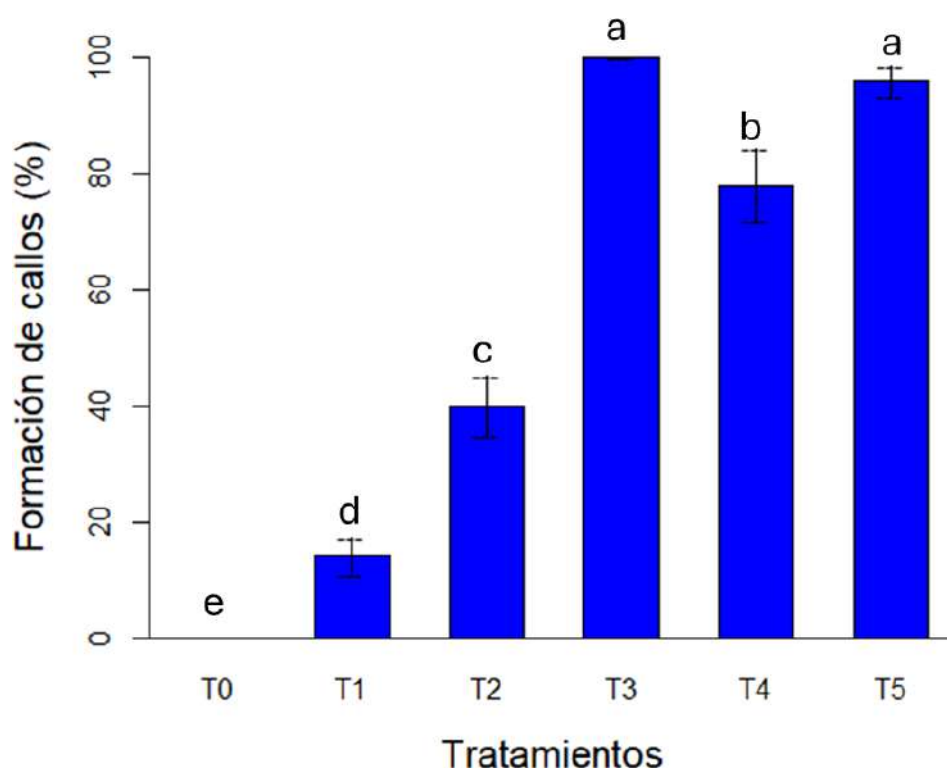
**Tabla 6.** Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de formación de callos en explantes de naranja agria en condiciones in vitro.

Prueba	Test	Alfa	P valor	Estado
Normalidad	Shapiro	0.05	0.0957	Si cumple
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.05	0.1491	Si cumple

**Tabla 7.** Análisis de varianza para porcentaje de formación de callos en explantes de naranja agria en condiciones in vitro.

Fuentes de variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	P valor	Significancia
Tratamiento	5	86993	17399	99.95	< 0.0001	
Error	54	9400	174			
	59	96393				

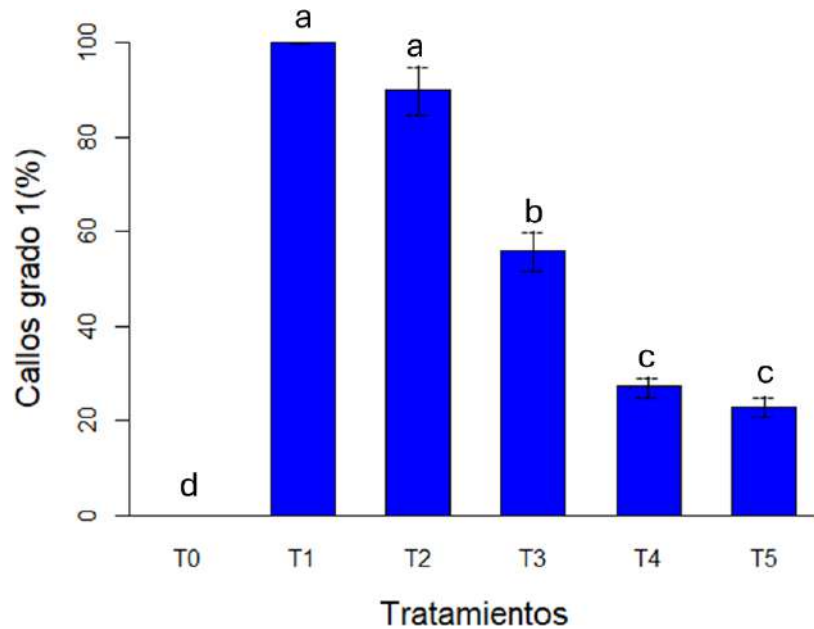
Se evaluó la formación de callos. Los T3 y T5, presentaron un mayor porcentaje de formación de callos, con 100% y 96%, respectivamente (Figura 4), seguidos por los T4, T2y T1, los cuales obtuvieron un menor porcentaje de formación de callos, con un 78%, 40% y 14% respectivamente; y por último el T0 no evidenció formación de callos. Todos los tratamientos fueron evaluados a los 30 días.



