



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO



EFFECTIVIDAD *in vitro* DE EXTRACTOS ACUOSOS DE *Allium sativum* Y
Cinnamomun zeylanicum FRENTE A *Botrytis cinerea* PROVENIENTE DE
Rosa hybrida

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

P R E S E N T A

BRENDA KAREN HERNÁNDEZ URBINA

DIRECTORES:

M. EN C. GRISEL DOMÍNGUEZ ARIZMENDI

DR. RÓMULO GARCÍA VELASCO

ASESOR

DR. JAIME MEJÍA CARRANZA

Tenancingo, Estado de México

Enero de 2022

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE ANEXOS	V
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. La floricultura en el ámbito mundial.....	4
2.2. Importancia de la floricultura en México	5
2.3. Importancia del cultivo de rosa.....	6
2.4. Enfermedades que afectan al cultivo de <i>Rosa hybrida</i>	7
2.4.1. Mildiu vellosa (<i>Peronospora sparsa</i>).....	8
2.4.2. Cenicilla o mildiu polvoso (<i>Podosphaera pannosa</i>)	9
2.4.3. Roya (<i>Phragmidium mucronatum</i>)	10
2.4.4. Mancha negra (<i>Diplocarpon rosae</i>)	11
2.5. Moho o podredumbre gris causado por <i>Botrytis cinerea</i>	12
2.5.1. Clasificación taxonómica	12
2.5.2. Características morfológicas de <i>B. cinerea</i>	12
2.5.3. Condiciones óptimas para el desarrollo de <i>B. cinerea</i>	14
2.5.4. Proceso de infección	14
2.5.5. Medios de dispersión.....	16
2.5.6. Daños causados por <i>B. cinerea</i>	18
2.6. Métodos de manejo de <i>B. cinerea</i>	19
2.6.1. Manejo cultural	20
2.6.2. Manejo químico	21
2.6.2.1. Antecedentes de resistencia a fungicidas de <i>B. cinerea</i>	22
2.6.3. Manejo biológico.....	24
2.6.4. Manejo a través de metabolitos secundarios de plantas	27
2.6.5. Extracto acuoso de ajo	30
2.6.6. Extracto acuoso de canela	32
3. JUSTIFICACIÓN	34

4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	36
5.1. Objetivo general	36
5.2. Objetivos específicos	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1. Material vegetal.....	37
6.2. Cepas de <i>B. cinerea</i>	37
6.3. Preparación de extractos acuosos (EA).....	38
6.4. Preparación del medio de cultivo con extractos acuosos a la concentración de 15, 10 y 5 %	38
6.5. Variables por evaluar	39
6.5.1. Área de crecimiento micelial.....	39
6.5.2. Efectividad biológica	39
6.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	40
7. RESULTADOS	41
7.1. Cepa VBc1	41
7.2. Cepa TBc2	46
7.3. Comparación de la respuesta <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> , cepas VBc1 y TBc2 frente a los EA de ajo y canela	51
7.3.1. Comparación de la respuesta <i>in vitro</i> del patógeno frente a los EA de ajo.....	51
7.3.2. Comparación de la respuesta <i>in vitro</i> del patógeno frente a los EA de canela.....	52
8. DISCUSIÓN	54
9. CONCLUSIONES	58
10. RECOMENDACIONES	59
11. LITERATURA CITADA	60
12. ANEXOS	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Superficie cosechada de flores de corte y valor de la producción en el año 2019, en el corredor florícola del Estado de México	6
Cuadro 2. Superficie (ha) cultivada y valor de la producción de Rosa hybrida, para flor de corte en el corredor florícola del Estado de México	7
Cuadro 3. Área de crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> , cepa VBc1 con extractos acuosos de ajo y canela al 5, 10 y 15%, cinco días después de la siembra.	42
Cuadro 4. Área de crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> cepa TBc2 con los extractos acuosos de ajo y canela al 5, 10 y 15%, cinco días después de la siembra.	47
Cuadro 5. Porcentaje de crecimiento micelial de las cepas VBc1 y TBc2 con los EA de ajo.	52
Cuadro 6. Porcentaje de crecimiento micelial de VBc1 y TBc2 con los EA de canela	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Botrytis cinerea</i>	16
Figura 2. Medios de dispersión de <i>Botrytis cinerea</i>	17
Figura 3. Efectividad biológica (%) de los extractos acuosos de canela y ajo a la concentración de 5, 10 y 15 %, frente a <i>B. cinerea</i> cepa VBc1	43
Figura 4. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> cepa VBc1, al día cinco después de la siembra en medio de cultivo con EA de ajo. (a) Testigo, (b) 15 %, (c) 10 %, (d) 5 %.....	44
Figura 5. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> cepa VBc1, al día cinco después de la siembra en medio de cultivo con EA de canela. (a) Testigo, (b) 15 %, (c) 10 %, (d) 5 %.....	45
Figura 6. Efectividad biológica (%) de los EA de canela y ajo a la concentración de 5, 10 y 15 %, frente a <i>B. cinerea</i> cepa TBc2.	47
Figura 7. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> cepa TBc2, al día cinco después de la siembra en medio de cultivo con EA de ajo. (a) Testigo, (b) 15 %, (c) 10 %, (d) 5 %.....	49
Figura 8. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> cepa VBc1, al día cinco después de la siembra en medio de cultivo con EA de canela. (a) Testigo, (b) 15 %, (c) 10 %, (d) 5 %.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* cepa VBc1, en las réplicas 1 y 2, con los extractos acuosos de ajo y canela a las concentraciones de 5, 10 y 15 %, cinco días después de la siembra.. 78
- Anexo 2.** Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* cepa TBc2, en las réplicas 1 y 2, con los extractos acuosos de ajo y canela a las concentraciones de 5, 10 y 15 %, cinco días después de la siembra..... 79

RESUMEN

Botrytis cinerea es el agente causal del moho gris del cultivo de rosa (*Rosa hybrida*), enfermedad que provoca pérdidas importantes en condiciones de campo y poscosecha. En el corredor florícola del Estado de México el manejo del patógeno se efectúa por medio del uso de fungicidas, los cuales, derivado de su uso indiscriminado, han generado una serie de problemas sociales y ambientales; por lo que existe la urgente necesidad de brindar a los floricultores alternativas viables para el manejo de la enfermedad. Por lo que se planteó por objetivo: determinar la efectividad *in vitro* de extractos acuosos de bulbos de *Allium sativum* y corteza de *Cinnamomum zeylanicum* sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*. Se utilizaron las cepas VBc1 y TBc2 provenientes de los municipios de Villa Guerrero y Tenancingo, Estado de México, respectivamente y se sometieron a las concentraciones de 5, 10 y 15 % de cada uno de los extractos acuosos (EA). Las variables evaluadas fueron área de crecimiento micelial y efectividad biológica; los datos de área de crecimiento se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias Tukey ($P < 0.05$) con el programa InfoStat versión estudiantil. Existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el área de crecimiento micelial de los EA para cada una de las cepas: con VBc1 el EA más efectivo fue canela al 15 y 10 %, seguido de ajo al 10 y 15 %, con los cuales se presentó una efectividad biológica de 100, 96.5, 90 y 78.9 %, respectivamente; mientras que para TBc2 los EA más efectivos en orden de importancia fueron canela al 15 y 10 %, seguidos de ajo al 15 y 10 %, cuya efectividad biológica fue de 100, 98.3, 87.8 y 77.6 %, respectivamente.

De acuerdo con lo anterior, es evidente que la efectividad de los EA depende de la cepa de *B. cinerea* expuesta.

1. INTRODUCCIÓN

En la agricultura son frecuentes e importantes las enfermedades que se presentan en los cultivos. El manejo de fitopatógenos se ha basado en la utilización de agroquímicos que por su inadecuado uso y aplicación han originado cepas resistentes, contaminación al ambiente, problemas a la salud de los seres vivos (incluido el ser humano), así como incremento de los costos de producción (Ghorbani *et al.*, 2008).

Botrytis cinerea es un hongo capaz de infectar amplio número de hospedantes. La distribución e importancia de los daños que ocasiona justifican el enorme interés para su estudio; desde hace más de 175 años ha sido objeto de numerosas investigaciones relacionadas con su fisiología, bioquímica, patogenicidad y métodos de manejo (Carbú, 2006). Es importante señalar que es considerado un problema en países como: EUA, Japón, India, Canadá, Colombia, Holanda (Barnes y Shaw, 2002), México (Camacho, 2009), entre otros.

Este patógeno es el agente causal del moho gris en el cultivo de rosa (*Rosa hybrida*), con pérdidas importantes en campo y poscosecha (Tatagiba *et al.*, 1998). Los síntomas característicos son: lesiones necróticas en hojas, tallos y brotes. En los botones florales, con diferentes grados de apertura, los síntomas iniciales se manifiestan como pequeñas manchas color rojo-purpura; posteriormente, el micelio y las estructuras de reproducción cubren toda la flor, observándose una masa gris pulverulenta (Bañon *et al.*, 1993).

El manejo químico del patógeno es complicado, debido a su capacidad para desarrollar resistencia a funguicidas (Barnes y Shaw, 2002), lo que ocasiona incremento de las dosis que aplican los productores. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) reporta una gran cantidad de plaguicidas altamente peligrosos, lo que ha contribuido a la necesidad de encontrar alternativas que sean efectivas y que se puedan convertir en productos comerciales, ya que la demanda de productos amigables con el ambiente, entre estos los orgánicos, ha aumentado considerablemente (Duke *et al.*, 2003).

Por lo anterior, una alternativa viable la constituyen los extractos vegetales acuosos, ya que son biodegradables e inocuos. Las plantas son capaces de protegerse por sí solas (Wilson *et al.*, 1999), lo cual quiere decir que producen distintos tipos de compuestos que tienen que ver con su defensa al ataque de patógenos, como los hongos (Grayer y Harborne, 1994; Darnetty *et al.*, 1993). Tales compuestos se pueden utilizar para la producción de extractos que pueden ser utilizados para manejar enfermedades en especies florícolas.

Entre las especies con potencial para tal fin se puede mencionar al ajo (*Allium sativum* L), ya que posee compuestos fenólicos (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013) y alicina la cual es antibacteriana y antifúngica (Ledezma y Apitz-Castro, 1998). Por otra parte, la canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume) contiene compuestos que inhiben y destruyen hongos (Mercier y Jiménez, 2004) ya que produce aldehído cinámico, eugenol y camfor (Senanayake *et al.*, 1978).