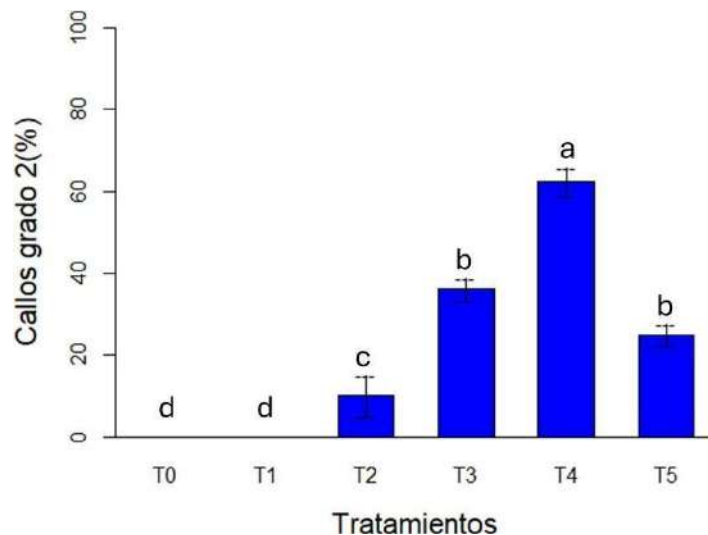
**Figura 4.** Porcentaje de formación de callos en explantes de naranja agria en condiciones in vitro. Las medias con letras diferentes muestran diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

De los tratamientos que presentaron una formación de callos, se evaluó el grado de callos formados en los explantes de naranja agria (Figura 2), teniendo en cuenta para la viabilidad de este trabajo, se busca obtener un mayor porcentaje de callos de grado 3, ya que estos son los óptimos para la suspensión celular. Según los resultados con respecto a la formación de callos grado 1, se pudo evidenciar que el T1 obtuvo 100% de formación (Figura 5), seguido del T2, T3 y T4 con un 67%, 47% y 33%, respectivamente, mientras que el T5 obtuvo menor formación de callos grado 1, con un 20%. En la formación de callos grado 2, se evidenció la mayor formación en el tratamiento T4 con 62% (Figura 6). Y el grado de mayor interés para la presente investigación, el grado 3 en formación de callos, se obtuvo que la mayor formación correspondió al tratamiento T5 con 52%, este tratamiento corresponde al medio de cultivo adicionado con 2 mg/L de 2,4-D. Precisamente este tratamiento (T5), permite obtener el mayor porcentaje de formación de callos (estadísticamente similar al tratamiento T3) y a la vez también permite la mayor formación de callos de grado 3, siendo considerado el tratamiento óptimo para este trabajo y correspondería al medio

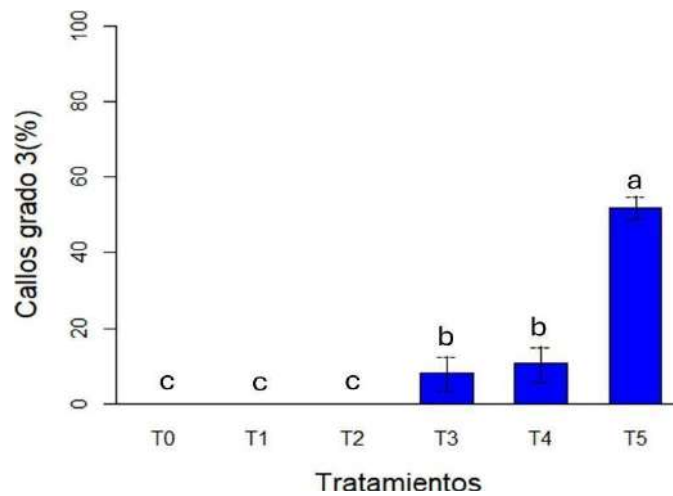
de cultivo a utilizar en siguientes fases de la investigación. A partir de estos resultados se seleccionaron los explantes para la siguiente fase que corresponde a la suspensión celular.



**Figura 5.** Formación de callos de grado 1 en explantes de naranja agria en condiciones in vitro. Las medias con letras diferentes muestran diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Formación de callos de grado 2 en explantes de naranja agria en condiciones in vitro. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 7.** Formación de callos de grado 3 en explantes de naranja agria en condiciones in vitro. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### Comparación del peso de biomasa celular

Se realizó la evaluación inicial y final de la biomasa luego de la suspensión celular que se incubó durante 30 días, mediante el pesaje de la biomasa en una balanza analítica, demostrándose así el incremento de la biomasa.

### MATRAZ #1



## MATRAZ #2

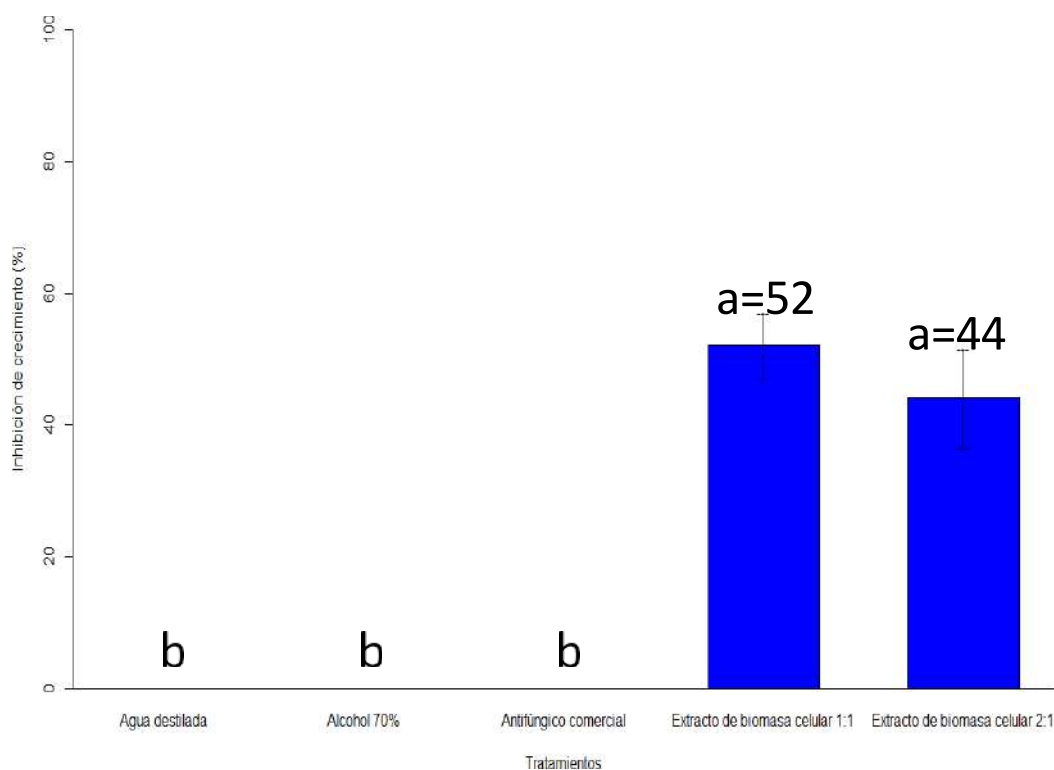


Se observo que luego del proceso de suspensión celular se obtuvo un incremento de masa adicional de 3.0119 gr.

### 4.1.2. Efecto antifúngico

Según los resultados obtenidos a partir de los tratamientos aplicados, se observó que el tratamiento 4 (T4=52%) fue el que presentó una mayor actividad inhibitoria, seguido por el tratamiento 5 (T5=44%), en contra del hongo fitopatógeno *Botrytis sp.*

**Figura 7.** Respuesta de la inhibición del crecimiento de *Botrytis sp.* a diferentes tratamientos. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey( $p < 0.05$ )



**Tabla 8.** Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para inhibición del crecimiento de *Botrytis sp.*

Prueba	Test	Alfa	P valor	Estado
Normalidad	Shapiro	0.05	0.1265	Si cumple
Homogeneidad de varianza	Levene	0.05	0.4307	Si cumple

**Tabla 9.** Análisis de varianza para porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis sp.*

Fuentes de variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	P valor	Significancia
Tratamiento	4	13984	3496	43.7	< 0.0001	***
Error	20	1600	80			
	24	15584				

\*\*\* = Altamente significativo

P valor es menor que Alfa (0.05). Por lo tanto, existe diferencia significativa entre tratamientos.