Existen diversos estudios que demuestran la efectividad de ambas especies en el manejo de *B. cinerea*. Entre estos se encuentran los estudios de Wilson *et al.*, (1997) quienes reportan que la canela presenta actividad antifúngica; Pazmiño-Miranda y colaboradores (2017) evaluaron el efecto de los extractos hidroetanólicos de canela sobre la incidencia y severidad del patógeno en fresa y demostraron que disminuye la incidencia de la enfermedad en las flores y los frutos. En lo que respecta al ajo, Aguirre y colaboradores (2012), evaluaron a nivel *in vitro* el efecto fungicida de extractos acuosos, alcohólicos e hidrodestilados, con los cuales se obtuvieron resultados satisfactorios en la inhibición de crecimiento micelial.

Derivado de lo anterior se planteó por objetivo: determinar la efectividad *in vitro* de extractos acuosos de bulbos de *Allium sativum* y corteza de *Cinnamomum zeylanicum* sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. La floricultura en el ámbito mundial

Hasta 2005, el valor de la producción florícola mundial pasó de 10 a 60 billones de dólares (Van Uffelen y Groot, 2005); siendo los países del oeste de Europa, Norte América y Japón los principales productores y consumidores en el mundo (Wijnands *et al.*, 2007). La floricultura es una industria multibillonaria que se nutre de muchas economías del mundo; hasta 2011, había 120 países incluidos activamente como productores globales (Martsynovska, 2011), teniendo a Holanda como el centro de las transacciones y mayor accionista, con 52.3 % (Van Hemert, 2005) cuyo valor de la producción fue de 2,000 millones de dólares, seguido por Colombia con 600 millones de dólares. A estos le siguen países como Israel, Kenia y Zimbawe. Existen otros países que sobresalen como productores y exportadores, tal es el caso de Ecuador, México, Brasil, Costa Rica, Tailandia, Taiwán, entre otros (Van Uffelen y Groot, 2005). Cabe señalar que, de acuerdo con el International Trade Center (2016), a nivel mundial México se encuentra posicionado en el cuarto lugar como productor de flores de corte.

Del 2015 a junio del 2019 México ha exportado rosa (*Rosa hybrida*), clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), orquídea (*Orchidaceae* spp.), crisantemo (*Chrysanthemum* spp.), liliis (*Lilium* spp. L.), gladiola (*Gladiolus grandiflora* L.), gypsophilia (*Gypsophila paniculata* L.), statice (*Limonium sinuatum* L. Miller), gerbera (*Gerbera hybrida*), anturio (*Anthurium andraeanum* Linden ex André) y ave de paraíso (*Strelitzia*

reginae Banks). Siendo los principales destinos: Estados Unidos de América, Canadá, España, Bielorusia, Guatemala y Cuba (SIAVI, 2019).

2.2. Importancia de la floricultura en México

México tiene la oportunidad de desarrollarse en una floricultura de primer nivel y con calidad para la exportación. Presenta gran variedad de climas, lo cual favorece la producción de diferentes especies a bajo costo, además de la cercanía con Estados Unidos, que es uno de los mercados florícolas más grandes del mundo, a diferencia de Colombia y Ecuador que tienen una economía creciente en el mercado florícola mundial (Tejeda-Sartorius y Arévalo-Galarza, 2012).

En el año 2019 en el Estado de México fueron cosechadas 4, 729.23 hectáreas destinadas a especies de flor de corte, con un valor de producción de \$5, 240, 747, 920 (MXN) (SIAP, 2019). Cabe señalar que dicha entidad ocupa el primer lugar en la producción de flor de corte y, además, es el principal exportador de ornamentales con aproximadamente el 80 % (Gomora-Jiménez *et al.*, 2006). La producción florícola se concentra en el llamado “corredor florícola”, que lo integran los municipios de Villa Guerrero, Coatepec Harinas, Tenancingo, Zumpahuacán, Tonalico e Ixtapan de la Sal, cuya producción se distribuye en una superficie de 2,807.43; 824.93; 803.63; 142.77; 77.67 y 72.80 ha, respectivamente (Cuadro 1), área que en conjunto conforman el 88.36 % de la producción estatal (SIAP, 2019).

Cuadro 1. Superficie cosechada de flores de corte y valor de la producción en el año 2019, en el corredor florícola del Estado de México.

Municipio	Superficie cosechada (ha)	Valor de la producción (MXN)
Villa Guerrero	2, 807.43	3, 298, 246, 110
Coatepec Harinas	824.93	796, 992, 620
Tenancingo	803.63	1, 016, 157, 450
Zumpahuacán	142.77	81, 073, 320
Tonatico	77.67	19, 615, 350
Ixtapan de la Sal	72.80	28, 663, 070

Fuente: SIAP (2019).

2.3. Importancia del cultivo de rosa

La rosa es una de las flores más apreciadas; es considerada como la reina de las flores por su estética, belleza y su alto valor sentimental, por lo que la industria florícola la utiliza tanto para arreglos florales como en macetería (Whitaker y Hokanson, 2009). En 2019 en el Estado de México se cultivaron 708.50 ha, equivalentes a \$1, 324, 029, 430 (MXN); siendo los principales municipios productores, en orden de importancia: Villa Guerrero, Tenancingo y Coatepec Harinas (Cuadro 2) (SIAP, 2019).

Cuadro 2. Superficie (ha) cultivada y valor de la producción de *Rosa hybrida*, para flor de corte en el corredor florícola del Estado de México.

Municipio	Superficie cultivada (ha)	Valor en producción (MXN)
Villa Guerrero	456	772, 090, 580
Tenancingo	206	495, 391, 860
Coatepec Harinas	110	144, 387, 670

Fuente: SIAP (2019).

2.4. Enfermedades que afectan al cultivo de *Rosa hybrida*

Las enfermedades en los cultivos generan pérdidas importantes y crean amenazas económicas en los ecosistemas agrícolas. Las enfermedades se presentan cuando se cumplen las cuatro condiciones del tetraedro de la enfermedad: I) presencia de hospedero susceptible, II) presencia de patógeno, III) cuando se encuentran en el entorno las condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo de la enfermedad y IV) el ser humano al establecer cultivos y prácticas de manejo cambiantes que impactan sobre las enfermedades (Ghorbani *et al.*, 2008).

El cultivo de rosa es atacado por diferentes microorganismos fitopatógenos los cuales afectan la productividad y calidad de los tallos florales. Entre los patosistemas de mayor importancia por el daño económico que ocasionan están los

conformados por el binomio planta de rosa dentro de los cuales se encuentran *Peronospora sparsa* Berkeley, *Podosphaera pannosa* (Wallr.) de Bary, *Diplocarpon rosae* F. A. Wolf, *Phragmidium rosae* (Kuntze) Tranzschel, *Phragmidium mucronatum* (Pers.) Schltdl y *Botrytis cinerea* Pers., siendo este último uno de los causantes de mayor daño al cultivo (Lediuk *et al.*, 2010; Macnish *et al.*, 2010; Bañon *et al.*, 1993; Horst y Cloyd, 2007).

2.4.1. Mildiu vellosa (*Peronospora sparsa*)

Los daños se presentan sobre hojas, tallos, pedúnculos, cáliz y pétalos de las plantas. En el haz de las hojas se desarrollan manchas irregulares color rojizo púrpura a pardo-oscuro, las cuales se encuentran rodeadas por un halo clorótico; en el envés se producen los signos del patógeno, que corresponden a micelio color marrón claro con abundante producción de esporangióforos y esporangios que en conjunto generan la apariencia de vellosidad, característica típica de la enfermedad (Hollier *et al.*, 2001). Es común que los síntomas foliares se confundan con quemaduras o toxicidad ocasionada por plaguicidas. Por otro lado, en variedades susceptibles se puede presentar defoliación severa (Aegerter *et al.*, 2002).

El patógeno inicia su desarrollo cuando la temperatura oscila entre 15 a 20 °C y el proceso de infección de 20 a 25 °C, con humedad relativa superior al 80 % (Bañon *et al.*, 1993), con temperaturas mayores a 35 °C no se desarrolla (Ferrer y Palomo, 1986). *P. sparsa* esporula con humedad relativa superior al 90 %, la liberación de los esporangios se ve favorecida por fluctuaciones de la humedad relativa (Gallegos

et al., 1999). Los esporangios que han sido depositados sobre los tejidos de las plantas germinan a temperatura promedio de 18 °C; con temperatura inferior a 5 °C o superior a 27 °C no se produce germinación (Horst y Cloyd, 2007).

Sobre los tallos, cáliz y pedúnculos, la enfermedad se manifiesta como manchas púrpuras a negras que varían en tamaño e incluso pueden inducir la muerte de las ramas y la momificación de los botones florales, propiciando la invasión secundaria de los tejidos afectados por parte de otros patógenos, tales como *Botrytis* spp., (Aegerter *et al.*, 2002).

2.4.2. Cenicilla o mildiu polvoso (*Podosphaera pannosa*)

La cenicilla causada por *P. pannosa* cubre de micelio blanco los brotes tiernos, invade yemas, espinas, hojas y tallo. Las condiciones que favorecen el desarrollo y dispersión de este organismo son temperaturas de 15 a 25 °C y humedad relativa de 75 a 79 % durante la noche (Bañuelos, 2013). Para que los conidios maduren se requiere de temperaturas diurnas de aproximadamente 26 °C y humedad relativa inferior al 65 % (Orellana, 2013). El número de conidios liberados al aire aumenta conforme la humedad relativa disminuye, lo que significa que el mayor número de conidios en el ambiente se alcanza al medio día o por la tarde (Agrios, 2005).

P. pannosa se caracteriza por ser un parasito obligado altamente especializado en las plantas que ataca. Causa disminución de la fotosíntesis en el área afectada, incrementa la respiración y transpiración disminuye su crecimiento y reduce la

productividad de 20 a 40 %, pero rara vez mata a su huésped (Ferrer y Palomo, 1986).

Forma apresorios superficiales y haustorios que penetran a través de la cutícula e ingresan a las células epidérmicas (Agrios, 2005). Los síntomas de la enfermedad se desarrollan rápidamente en los tejidos aéreos, pero las hojas y los brotes son los más afectados (Rankovic y Comic, 1997; Xu, 1999). Los primeros indicios surgen sobre las hojas jóvenes como áreas elevadas ligeramente, a menudo rojizas, donde se formarán los signos de la enfermedad con aumento de polvo blanquecino en el envés y el haz de la hoja. En condiciones favorables, la colonización se extiende por toda la hoja, por lo que parece retorcida o curvada; las hojas maduras podrían no presentar los síntomas de la enfermedad, pero pueden presentar áreas circulares e irregulares cubiertas por el hongo y causar su abscisión prematura (Horst y Cloyd, 2007) o distorsión menor de las hojas maduras que con el tiempo se necrosan (Agrios, 2005; Whitaker y Hokanson, 2009).