De acuerdo a las evaluaciones realizadas con los distintos tratamientos, se evidenció que el tratamiento 5 (T5=68%) obtuvo una mayor respuesta antifúngica, seguido por los tratamientos 2, 4, 3, respectivamente, (T2=52%, T4=36%, T3=32%), en contra del hongo fitopatógeno *fusarium sp.*

**Tabla 10.** Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para inhibición del crecimiento de *Fusarium sp.*

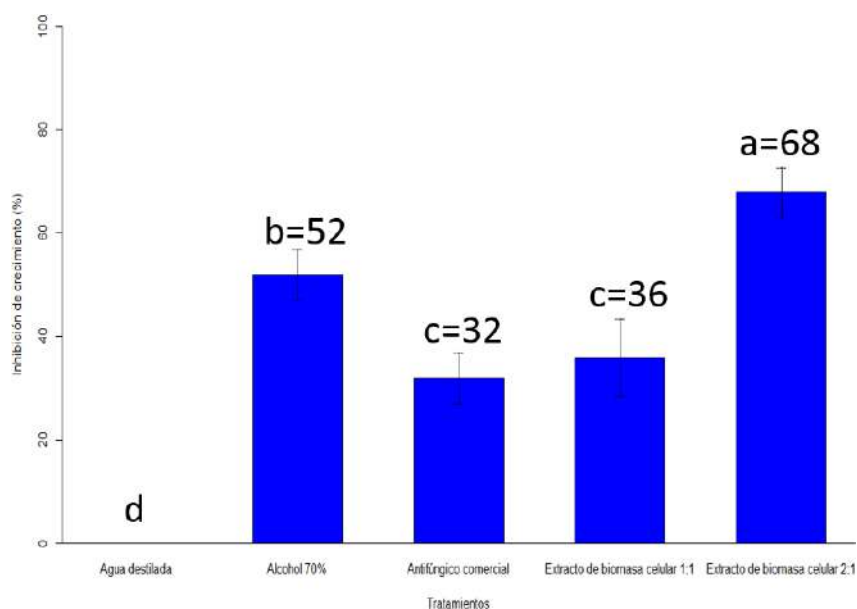
Prueba	Test	Alfa	P valor	Estado
Normalidad	Shapiro	0.05	0.1265	Si cumple
Homogeneidad de varianza	Levene	0.05	0.4307	Si cumple

**Tabla 11.** Análisis de varianza para porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium sp.*

Fuentes de variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	P valor	Significancia
Tratamiento	4	12896	3224	25.19	< 0.0001	***
Error	20	2560	128			
	24	15456				

\*\*\* = Altamente significativo

P valor es menor que Alpha (0.05). Por lo tanto, existe diferencia significativa entre tratamientos.



**Figura 11.** Respuesta de la inhibición del crecimiento de *Fusarium sp.* a diferentes tratamientos. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## CAPÍTULO V: DISCUSION

### 5.1. Discusión de resultados

En esta investigación se emplearon extractos de biomasa celular de *Citrus x aurantium* debido a que el género *Citrus* es uno de los que poseen altas concentraciones de metabolitos con actividad antifúngica y antimicrobiana (Iglesias et al., 2017).

En primera instancia, con respecto a la formación de callos en esta investigación se evidenció que las concentraciones del 0,25 – 2 mg/L de la hormona 2,4-D se logró una formación de callos, siendo el T3 y T5 que es 1 y 2mg/L respectivamente, fueron los que lograron obtener el 100% de formación. Estos resultados se pueden comparar con la investigación hecha por Solís et al. (2013) en el cual demostraron que la inducción de callos fue del 100% en explantes de ambas especies de *J. curcas* y *J. gossypifolia* a los 30 días de la aplicación de los tratamientos con concentraciones de 0,5 - 2,5 mg/L de 2,4-D.

Los mejores tratamientos fueron los T3 y T5 los cuales estaban suplementados con 1 mg/L y 2 mg/L de la hormona 2,4-D respectivamente, nuestros resultados concuerdan con la investigación realizada por Sánchez y Alvarenga (2015) que obtuvieron como mejores tratamientos 2 mg/L y 1 mg/L de la hormona 2,4-D para la inducción de callogénesis de *Uncaria tomentosa*, estos tratamientos les permitió obtener mayor cantidad de callos friables.

Según Chávez et al. (2011) en su investigación titulada “Propagación in vitro del limón criollo *Citrus limon*”, con el uso de dos reguladores de crecimiento, podemos evidenciar que con el uso de 0,1 mg/L -1 de 2,4-D logró formar callos friables de color amarillo crema los 15 días, lo que es comparable con nuestra investigación ya que nuestros callos friables evidenciaron una coloración similar, sin embargo, este resultado se evidenció a los 30 días.

De manera similar, nuestros resultados pueden compararse con los obtenidos por Córdova et al. (2014) en su estudio titulado "Un método para la inducción de callos in vitro de *Myrciaria dubia* (Kunth) MC Daugh 'Camu camu'", cuyo objetivo fue incitar la formación de callos in vitro de *M. dubia* (Camu camu) utilizando las hormonas 2,4-D,

BAP y KIN. En su investigación, el mejor resultado se logró con una concentración de 2 mg/L de 2,4-D y 0,1 mg/L de BAP, lo que resultó en una mayor formación de callos en un período de 6 semanas. Estos hallazgos respaldan nuestros propios resultados, donde conseguimos casi un 100% de formación de callos con 2 mg/L de 2,4-D en un lapso de 4 semanas.

Según nuestros resultados obtenidos con el T5 que contenía 2 mg/L de 2,4-D no obtuvimos abundante biomasa, lo cual es comparable con la investigación de Bernabe et al. (2021), "Establecimiento de un cultivo de suspensión celular de *Eysenhardtia platycarpa*: cribado fitoquímico de extractos y evaluación de la actividad antifúngica", en la que emplean 2 tratamientos; T1 NAA 2mg/L + KIN 0,1mg/L, T2 2,4-D 2mg/L + KIN 0,1mg/L, en el cual, luego de 2 semanas evidenciaron que el T2 con 2mg/L + KIN 0,1mg/L mostró un crecimiento pobre en comparación con el T1.

De acuerdo a la investigación realizada por Orozco et al. (2002) titulada "Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea*", obtuvo un activo crecimiento en su suspensión celular debido a que utilizó los tratamientos con 3mg/L de 2,4-D + 1mg/L BAP y 6mg/L de 2,4D + 1mg/L, lo cual difiere de nuestra investigación ya que nosotros no obtuvimos un activo crecimiento celular, lo que se podría deber a la cantidad de hormona y suplementos empleados.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante el antibiograma en esta investigación, se evidenció que los discos impregnados con extractos etanólicos de callos en suspensión celular de *Citrus x aurantium* mostraron un efecto inhibitorio contra *Fusarium sp.* a las concentraciones de 2:1 (T5) y alcohol al 70% (T2). Además, las concentraciones 1:1 (T4) y 2:1 (T5) también mostraron actividad inhibitoria contra *Botrytis sp.*. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Gómez (2014) en su estudio titulado "Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium* L.) frente al hongo *Fusarium semitectum*". En su investigación, se demostró que el aceite esencial al 8% de esta especie exhibió la mayor actividad antifúngica en comparación con otros tratamientos. Esto respalda nuestros hallazgos sobre la actividad inhibitoria de *Citrus x aurantium*.

Se logró una inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos de *Lactuca sativa* utilizando tratamientos con extractos de biomasa celular de naranja agria (*Citrus x*

*aurantium*). En el caso del hongo *Botrytis sp.*, se obtuvo una inhibición del 52 % con el tratamiento 4, mientras que para *Fusarium sp.* la inhibición alcanzó el 68%. Estos datos son comparables a los obtenidos en la investigación de Rodríguez et al. (2017), donde se determinó que el extracto de cáscara de limón, en la fracción diclorometano (CLD) al 7 mg/ml, logró una inhibición del 65 % en el crecimiento del micelio del hongo *Botrytis cinerea*.

Nuestros resultados también guardan similitud con la investigación de Mantilla (2018), titulada "Determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ('Tangelo') frente a *Staphylococcus aureus* in vitro", en la que utilizó concentraciones de aceite esencial de 25%, 50% y 75%, con 10 repeticiones para cada concentración. Los resultados demostraron el efecto inhibitorio del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi*, siendo el tratamiento con la concentración del 25% el más efectivo. Este hallazgo es comparable con los nuestros, ya que utilizamos una especie de la familia *Citrus* para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos más comunes en la lechuga, lo que respalda la capacidad antifúngica de las especies de la familia *Citrus*.

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

El T3 y T5 que consistía de la hormona 2,4 D al 1mg/L y al 2mg/L, respectivamente, nos dieron un óptimo crecimiento de callos a partir de explantes de Naranja agria en condiciones in vitro, que fue del 100% y del 96% a los 30 días.