2.4.3. Roya (*Phragmidium mucronatum*)

La roya es otra enfermedad de importancia entre los productores de rosal. Bajo condiciones de invierno, a temperaturas promedio de 20 a 22 °C y humedad relativa superior al 85 % se favorece su desarrollo y disseminación. El hongo aparece como postulas anaranjadas en el envés de las hojas mismas que contienen las teliosporas que dan origen a las basidiosporas las cuales son transportadas por el viento e infectan hojas y a otras partes de la planta (Domínguez, 1993).

Como parte del manejo del patógeno se recomienda ventilación apropiada al final del día ayuda a prevenir su incremento y dispersión. Cabe señalar que este patógeno y *D. rosae*, son más frecuentes en campo abierto, a menos de que se tengan dentro del invernadero plásticos rotos con escurrimientos excesivos de agua (Bañuelos, 2013).

2.4.4. Mancha negra (*Diplocarpon rosae*)

El hongo pasa el invierno en forma de micelio sobre hojas caídas que previamente fueron infectadas; en la primavera los conidios se dispersan a través de salpicaduras de agua. Se desarrolla formando acérvulos y conidios en la superficie de la hoja; la infección primaria de las hojas es causada por la penetración directa de conidios, el agua formada por el rocío sobre las hojas es suficiente para que el conidio germine y penetre directamente en la epidermis de hojas y tallos. En condiciones de 15 a 25 °C los conidios pueden germinar en 9 horas.

Los síntomas consisten en manchas de color marrón oscuro a negro que inicialmente se presentan como puntos pequeños y luego aumentan de tamaño, aparecen en el haz de las hojas y en tallos jóvenes, las infecciones severas en hojas causan defoliación (Allum *et al.*, 2010). Para su manejo el follaje infectado debe eliminarse; además, se debe mantener humedad relativa inferior a 75 % (Suarez, 2006; Smith *et al.*, 1992).

2.5. Moho o podredumbre gris causado por *Botrytis cinerea*

2.5.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo con Kirk (2019), *B. cinerea* (fase sexual *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) es un hongo que pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Leotiomycetes, orden Helotiales, familia Sclerotiniaceae, género *Botrytis* y especie *cinerea*.

2.5.2. Características morfológicas de *B. cinerea*

La morfología de *B. cinerea* y la función de cada una de sus estructuras le permite infectar a su hospedero, por lo que conocer al patógeno es la clave para poder establecer estrategias de manejo (Holz *et al.*, 2007). Entre estas se encuentran: micelio, conidios, conidióforos, clamidosporas y esclerocios.

El micelio cumple una doble función: I) como estructura de propagación a través de restos vegetales (tallos y hojas) infectados y II) como estructura de resistencia (Gessler y Jermini, 1985). Está conformado por un conjunto de filamentos septados cilíndricos (hifas), los cuales al inicio de su formación tienen apariencia hialina (de aspecto transparente) y con el paso del tiempo se tornan a un color gris o marrón. La coloración y tamaño de las hifas dependen en gran parte de las condiciones de desarrollo del hongo (Mohsin, 1990).

Los conidios son considerados como propágulos de corta vida en el campo, su supervivencia está determinada por temperaturas extremas, la disponibilidad de humedad, actividad microbiana y exposición a la luz solar (Coley-Smith, 1980). Los conidióforos son estructuras que surgen de las hifas, aunque también pueden hacerlo a partir de los esclerocios. Estos consisten en un microfilamento recto en su base que se ramifica de manera alterna y en mayor medida en la región apical. En el extremo terminal de dichas ramificaciones se forman engrosamientos o vesículas globosas de donde surgen los conidios, los cuales están separados del conidióforo por un septo transversal (Fernández, 2006).

Las clamidosporas son células de aspecto hialino de alta variabilidad de forma y tamaño, se consideran estructuras de resistencia que se forman a partir de la transformación de algunas partes de micelio y son liberadas por la desintegración de las hifas. Bajo condiciones de humedad y sin nutrientes germinan dando lugar a microconidios que permanecen en estado latente hasta que se tienen los nutrientes necesarios para germinar y originar hifas de penetración e iniciar el ciclo nuevamente (Holz *et al.*, 2007).

Los esclerocios son considerados como las estructuras de mayor importancia involucradas en la supervivencia y reproducción del hongo, dentro se encuentra pigmentos melánicos y reserva de nutrientes; pueden sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas y producir estructuras llamadas apotecios, que corresponden a la fase sexual, las cuales tienen una considerable capacidad de producir conidios. La formación de los apotecios está influenciada por varios factores, tales como: la

temperatura, luz, pH y la composición del tejido sobre el cual se desarrollan (Carbú, 2006; Holz *et al.*, 2007).

2.5.3. Condiciones óptimas para el desarrollo de *B. cinerea*

La temperatura óptima para el desarrollo de *B. cinerea* es de 15 a 25 °C, la máxima de 35.5 °C y la mínima cercana a 0 °C. Es favorecido por humedad relativa superior al 85 % o abundante agua que puede estar dada por lluvia, rocío o densa neblina (Orellana, 2013).

Sin condiciones favorables puede invernar como esclerocios y micelio de resistencia sobre plantas vivas y restos vegetales. El micelio de resistencia tendrá la capacidad de reproducción y diseminación, por lo que es una fuente de inóculo importante para la siguiente temporada (Agrios, 2005). De acuerdo con Agrios (2005) bajo condiciones favorables los esclerocios pueden evolucionar de dos formas:

- I. En forma de apotecios que encierran las ascas y ascosporas (reproducción sexual).
- II. En forma de conidióforo (portador de conidios) que es la evolución más frecuente (reproducción asexual). En este caso el inóculo primario son los conidios, que son liberadas gracias a mecanismos higroscópicos.

2.5.4. Proceso de infección

Los patógenos que llegan a depositarse sobre una hoja deben penetrar o evadir barreras físicas de protección de la planta, entre las cuales está la cutícula del

hospedero, que se compone de cutina cubierta por cera. Benito *et al.* (2000) describen cuatro fases como parte del proceso de infección (Figura 1):

- I. Adhesión y germinación de los conidios sobre la superficie del huésped.
- II. Penetración del tejido vegetal a través de heridas, aberturas naturales, o mediante la participación de distintas actividades enzimáticas.
- III. Establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración como consecuencia de mecanismos de defensa de la planta.
- IV. Las lesiones primarias del patógeno se manifiestan en el tejido vegetal circundante continuando con la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo, seguido de una nueva generación de conidios con potencial de iniciar un nuevo ciclo de infección.

Se cree que los apresorios secretan enzimas como cutinasa y lipasa, esto para romper la cutícula de la superficie de las hojas y así penetrar en el tejido. Una vez dentro del tejido provoca la muerte celular por medio de moléculas tóxicas y enzimas líticas. El objetivo del patógeno no es provocar la muerte del hospedero sino descomponer la biomasa de la planta y convertirla en parte de su biomasa (Van Kan, 2006).

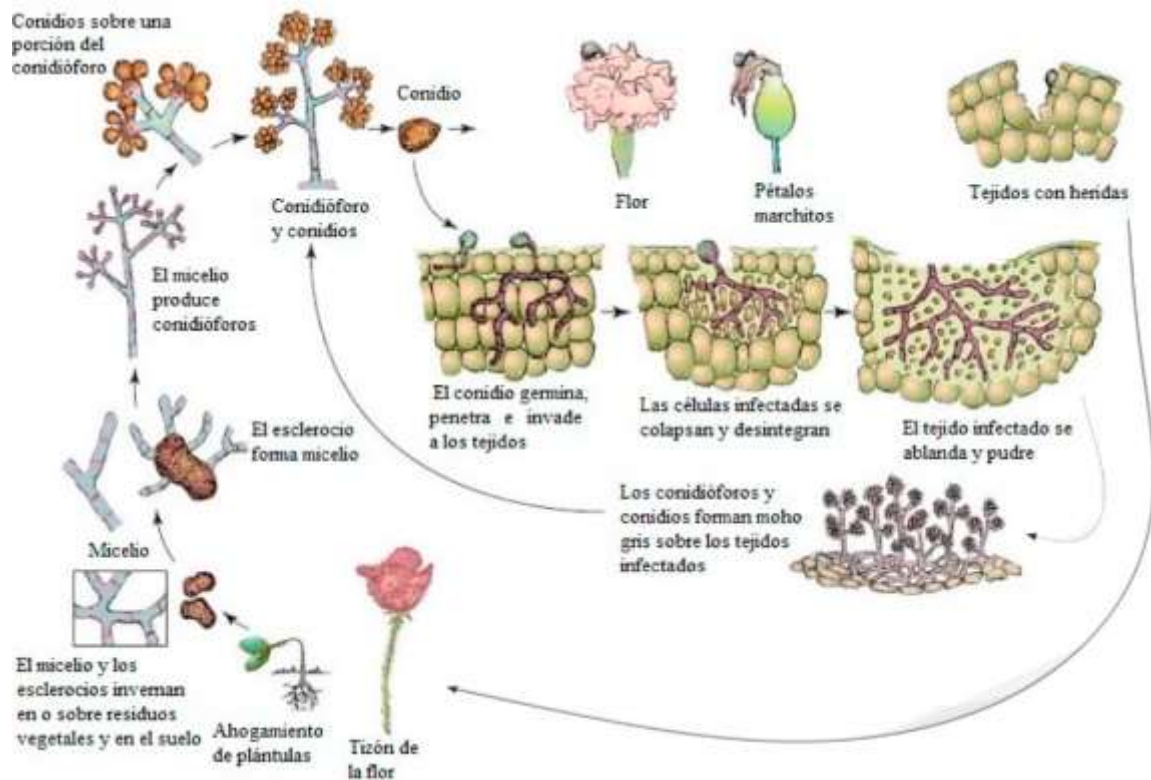


Figura 1. Ciclo biológico de *Botrytis cinerea* (fuente: Agrios, 2005).

2.5.5. Medios de dispersión

Los conidios de *B. cinerea* son las estructuras de dispersión por excelencia, el mecanismo por el cual el viento los dispersa se divide en tres fases: liberación, transporte y deposición. La liberación da lugar al desprendimiento de los conidios del conidióforo por medio del viento o por salpicaduras del agua de lluvia. Una vez liberados, el viento transporta los conidios, de manera que conforme aumenta la velocidad del viento, mayor va a ser la concentración de conidios en la atmósfera

(Figura 2). La distancia a la que son depositados depende de la velocidad del viento y de la posición de la fuente de inóculo (Holz *et al.*, 2007).