El T5 nos dio un 52% de callos de grado 3, que son los óptimos para esta investigación.

El crecimiento de nuestra biomasa fue de 3g luego de 30 días de incubación.

Para el Hongo *Botrytis sp.* el T4 obtuvo mejor respuesta inhibitoria con 52% de efectividad.

En el caso de *Fusarium sp.* el T5 obtuvo mejor respuesta inhibitoria con un 68% de efectividad.

Con esto se comprueba que los extractos de biomasa celular de naranja agria tienen un efecto antifúngico.

## 6.2. Recomendaciones

- Dentro de un proyecto como este en el cual se trabajó con plántulas in vitro, para futuras investigaciones se recomienda determinar un buen proceso de esterilización para así garantizar un mayor porcentaje de plántulas in vitro.
- Emplear distintas especies de cítricos para realizar investigaciones sobre sus posibles propiedades antifúngicas.
- Implementar distintos protocolos para la embriogénesis y así poder obtener una mayor cantidad de plántulas in vitro para futuras investigaciones.
- Realizar investigaciones con distintas especies en peligro de extinción con potencial antifúngico, para poder así contribuir a su conservación, y a futuro con su posible repoblación.
- Determinar nuevas formulaciones de reguladores de crecimiento para obtener un mayor porcentaje de inducción a la callogénesis.

## CAPÍTULO VII: REFERENCIAS

### 7.1. Fuentes Bibliográficas

Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges” *Journal of General Plant Pathology*. Volume 80, Issue 3, pp 189-201

APG IV (2016) An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1-20.

Asto de la Cruz (2018) Determinación del valor cultural de cuatro cultivares de semilla de lechuga (*Lactuca sativa L.*) bajo las condiciones del valle Santa Catalina. Universidad Privada Antenor Orrego de Perú.

Baffoni, P., Doñate, T., Muzi, E., Sidoti, B., Alarcón, A., Seba, N. (2018) Enfermedades en hortalizas en el valle inferior del Río Negro, Lechuga en invernadero. ISSN en trámite.

- Benito, D. (2019). Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya expresión se induce in planta en la interacción *B.cinerea*-tomate.  
<https://doi.org/10.14201/gredos.76384>
- Bernabé-Antonio, Antonio, Alejandro Sánchez-Sánchez, Antonio Romero-Estrada, Juan Carlos Meza-Contreras, José Antonio Silva-Guzmán, Francisco Javier Fuentes-Talavera, Israel Hurtado-Díaz, Laura Álvarez y Francisco Cruz-Sosa. 2021. "Establecimiento de una Celular Cultura de suspensión celular de *Eysenhardtia platycarpa*: Detección fitoquímica de extractos y evaluación de la actividad antifúngica" 10, no. 2: 414. <https://doi.org/10.3390/plants10020414>
- Buenaño Cornejo, D. (2019) "Rescate del conocimiento ancestral de plantas medicinales en el recinto "La luz", cantón Palenque, año 2019".  
 Universidad Técnica Estatal de Quevedo
- Cáceres Candia, D. (2020) Control de *Botrytis cinerea* Pers. En mandarina Satsuma var. Okitsu mediante fungicidas biológicos y químicos en Huaura. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Casseres, E. 1966. Producción de hortalizas. Ciudad de México, MX, SIC. p.126-134.
- Córdova, Ana M, Cobos, Marianela, Imán, Sixto A, & Castro, Juan C. (2014). Un método eficiente para la inducción de callos in vitro en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria*, 5(1), 25-34. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.03>
- Cuesta Lavayen, N. (2012). Antibiograma y antibioticoterapia en tratamiento de piezas necróticas con proceso apical. Universidad De Guayaquil. Ecuador
- Chavez Jácome, José Francisco. Arboleda Fabara, Marlon Lenin (2011). Propagación in vitro del limón criollo (*Citrus limon*) con el empleo de dos reguladores de crecimiento. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. UTC. Latacunga. 58 p.
- Delgado Paz, E. (2016) Evaluación de tres variedades de lechuga (*Lactuca scariola* L.) con tres dosis de fitohormonas y quelatos inorgánicos y

orgánicos cultivadas en condiciones de hidroponía. Universidad de Guayaquil

Delgado Haya, H. (2004) Propagación in vitro de piña (*Ananas comosus L. Merr.*), utilizando yemas axilares. Universidad Nacional de San Martín

Estrada Sierra, N. (2015) Exploración de las interacciones fisicoquímicas de los flavonoides-matriz en un producto de lima (*Citrus limetta*) y/o naranja agria (*Citrus aurantium*) y su efecto en las propiedades hipoglucemiantes e hipocolesterolémicas en modelo animal. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Fabiani, A., Mika, R., Larocca, L., Anderson, C. (1996) Manual para productores de naranjay mandarina de la región del Río Uruguay. PRODIP - Proyecto de Diversificación Productiva INTA - Estación Experimental Agropecuaria Concordia

FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Roma.200 p. (disponible en: <http://www.fao.org/3/i5555e/i5555e.pdf>).