La liberación de los conidios conlleva dos procesos: precipitación e impacto, ambos influenciados por la fuerza del viento. La precipitación es el proceso mediante el cual los conidios descienden bajo la influencia de la gravedad. El impacto implica el choque entre el conidio y la superficie del huésped depositándose de forma individual y no agrupada (Holz *et al.*, 2007).

Los conidios también pueden ser dispersados por los insectos al quedar atrapados entre los segmentos de su cuerpo, como la cutícula, alas y apéndices locomotores. Así, por ejemplo, se han aislado conidios de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster* Macquart), la polilla de la vid (*Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller), el trips de Nueva Zelanda (*Thrips obscuratus* Crawford J. C.) y la mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wiedemann). Incluso pueden permanecer viables después de ser ingeridos por los insectos y atravesar su tubo digestivo (Holz *et al.*, 2007).

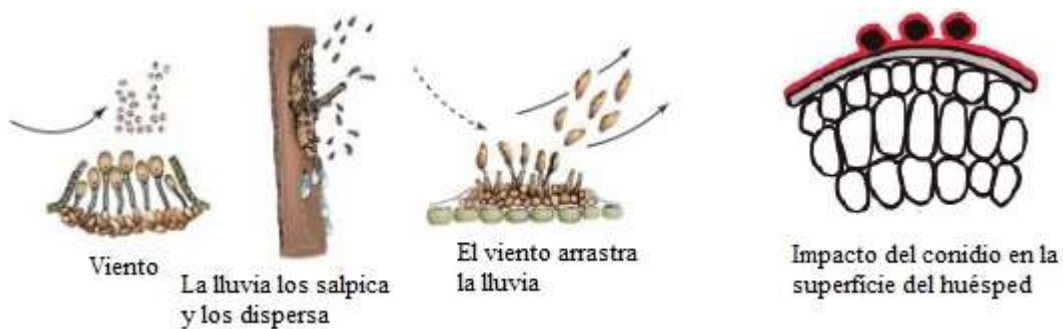


Figura 2. Medios de dispersión de *Botrytis cinerea* (fuente: Agrios, 2005).

2.2.6 Daños causados por *B. cinerea*

Se estima que alrededor del 20 % de las cosechas mundiales, entre las que se incluyen ornamentales, frutales, hortalizas, semillas, bulbos, tallos, hojas, flores y raíces son afectadas por *B. cinerea*, lo que conduce a una inversión de billones de euros anuales para su manejo (Genoscope, 2008). Este patógeno afecta a más de 235 especies entre los que incluye amplio número de plantas ornamentales entre ellas la rosa (Perryman *et al.*, 2002).

En el cultivo de rosa el daño más grave ocurre en el almacenamiento o durante el transporte. Las infecciones pueden no ser visibles en el momento del corte de la flor, pero se desarrollan rápidamente con las condiciones de humedad que se encuentran en el almacenamiento durante el transporte, ya que en las cajas se mantienen altos niveles de humedad que proporcionan las condiciones ideales para su desarrollo (Horst y Cloyd, 2007).

Durante los períodos de clima húmedo continuo y bajas temperaturas, los brotes florales de rosas cultivadas al aire libre no abren y se cubren con el crecimiento micelial pardo grisáceo del fitopatógeno. Las yemas infectadas pueden marchitarse y se desarrollan lesiones lisas, ligeramente hundidas, de color grisáceo que se extienden hacia abajo desde el tallo hasta la base de la yema. El daño en las rosas de invernadero puede ser similar al de las rosas cultivadas al aire libre; generalmente, aparecen pequeñas manchas en los pétalos infectados, y las puntas o lados de los pétalos se vuelven marrones y suaves. En algunos casos, pueden

aparecer numerosas manchas circulares, marrones con apariencia de ampollas sobre la superficie de los pétalos (Horst y Cloyd, 2007).

Las infecciones son especialmente evidentes en cultivares con flores blancas. Tanto en el invernadero como en las rosas cultivadas a cielo abierto el patógeno puede infectar los extremos del tallo de los que se han cortado las flores o las heridas que se hicieron al momento de podar. En última instancia, estas infecciones resultan en el deterioro de los tallos. Los tocones que quedan después de la poda no deben tener más de 6 mm de longitud para fomentar la formación de callos (Horst y Cloyd, 2007).

Los síntomas pueden desarrollarse en cualquier tejido con heridas y cuando las condiciones de humedad y temperatura son propicias para su desarrollo. Si las condiciones son favorables en la primavera, a menudo se infectan nuevos tallos en los nodos. En los invernaderos de propagación, el hongo puede ingresar a través de las heridas y matar pequeñas ramas o todo el corte. Las áreas afectadas de las plantas a menudo se cubren con un crecimiento de micelio pardo grisáceo y masas de conidios grises en el aire (Horst y Cloyd, 2007).

2.6. Métodos de manejo de *B. cinerea*

Uno de los problemas más recurrentes en el manejo de los fitopatógenos es que se realiza cuando la enfermedad es evidente, dejando a un lado las prácticas más importantes que son el monitoreo y prevención de las infecciones (Ghorbani *et al.*, 2008). En la actualidad, el manejo que se lleva a cabo en el campo incluye medidas

culturales tendientes a reducir las fuentes de inóculo o evitar condiciones predisponentes para el desarrollo de las enfermedades, así como la rotación de cultivos, medidas higiénicas, baja densidad de plantación y manejo químico. Los métodos físicos y químicos ayudan a proteger a las plantas contra el inóculo del patógeno y a curar una infección en desarrollo (Agrios, 2005).

Las medidas cuarentenarias ayudan a prevenir, erradicar o eliminar a los patógenos de sus hospedantes de cierta área geográfica (Agrios, 2005). Todo lo anterior se debe seguir a lo largo del proceso productivo para cuidar la calidad de los productos, sin dejar a un lado la protección ambiental y el bienestar del ser humano (Carbú, 2006).

De igual forma se utilizan microorganismos como agentes de manejo biológico (Agrios, 2005), así como la evaluación de extractos vegetales acuosos está siendo estudiada (González-Martínez *et al.*, 2017; Montes *et al.*, 2000). En términos generales, la mayoría de los métodos de manejo evitan que las plantas entren en contacto con el patógeno; además, permiten reducir su abundancia en las plantas, en un campo o un área geográfica determinada (Agrios, 2005).

2.6.1. Manejo cultural

Se recomienda cortar y quemar los tallos y flores infectados tan pronto como tiendan a inclinarse, para evitar nuevas infecciones los tallos que sostienen a las yemas enfermas deben cortarse varios centímetros debajo de éstas (Romero, 1996). En cultivos de flores bajo invernadero se sugiere buen manejo en la instalación de

aperturas cenitales y cortinas (especialmente si se presenta humedad relativa mayor al 90 %), eliminación de botones de mala calidad, manejo de ventiladores y calefacción, limpieza de residuos de podas, adecuada plantación, eliminación de arvenses que puedan ser fuente de inóculo, evitar el uso de grandes caudales y riegos frecuentes, además de aplicaciones de cal al suelo (Latorre, 2013; Agrios, 2005).

2.6.2. Manejo químico

En la floricultura, el manejo de las enfermedades fungosas normalmente se realiza con la aplicación repetida de fungicidas, los cuales están elaborados a base de ingredientes activos tóxicos para el aplicador y además afectan al ambiente; además, este método incrementa los costos de producción. Lo anterior conduce a la necesidad de utilizar implementos de protección personal (Mendoza *et al.*, 2005).

Un fungicida puede definirse como un compuesto que mata o inhibe el crecimiento de un hongo (Mendoza, 2002). Los fungicidas pueden clasificarse como: protectores o de contacto, erradicantes y sistémicos. Entre los fungicidas más utilizados destacan el benomilo, carbendazim, captan, diclofuanida, iprodiona, vinclozolin, procymidona, tiabendazol, tiofanato de metilo, metalaxil, clorotalonil, entre otros (Camacho, 2009) . Por otra parte, la gran adaptabilidad de las cepas del hongo a los productos comerciales ha conllevado a la aparición de cepas de *B. cinerea* resistentes (Carbú, 2006), lo que ha hecho necesario un cambio continuo de fungicidas y un incremento considerable de las dosis, con el consiguiente riesgo de

persistencia de estos productos en el suelo, y la aparición de cepas resistentes (Van den Bosch *et al.*, 2011).

2.6.2.1. Antecedentes de resistencia a fungicidas de *B. cinerea*

El desarrollo de resistencia de *B. cinerea* a fungicidas hace más difícil su manejo, a pesar de la gran cantidad de alternativas de productos e ingredientes activos que se encuentran disponibles. El fenómeno de resistencia es provocado en gran medida por el uso repetido de ingredientes activos y dosis inadecuadas; un factor que agrava la situación es no considerar los antecedentes de resistencia de las cepas locales, lo que conduce a diseñar programas de manejo inapropiados y poco eficientes (Esterio y Auger, 1997).

Ponce-González y colaboradores (2002) determinaron que aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de *Rosa hybrida*, *Gladiola* sp. y *Gerbera* sp. del municipio de Villa Guerrero, Estado de México, presentan resistencia a los fungicidas tiabendazol y benomil a dosis de 1 y 0.63 g L⁻¹, respectivamente. Además, en su investigación obtuvieron la CE₅₀ y CE₉₅ de ambos fungicidas, con benomil los resultados indicaron que un aislamiento sensible tuvo una CE₅₀ de 0.055 µg mL⁻¹ y una CE₉₅ de 0.49 µg mL⁻¹, el factor de resistencia para la CE₅₀ se encuentra entre 4,555.18 y 15,120.45, en cambio con la CE₉₅ se ubicó entre 24,980.63 a 37,303.24; en comparación con una aislamiento sensible a tiabendazol presentó una CE₅₀ de 0.028 µg•mL⁻¹ y una CE₉₅ de 0.327 µg mL⁻¹ en este caso el factor de resistencia para la CE₅₀ se encuentra entre 3,160.00 a 4,440.42 y para la CE₉₅ de 8,653.43 y

33,146.78. Los resultados obtenidos confirman la resistencia del hongo a benomil y tiabendazol.

Camacho (2009), determinó la sensibilidad *in vitro* a funguicidas de cepas de *B. cinerea* colectadas en los municipios de Coatepec Harinas, Tenancingo y Villa Guerrero. Los ingredientes activos evaluados correspondieron a los más utilizados en la región en estudio, estos fueron: procloraz, tiabendazol, iprodiona, clorotalonil y metalaxil-m, este último solo se evaluó para Coatepec Harinas; la dosis evaluadas fueron las recomendadas por el fabricante: 2.5, 1, 1.5, 3.25 y 3.75 mL L⁻¹, respectivamente. Los resultados mostraron que con tiabendazol, procloraz e iprodiona las cepas de los tres municipios no muestran sensibilidad alguna; por otro lado, con metalaxil-m las cepas sí presentaron sensibilidad. De acuerdo con los resultados reportados por la autora, se concluye que en la zona existen cepas de *B. cinerea* que se han vuelto resistentes a los funguicidas utilizados con mayor frecuencia en la región.