Floríndez Chávez, J. M., & Siura Céspedes, S. (2015). Evaluación de cultivares de lechuga (*Lactuca sativa L.*) para producción de lechuga minitatura y madura bajo cultivo orgánico. 1–11.

Garcés de Granada, E. y M. Orozco de Amézquita. 2004. Algunos problemas patológicos y fisiológicos de la floricultura en Colombia. Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá) Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. 168 p.

Gómez Cisneros, K. (2014) Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium L.*) frente al hongo *Fusarium semitectum*. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Iglesias, Dianella, Ojito-Ramos, Katia, Linares Rivero, Claudia, & Portal,

- Orelvis. (2017). Actividad antifúngica in vitro de extractos de hojas de Citrus spp. frente a *Stemphyllium solani* Weber. Centro Agrícola, 44(3), 5-12. Recuperado en 12 de diciembre de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852017000300001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852017000300001&lng=es&tlng=es)
- Pariona J., Higaonna O., Matos N. (2001). Enfermedades en Hortalizas. Instituto Nacional De Investigación Agraria
- Jaime Gamboa, Y. (2015). Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L."naranja" frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*. En *Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga*. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2262>
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19-34.
- López Moreta, V. (2007) Aplicación de Mulch, *Bacillus* sp. Y *Trichoderma* spp. Para el control de Mildiu veloso (*Bremia lactucae*) en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). Universidad Técnica de Ambato
- López Aguilar, N. (2019) Efectividad in vitro De Tiabendazol Sobre *Botrytis cinerea* PERS.FR. Universidad Autónoma Del Estado De México
- León Ruiz, P., Torres Obando, K. (2020) Prevalencia de *Lactuca sativa* expandida en el mercado La Hermelinda de Trujillo (Perú) con formas parasitarias intestinales del hombre. 2019. Universidad Nacional de Trujillo
- Ludwig-Müller J & Jd Cohen. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum* 115: 320–329.
- Muñoz Ayala, M. (2017) *Escherichia coli* O157:H7 en hortalizas de fundos agrícolas en la periferia de la ciudad de Lima – Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

- Muñoz Chiles, C. (2018) Identificación morfológica de los hongos causantes de la pudrición radicular en lechuga (*Lactuca sativa* L.) en el valle de Tumbaco. Universidad Central del Ecuador
- Mantilla R., (2018). Determinación del efecto antibacteriano del aceite esencial del fruto *Citrus paradisi* ("tangelo") frente a *Staphylococcus aureus* in vitro. En *Repositorio Institucional UAP*. <https://repositorio.uap.edu.pe/xmlui/handle/20.500.12990/3005?show=ful>
- Noumedem, J. A. K., Djeussi, D. E., Hritcu, L., Mihasan, M., & Kuete, V. (2017). *Lactuca sativa*. In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* (pp. 437–449).
- Orozco Sánchez, F. (2002). Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea* y evaluación de la producción de 1,8 cineol y otros terpenoides
- Pariona, D., Higaonna, C., Matos, B. (2001) Enfermedades en hortalizas. Instituto Nacional de Investigación Agraria
- Pérez Romero, L., Robles Domínguez, J., Pizarro Pariona, L., Casimiro Soriano, E. (2020) Evaluación de pérdidas poscosecha de naranjas (*Citrus sinensis*) producidas en la selva central del Perú. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 21, núm. 2, 2020
- Ramírez Pelayo, C. (2018) Fitoalexinas en lima Tahití (*Citrus latifolia*): evaluación de la composición, actividad antifúngica e inducción mediante elicitores. Universidad Nacional de Colombia
- Roskov Y.; Abucay L.; Orrell T.; Nicolson D.; Flann C.; Bailly N.; Kirk P.; Bourgoin T.; DeWalt R.E.; Decock W.; De Wever A.; (2016). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*, 29th January 2016. Digital resource at [www.catalogueoflife.org/col](http://www.catalogueoflife.org/col). *Species 2000: Naturalis*, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.
- Rodríguez-Rodríguez Laura D., Jiménez-Rodríguez Ángel A., Murillo-Arango Walter, Rueda-Lorza Ever A., Méndez-Arteaga Jonh J.. Actividad antimicrobiana de cáscaras y semillas de *Citrus limonia* y