Recientemente, López (2019) determinó la efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre cepas *B. cinerea* Pers. Fr. colectadas por Camacho (2009) en los municipios de Tenancingo (cepa TBc2) y Villa Guerrero (cepa VBc1). El ingrediente activo estudiado fue tiabendazol; las dosis de ingrediente activo evaluadas para VBc1 fueron 0.00, 0.024, 0.075, 0.23, 0.7 y 0.958 g L⁻¹; para la TBc2 se utilizaron 0.00, 0.0089, 0.05, 0.1181, 0.2792, 0.66 y 1.56 g L⁻¹. Los resultados mostraron que para la cepa VBc1 la DL₅₀ fue de 0.0576 g de i. a. L⁻¹ y la DL₉₅ de 6.0476 g de i. a. L⁻¹ por lo cual para alcanzar una mortalidad del 95 % se requiere 907.94 % más de ingrediente activo de lo recomendado por el fabricante. Para la cepa TBc2 la DL₅₀

fue de 0.0395 g de i. a. L⁻¹ y la DL₉₅ de 0.8673 g de i. a. L⁻¹ para lo cual se requiere 44.6 % más de lo recomendado. De acuerdo con los resultados reportados por la autora se concluye que el fungicida tiabendazol ha perdido efectividad contra cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de los cultivos de rosa provenientes de Tenancingo y Villa Guerrero.

2.6.3. Manejo biológico

La resistencia a fungicidas que ha desarrollado *B. cinerea* hace más difícil su manejo, razón por la cual se utilizan microorganismos como agentes de manejo biológico dentro de los cuales se encuentran *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *Trichoderma harzianum* Rifai y *Trichoderma viride* Pers (Carbú, 2006; Lehmann-Danzinger, 2004; Lisboa, 2003). Los métodos biológicos y algunos culturales ayudan a mejorar la resistencia del hospedante o favorecen el crecimiento de microorganismos antagonistas (Agrios, 2005).

A raíz de las consecuencias del uso excesivo de los agroquímicos, ha surgido la necesidad de buscar y analizar alternativas que permitan manejar las enfermedades de las plantas y reducir el impacto negativo que generan sobre el ambiente. Es así como se han desarrollado productos de origen biológico, basados en la utilización de microorganismos aprovechando las interacciones que permiten el manejo de plagas o enfermedades por competencia, nutrientes, espacio, antibiosis y parasitismo (Murillo y Salazar, 2011).

En los últimos años el manejo biológico ha sido objeto de estudio y ha demostrado su efectividad con microorganismos antagonistas como bacterias, levaduras y hongos los cuales tienen la capacidad de ejercer un efecto de manejo biológico sobre diferentes patógenos de interés (Hernández *et al.*, 2007).

Investigaciones con *Trichoderma harzianum* y *T. viridae*; en fruto de uva (*Vitis vinifera*), controlaron parcialmente a *B. cinerea in situ*, el resultado se debió al efecto de competencia por espacio y nutrientes (Guédez *et al.*, 2009). Por otra parte, la rotación semanal de *Gliocladium roseum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas spp.*, *Streptomyces spp.*, *Trichoderma inhamatum* y *Cladosporium oxysporum* disminuyó la severidad del patógeno en un 46 a 64 % en hojas y pétalos de *Rosa hybrida* (Tatagiba *et al.*, 1998; Orellana, 2013).

Molina y colaboradores (2006), realizaron la selección de hongos antagonistas para el manejo biológico de *B. cinerea* en viveros forestales en Chile. El estudio consistió en seleccionar hongos antagonistas a *B. cinerea* mediante ensayos *in vitro* y de invernadero, los potenciales antagonistas los obtuvieron a partir de colectas en viveros forestales, utilizaron 71 cepas de hongos de las cuales evaluaron su capacidad para reducir la colonización y esporulación del patógeno. Como resultado obtuvieron que cuatro cepas de *Trichoderma*, tres de *Clonostachys*, cuatro de *Pencillium*, una de *Cladosporium* y otras ocho de hongos no identificados redujeron significativamente la colonización y esporulación del patógeno, por lo cual estos resultados permiten concluir el potencial de los antagonistas seleccionados en el manejo de la enfermedad.

Lisboa (2003), realizó una investigación sobre la efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris en *Vitis vinifera* Marshall. El estudio se llevó a cabo en plantas de vid cv. Sauvignon Blanc, fueron asperjadas en los estados susceptibles de floración, apriete y/o pinta con *Trichoderma harzianum* cepa nativa de Queule y Serenade® WP (*Bacillus subtilis*). Los resultados mostraron que la incidencia alcanzada por los racimos del testigo fue de 35 y 75 % de las bayas de los racimos infectadas con el hongo; sin embargo, los tratamientos con *Trichoderma* y *Bacillus* fueron efectivos en reducir la incidencia *Botrytis* cuando fueron aplicados en la floración, apriete y pinta.

Merchán-Gaitán y colaboradores (2014), realizaron un estudio para proponer estrategias de manejo de *B. cinerea* en fresa (*Fragaria* sp.) los tratamientos evaluados fueron: el producto comercial Tricho D® (*T. harzianum*) en concentración de 1×10^8 conidios g^{-1} en una suspensión de $5 g L^{-1}$ de agua, el producto comercial Mycobac® (*T. harzianum*) en concentración de 2×10^7 conidios g^{-1} en una suspensión de $25 g L^{-1}$ de agua, iprodiona a la dosis de $1.5 mL L^{-1}$ y un testigo. Como resultados, obtuvieron que la incidencia de la enfermedad en el tratamiento testigo fue del 60 %, con iprodiona fue de 46.66 % mientras que para los tratamientos con *T. harzianum* y *T. lignorum* alcanzó 33 %, lo que indica un manejo mayor de los antagonistas en comparación con el químico sobre la enfermedad. En cuanto a la severidad, los tratamientos con *T. harzianum* y *T. lignorum* redujeron significativamente en un 32 % el desarrollo del patógeno en la planta. La masa fresca de frutos mostró diferencias significativas cuando se aplicó *T. lignorum*, ya

que este tratamiento obtuvo los frutos más grandes y con mayor tonalidad roja. La aplicación de *Trichoderma* sp. estimuló frutos con mayor firmeza en las dos variedades lo que indica que estos frutos soportan mejor la manipulación poscosecha y el almacenamiento.

2.6.4. Manejo a través de metabolitos secundarios de plantas

Las plantas han sido capaces de protegerse de las plagas por sí mismas antes de que el hombre jugara un rol activo en su protección (Wilson *et al.*, 1999). Se conoce que sintetizan gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa. Desde el punto de vista bioquímico, han desarrollado dos tipos de compuestos que tienen que ver con su defensa al ataque de los hongos: los llamados compuestos antifúngicos constitutivos o inhibinas, los cuales existen en las plantas estructuralmente para detener la invasión de diversas especies de hongos, y las fitoalexinas que se producen como respuesta a la infección de patógenos más específicos por reacciones bioquímicas rápidas como la hidrólisis enzimática (Grayer y Harborne, 1994; Darnetty *et al.*, 1993).

El proceso para obtener metabolitos secundarios de los extractos vegetales es variable; se pueden obtener extractos acuosos (Bautista *et al.*, 2002), polvos (Bautista *et al.*, 2003), o utilizar otros disolventes para obtener diferentes compuestos, según su polaridad (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

- I. **Extracto acuoso:** extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada o fresca de origen vegetal, por maceración o

percolación en contacto con agua, seguida de la eliminación por un procedimiento físico (Gonzalez, 2004). De estos extractos se obtienen metabolitos secundarios como saponinas, taninos, azúcares reductores y flavonoides (Mena *et al.*, 2015).

II. Extracto en polvo: para su obtención en forma de polvo, se emplea el secado por aspersion por ser un método de secado que preserva los componentes naturales presentes en estos productos (Sharapin, 2000). El secado por aspersion es una extensión del proceso de evaporación en el cual se retira casi todo el líquido de una solución de un sólido no volátil en un líquido. También se dice que este proceso es una operación de transferencia simultánea de calor y masa (Perry, 1998).

III. Extracto etanólico: extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado (Gonzalez, 2004). De este extracto se pueden obtener aceites esenciales, fenoles, alcaloides, flavonoides y saponinas (Urdaneta *et al.*, 2013)

IV. Aceites esenciales: son metabolitos secundarios aislados de las plantas, en los cuales destacan algunos, muy especiales, de amplio uso en diversas ramas de la industria, medicina y en muchos productos empleados en la vida cotidiana (Stashenko, 2009). El material vegetal (planta aromática), al ser

sometido al vapor de agua, libera una mezcla odorífera líquida (aceite esencial) de una gran variedad de sustancias volátiles, que recuerdan el olor en forma muy concentrada de la misma planta. Esta mezcla puede tener desde 50 hasta 300 sustancias químicas y está compuesta por hidrocarburos terpénicos, sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas, así como éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides y otros derivados (Camargo y Rodríguez, 2008).

Lo que más los caracteriza es su olor, generalmente agradable, intenso, típico de la fragancia de la planta, fruta o de la madera de la cual proviene (Stashenko, 2009).

Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos. Sus mecanismos de acción son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de los terpenos y aceites esenciales no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se ha postulado que se intercalan con el ADN, y de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999).

Montes y colaboradores (2000), evaluaron 206 especies vegetales contra 26 especies de hongos fitopatógenos, y encontraron que entre 32 y 51 % de las plantas evaluadas interactuaban con los hongos y causaban desde estimulación biológica hasta inhibición total. Si se considera que la mayoría de los compuestos obtenidos de las plantas son biodegradables e inocuos; en México se encuentran aproximadamente 10 % de las especies de plantas superiores del mundo y más de 40 % de ellas son habitantes exclusivas del país (CONABIO, 1998), resulta conveniente explorar el potencial de empleo de sus extractos vegetales para controlar las enfermedades postcosecha, entre estas *B. cinerea*.

2.6.5. Extracto acuoso de ajo

El ajo (*Allium sativum*) posee un alto contenido de compuestos fenólicos, polifenoles y fitoesteroles; también presenta contenido moderado de selenio y germanio (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013). Entre los compuestos azufrados que predominan se encuentran la alixina, alicina, aliina, adenosina, alil metano tiosulfonato, dialil disulfuro, dialil trisulfuro, alil metil trisulfonato, S-alil mercaptocisteína, 2-vinil-4H-1,2-ditiina y 5-alilcisteína. De igual forma contiene aminoácidos entre los cuales se encuentran: ácido aspártico, asparagina, alanina, arginina, histidina, metionina, fenilalanina, leucina, serina, treonina, prolina, triptófano y valina (Ramírez-Concepción *et al.*, 2016).

En diversas preparaciones se ha demostrado que la alicina presenta un amplio espectro de actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas y gram

negativas como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Mycobacterium tuberculosis* (Ledezma y Apitz-Castro, 1998). Muchos hongos, incluidos *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*, *Aspergillus niger*, *C. albicans* y *Paracoccidioides* han mostrado ser sensibles a los compuestos del ajo a través de la disminución del consumo de oxígeno, lo que provoca reducción del crecimiento del organismo e inhibiendo la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que ocasionan daños a las membranas (Ghannoum *et al.*, 2004).

Aguirre y colaboradores (2012), evaluaron el efecto fungicida de extractos acuosos, alcohólicos e hidrodestilados *in vitro* de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), ajo (*Allium sativum*) y crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) para el manejo de *B. cinerea*, *P. mucronatum* y *S. pannosa*; las concentraciones evaluadas fueron 25, 50, 75 y 100 %. El efecto fungicida de los extractos vegetales sobre el halo de inhibición en *B. cinerea*, conidios afectados en *P. mucronatum* y *S. pannosa* fue variable. Los extractos que mostraron mejor eficiencia fungicida frente a *B. cinerea* fueron el extracto alcohólico de eucalipto al 100 %, el extracto alcohólico de ajo al 75 y 100 % y el extracto alcohólico de crisantemo al 25 y 50 %. Al cuarto día de incubación presentaron un halo de inhibición promedio de 7.94, 10.40 y 6.94 mm respectivamente.

Campa-Siqueiros y colaboradores (2017), evaluaron la incidencia de la pudrición gris causada por *B. cinerea* en uva de mesa por efecto de volátiles de extracto de ajo, los tratamientos consistieron en el extracto de ajo (EHA) y compuestos del mismo como la alicina, dialilsulfuro (DADS) y dialil trisulfuro (DATS). Los racimos de

uvas se expusieron a los compuestos volátiles emitidos por el EHA, DADS, DATS y alicina. Los resultados mostraron que los volátiles emitidos por alicina y DADS tienen menor efecto que el EHA y DATS los cuales inhibieron de manera similar el desarrollo de la enfermedad en los racimos durante 14 días a 4 y 25°C, presentando una mejor efectividad a bajas temperaturas.

2.6.6. Extracto acuoso de canela

En Centroamérica los árboles de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) producen 28 compuestos que inhiben y destruyen tanto hongos como oomicetos y bacterias (Mercier y Jiménez, 2004). La corteza de su tallo produce altas concentraciones de aldehído cinámico, en sus hojas predomina el eugenol y en la corteza de sus raíces predomina el camfor (Senanayake *et al.*, 1978).

Cabe señalar que el aldehído cinámico es un compuesto fenólico admitido como seguro para su uso en alimentos y es utilizado como saborizante (Silva-Espinoza *et al.*, 2013). Dicho componente antimicrobiano no solo exhibe una actividad antibacteriana sino que también inhibe el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas (Hitokoto *et al.*, 1980). La canela al 50 % utilizando la técnica de extracción de hidrolato, purín y presurizado, reduce el crecimiento micelial de *B. cinerea in vitro*, al igual que la esporulación y formación de esclerocios (Velosa *et al.*, 2003).

Wilson *et al.* (1997), demostraron que el extracto de canela a concentraciones de 1.56 a 100 % presenta actividad antifúngica en el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

Soliman y Badeaa (2002), reportan que los aceites esenciales a 500 ppm inhibieron totalmente el desarrollo micelial de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* y *Fusarium moniliforme*.

Pazmiño-Miranda y colaboradores (2017), evaluaron el efecto de los extractos hidro-etanólicos de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y cola de caballo (*Equisetum arvense* L.) sobre la incidencia y severidad de *B. cinerea* en fresa; evaluaron el efecto de la aplicación de tres dosis (5, 10 y 15 mL L⁻¹) y dos frecuencias (cada 6 y 8 días). El extracto de canela a una dosis de 15 mL L⁻¹ a una frecuencia de aplicación de cada 6 días fue el que mostró menor porcentaje de incidencia en flores y frutos (10.24 y 24.43 %, respectivamente) de igual forma mostro menor severidad en frutos (11.86 %) por lo cual concluyeron que el uso de extractos hidro-etanólicos de canela podría ser una alternativa para el manejo de la pudrición gris en cultivos de fresa.

3. JUSTIFICACIÓN

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno de importancia económica; ataca un gran número de cultivos entre los que destaca la rosa, cuyas afectaciones se presentan principalmente en las flores, tanto en campo como en poscosecha. Por tal razón, los productores realizan aplicaciones de fungicidas; sin embargo, estudios recientes realizados con cepas del patógeno provenientes de la zona florícola del Estado de México demuestran que el hongo ha desarrollado resistencia a ciertos ingredientes activos, lo que conduce a aumentar las dosis recomendadas. Adicional a la problemática anterior, se encuentran la contaminación ambiental y los daños a la salud de los trabajadores expuestos directa e indirectamente a tales productos.

Por lo anterior, es necesario el estudio de estrategias de manejo amigables tanto con el ambiente como con las personas que laboran en el área y los consumidores. Una alternativa es la utilización de extractos acuosos de vegetales, que al ser de origen natural tienen menos efectos dañinos al ambiente y presentan resultados satisfactorios para el manejo de enfermedades. Por lo que el objetivo de la presente investigación fue: determinar la efectividad *in vitro* de extractos acuosos de bulbos de *A. sativum*, y corteza de *C. zeylanicum* sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

4. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de *A. sativum* y *C. zeylanicum* inhibirán de forma diferencial el crecimiento micelial *in vitro* en las cepas de *B. cinerea* VBc1 y TBc2.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la efectividad biológica *in vitro* de extractos acuosos de bulbos de *A. sativum*, y corteza de *C. zeylanicum* sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

5.2. Objetivos específicos

Determinar el crecimiento micelial *in vitro* de las cepas de *B. cinerea* VBc1 y TBc2, con tres concentraciones de extractos acuosos de *A. sativum* y *C. zeylanicum*.

Comparar la respuesta *in vitro* de las cepas de *B. cinerea* VBc1 y TBc2 frente a extractos acuosos de *A. sativum* y *C. zeylanicum*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Ex Hacienda Santa Ana, Tenancingo, Estado de México, Km 1.5, ubicado en la latitud 18.968336977758856 y longitud -99.61394297381273.

6.1. Material vegetal

El material vegetal que se utilizó fue: ajo (*A. sativum*) y canela (*C. zeylanicum*). El ajo se obtuvo del mercado municipal de Tenancingo, Estado de México, y la canela de un centro comercial del mismo municipio. En el caso del ajo se utilizó el bulbo (López-Benítez *et al.*, 2005) y para el extracto de canela la corteza (González-Martínez *et al.*, 2017).

6.2. Cepas de *B. cinerea*

Las cepas de *B. cinerea* que se evaluaron fueron la VBc1 y TBc2, ambas provenientes de la colección del laboratorio de Fitopatología. Como antecedente se tiene que fueron aisladas de botones florales de *Rosa hybrida* VBc1 proviene del municipio de Villa Guerrero y TBc2 de la localidad de Santa Ana Ixtlahuatzingo, Tenancingo, Estado de México.

6.3. Preparación de extractos acuosos (EA)

La elaboración de los EA se realizó utilizando la metodología propuesta por Vásquez *et al.* (2013), con modificaciones. De cada especie vegetal se preparó una solución madre al 15 % (peso/volumen), mezclando el material en una licuadora doméstica (Oster® modelo 6808-13) durante 5 minutos.

La mezcla obtenida se depositó en matraces Erlenmeyer y se colocó en un agitador orbital (Skaker® modelo Sk-600) a 250 revoluciones por minuto (rpm) donde se mantuvo durante 24 horas bajo condiciones de laboratorio (temperatura de 21 ± 2 °C). Transcurrido ese tiempo se realizó un filtrado a través de una gasa estéril.

6.4. Preparación del medio de cultivo con extractos acuosos a la concentración de 15, 10 y 5 %

Se preparó una solución al 15 % (relación p/v), a partir de la cual se ajustaron las concentraciones del 5 y 10 %; por separado se mezclaron con 39 g L⁻¹ de medio de cultivo papa, dextrosa, agar (PDA) (marca Bioxon®), enseguida se esterilizaron en autoclave (All American®) durante 15 minutos a 121 °C, posteriormente se vaciaron en cajas de Petri de cristal de 9 cm de diámetro (Kimax®).

Una vez solidificado el medio de cultivo, bajo condiciones de asepsia se sembró en el centro de cada caja de Petri un disco de medio de cultivo PDA de 8 mm de diámetro con crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, de una colonia de 5 a 10 días de edad. El testigo consistió en la siembra del patógeno en medio de cultivo PDA sin extracto acuoso. Todas las siembras se mantuvieron dentro de una incubadora

microbiológica (Riossa®) a temperatura de 25 ± 1 °C, bajo condiciones de obscuridad.

6.5. Variables por evaluar

Con un marcador indeleble de punto fino, se trazó el área de crecimiento micelial por el reverso de las cajas cuando al menos una caja del testigo lleno completamente; este proceso se dio por concluido cuando al menos una repetición del testigo cubrió el área total de medio de cultivo en la caja de Petri.

6.5.1. Área de crecimiento micelial

Una vez concluidas las marcaciones de las cajas de Petri, a cada repetición se le tomó una fotografía del reverso, con una cámara fotográfica (Canon®); y con el apoyo del programa computacional Image J (versión 1.43) se determinó el área de crecimiento micelial.

6.5.2. Efectividad biológica

Se determinó la efectividad biológica de los extractos acuosos de ajo y canela a las tres concentraciones utilizadas mediante la siguiente formula:

$$Pr = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} * 100$$

Donde:

Pr= Efectividad biológica (%)

Po= Mortalidad observada (%)

Pc= Mortalidad del testigo sin extracto acuoso (%)

6.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Los análisis se efectuaron por cada cepa, para lo cual se estableció en un diseño experimental completamente al azar con siete tratamientos y siete repeticiones. Cabe señalar que para asegurar la veracidad de los resultados se llevaron a cabo dos replicas.