- Citrus sinensis*. Acta Biol [Internet]. 2017 June [cited 2024 May 17]; 39( 106 ): 53-59. Available from:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-35842017000100053&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842017000100053&lng=en).<https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v39n106a05>.
- Pucuna Chuma, J. (2020) Evaluación Del Efecto De Extractos Hidroalcohólicos Para El Manejo De Hongos Fitopatógenos En Lechuga (*Lactuca sativa L.*) Chimborazo - Ecuador, Universidad Agraria Del Ecuador
- Salinas Olivares, J. s.f. Horticultura: 47 guías didácticas. Arequipa, PE, s.e. p. 93- 99.
- Sepúlveda, P. (2018) Pudrición gris en lechuga. INIA
- Salgado de Morais, L. (2009) Aceites Esenciales en Control Fitosanitario. EMBRAPA medio ambiente Brasil
- Sánchez-Calvo, Laura, & Alvarenga-Venutolo, Silvana. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120. Retrieved May 17, 2024, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0379-39822015000100105&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000100105&lng=en&tlng=es).
- Sánchez Ramos, M. (2019) Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos, Universidad Autónoma Del Estado De Morelos, México
- Solís-Ramos, Laura Yesenia, Carballo, Laura Miranda, & Valdez-Melara, Marta. (2013). Establishment of cell suspension cultures of two Costa Rican *Jatropha* species (Euphorbiaceae). *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1095-1107. Retrieved May 17, 2024, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442013000400009&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442013000400009&lng=en&tlng=en)
- Tigmasa Paredes, L. (2014) Aplicación de Bacilux para el control de Mildiu

velloso (Bremialactucae) en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*) variedades Winterhaven y Great Lakes en el cantón de Ambato. Universidad Técnica de Ambato.

Tapia Bernal, (2018) Inducción de callo embriogénico en camote (*Ipomoea batatas L.*) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Escuela Agrícola Panamericana de Honduras

Vargas Cashpa, D. (2014) Propagación in vitro de *Vaccinium corimbosum* (arándano), hasta la fase de multiplicación. Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo.

Vega Pérez, J. (1997) Regeneración in vitro de Naranja agrio (*Citrus aurantium* Linn). Universidad Autónoma de Nuevo León

## ANEXOS



**Figura 12:** Desinfección de yemas axilares



**Figura 13:** Obtención de plántulas invitro de naranja agria

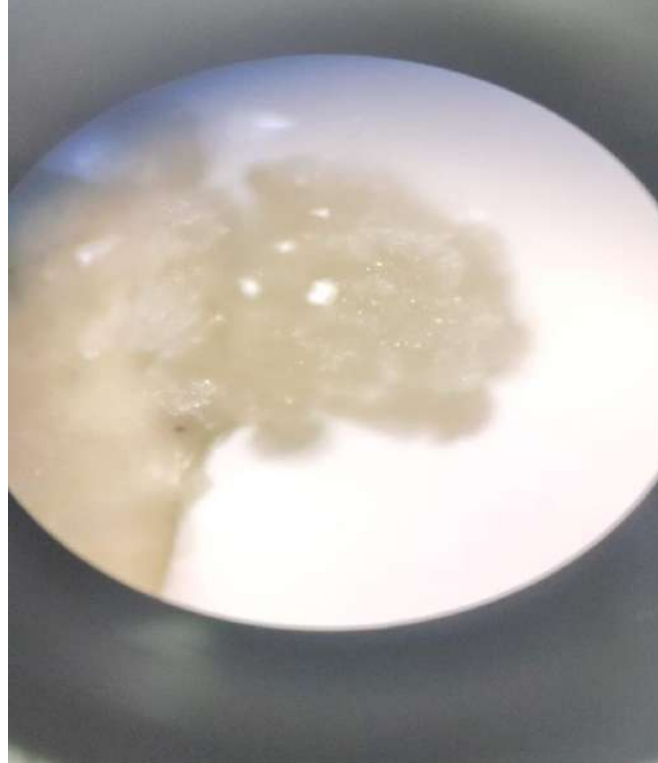


Figura 14: Callo friables grado 3



Figura 15: Tratamientos utilizados contra los hongos fitopatogenos



**Figura 16:** Resultados de pruebas de antibiograma