Los datos obtenidos del área de crecimiento micelial se analizaron con el programa InfoStat (Versión: estudiantil, 2013) aplicando un análisis de varianza y comparación de medias por medio de la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

7. RESULTADOS

Se realizaron dos réplicas de los experimentos por cada una de las cepas de *B. cinerea* (VBc1 y TBc2), en las que de acuerdo con el análisis de varianza no existieron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) (Anexos 1 y 2). Debido a esto, los resultados por cepa y extracto se analizaron como uno solo calculando el promedio de cada repetición y enseguida se realizaron los análisis correspondientes.

7.1. Cepa VBc1

Con la cepa VBc1 se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en el área de crecimiento micelial, respecto al testigo. De acuerdo con el análisis de varianza no existen diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre los extractos acuosos (EA) de ajo y canela a las concentraciones de 15 y 10 %; no obstante, el EA de canela al 15 y 10 % presentó la mejor efectividad, ya que el crecimiento fue de 0 y 1.1 cm², respectivamente, lo cual significa que al aumentar la concentración de este EA el crecimiento de *B. cinerea* disminuye. Con los EA de ajo al 10, 15 y 5 % se registró un área de crecimiento de 3.3, 6.8 y 9.1 cm², respectivamente, como puede observarse, aun cuando no hubo diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre estos, con el EA de ajo al 10 % el crecimiento micelial fue menor que con la concentración del 15 % (Cuadro 3).

En lo relativo a la efectividad biológica, con el EA de canela al 15 y 10 % se presentó buen efecto, ya que fue del 100 y 96.5 %, respectivamente; a estos le siguieron los

EA de ajo al 10, 15, y 5 %, y el de canela al 5 % con el 90, 78.9, 72 y 40.6 %, respectivamente (Figura 3).

Cuadro 3. Área de crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*, cepa VBc1 con extractos acuosos de ajo y canela al 5, 10 y 15%, cinco días después de la siembra.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm²) *
Canela 15 %	0.0 ^a
Canela 10 %	1.1 ^a
Ajo 10 %	3.3 ^{a b}
Ajo 15 %	6.8 ^{a b}
Ajo 5 %	9.1 ^b
Canela 5 %	19.3 ^c
Testigo	32.5 ^d

*Cifras con literales diferentes indican diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey (P < 0.05).

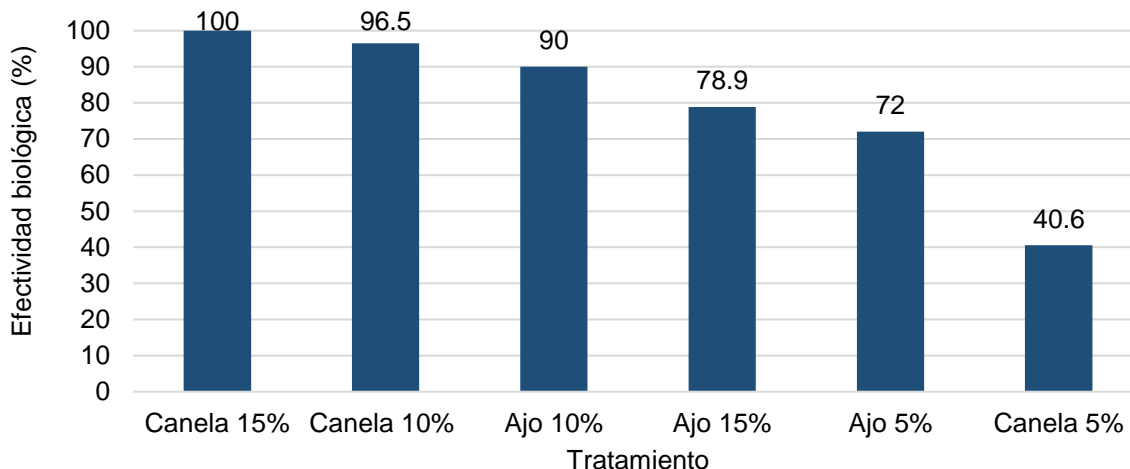


Figura 3. Efectividad biológica (%) de los extractos acuosos de canela y ajo a la concentración de 5, 10 y 15 %, frente a *B. cinerea* cepa VBC1

En cuanto a las características culturales del patógeno, se presentaron diferencias en la coloración y textura del micelio dependiendo del EA y la concentración. El testigo presentó crecimiento irregular, compacto y de coloración grisácea. Todos los tratamientos de EA de ajo presentaron crecimiento circular, compacto, de coloración blanquecina en los extremos de la colonia y en el centro de color grisáceo (Figura 4).

Con el EA de canela las características culturales difirieron entre concentraciones; con el 10 % presentó dos comportamientos: en ocasiones el micelio fue color gris y creció adherido al medio de cultivo y en otras de color blanco algodonoso. En la concentración del 5 % el crecimiento micelial fue blanco algodonoso con el centro grisáceo (Figura 5).

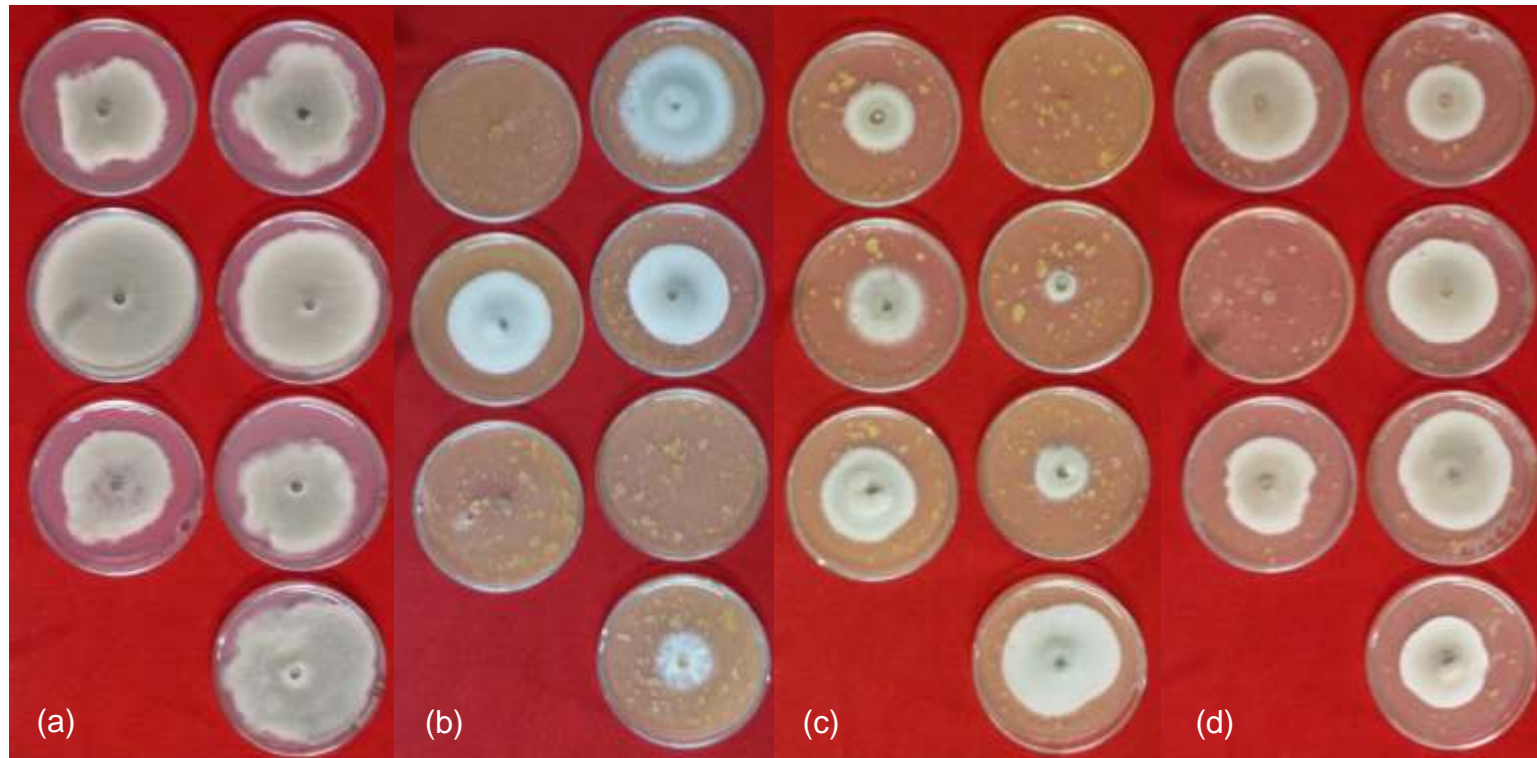


Figura 4. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cepa VBC1, al día cinco después de la siembra en medio de cultivo con EA de ajo. (a) Testigo, (b) 15 %, (c) 10 %, (d) 5 %.

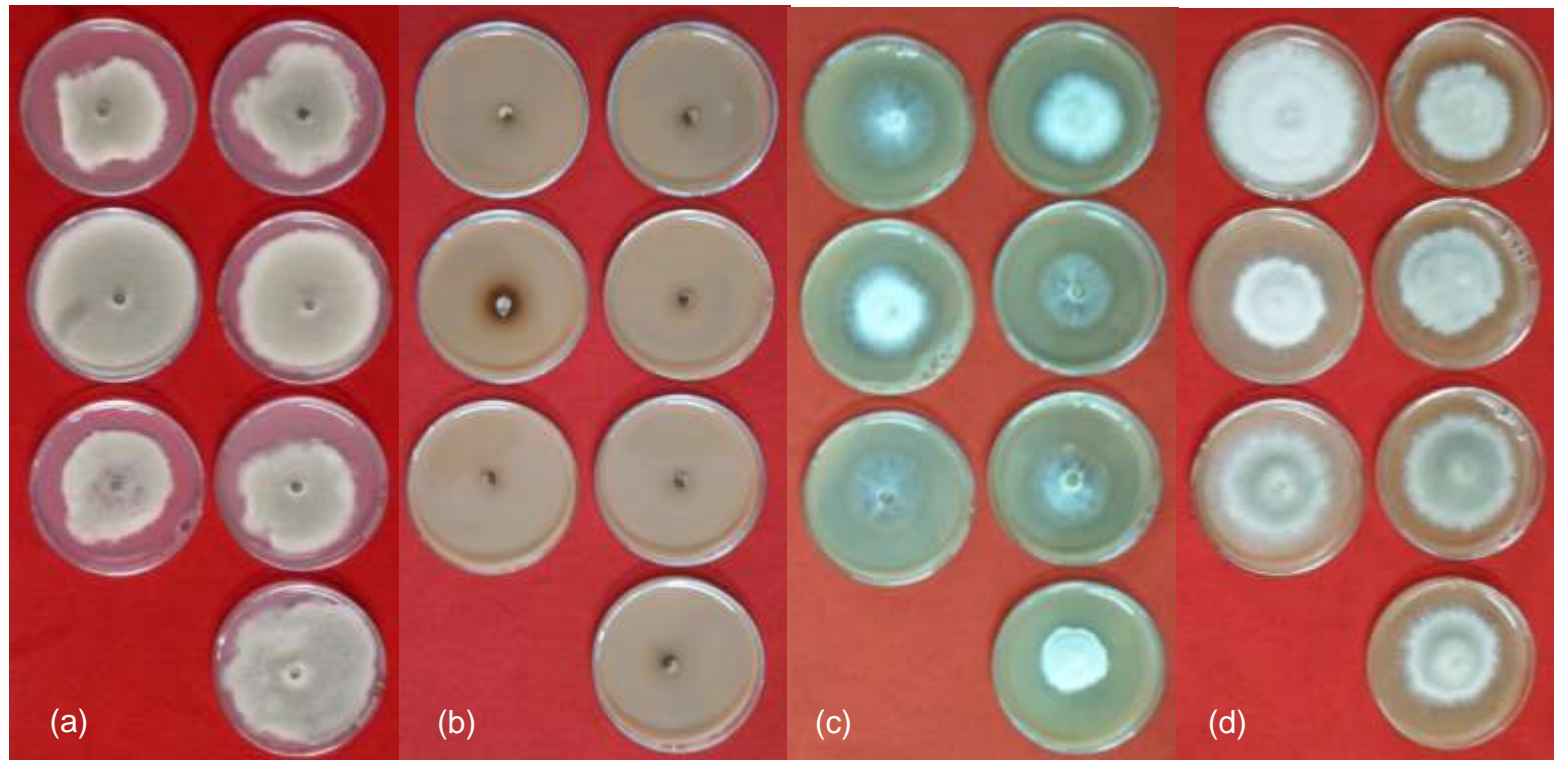


Figura 5. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cepa VBc1, al día cinco después de la siembra en medio de cultivo con EA de canela. (a) Testigo, (b) 15 %, (c) 10 %, (d) 5 %.

7.2. Cepa TBc2

Con la cepa TBc2 se presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en el área de crecimiento micelial con los EA a las diferentes concentraciones, respecto al testigo. De acuerdo con el análisis de varianza no existen diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre los EA de canela al 15 y 10 % y ajo al 15 %; no obstante, de estos tres tratamientos el EA de canela al 15 y 10 % presentó la mejor efectividad, ya que se presentó crecimiento de 0 y 0.96 cm², respectivamente, lo cual indica que al aumentar la concentración de canela disminuye el crecimiento *B. cinerea*. Con los EA de ajo al 15, 10 y 5 % se registró un área de crecimiento de 6.84, 12.51 y 20.97 cm², respectivamente, y de acuerdo con el análisis de varianza no existen diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre las concentraciones del 15 y 10 % de este extracto (Cuadro 4).

En lo que respecta a la efectividad biológica con el EA de canela al 15 y 10 % se presentó buen efecto, ya que esta fue del 100 y 98.28 %, respectivamente; a estos le siguieron los EA de ajo al 15, 10 y 5 % y el de canela al 5 % con el 87.78, 77.65, 62.23 y 54.69 %, respectivamente (Figura 6).

Cuadro 4. Área de crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cepa TBc2 con los extractos acuosos de ajo y canela al 5, 10 y 15%, cinco días después de la siembra.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)
Canela 15 %	0.00 ^a
Canela 10 %	0.96 ^a
Ajo 15 %	6.84 ^{a b}
Ajo 10 %	12.51 ^{b c}
Ajo 5 %	20.97 ^{c d}
Canela 5 %	25.36 ^d
Testigo	55.97 ^e

*Cifras con literales diferentes indican diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey (P < 0.05)

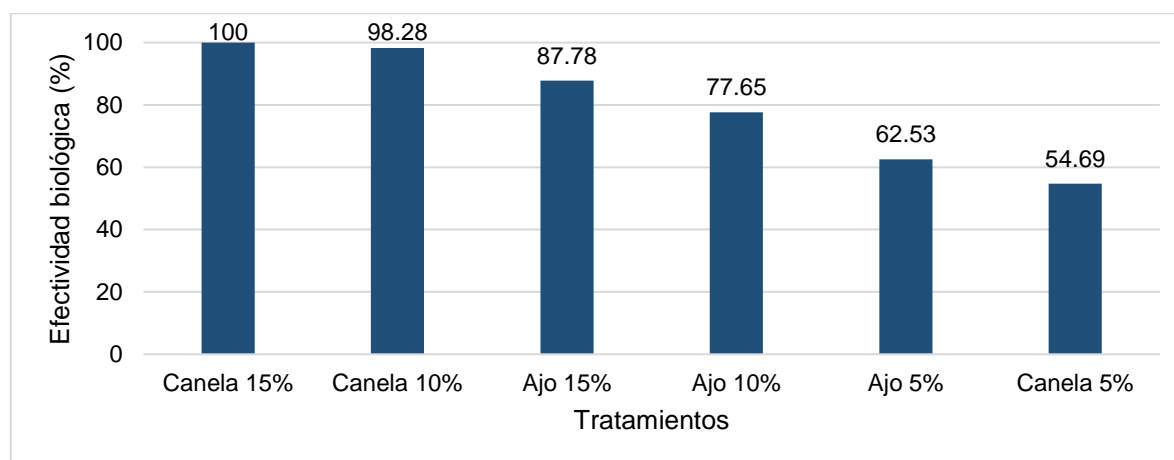


Figura 6. Efectividad biológica (%) de los EA de canela y ajo a la concentración de 5, 10 y 15 %, frente a *B. cinerea* cepa TBc2.

En el medio de cultivo el patógeno presentó diferencias en la coloración y la textura del micelio dependiendo del EA y la concentración. El testigo presentó crecimiento regular, ligeramente algodonoso y de coloración café. Con todos los tratamientos del EA de ajo se presentó crecimiento circular algodonoso, de coloración blanca en los extremos de la colonia y en el centro tendiendo de gris y café oscuro (Figura 7).

En cuanto al EA de canela, claramente se puede observar que en la concentración del 15 % no se tuvo crecimiento alguno de micelio, al 10 % el crecimiento fue casi nulo limitándose a los márgenes del disco de PDA a partir del que se realizó la siembra. Con la concentración del 5 % la cepa mostró un crecimiento algodonoso, de coloración gris a café (Figura 8).

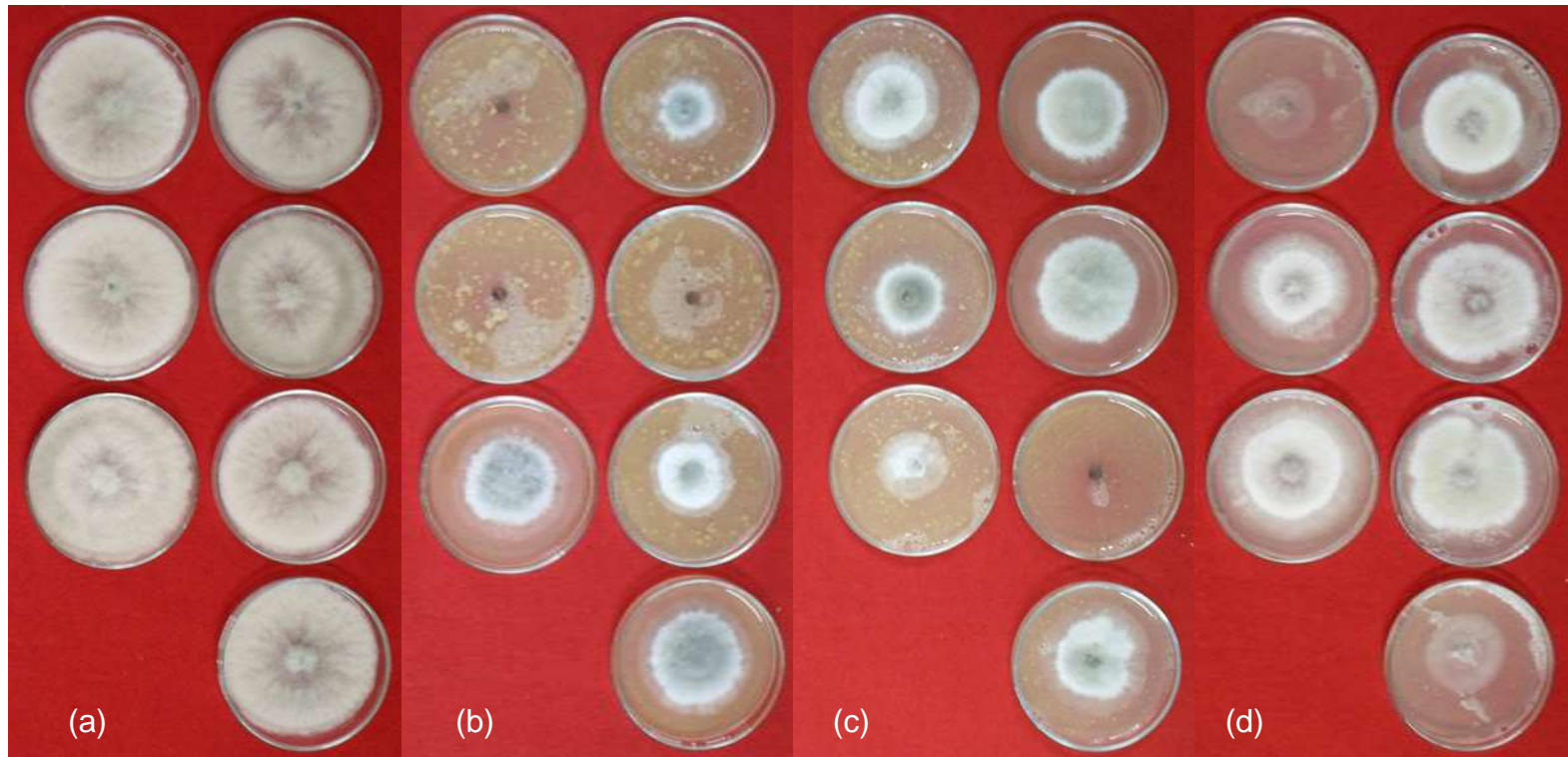


Figura 7. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cepa TBc2, al día cinco después de la siembra en medio de cultivo con EA de ajo. (a) Testigo, (b) 15 %, (c) 10 %, (d) 5 %.

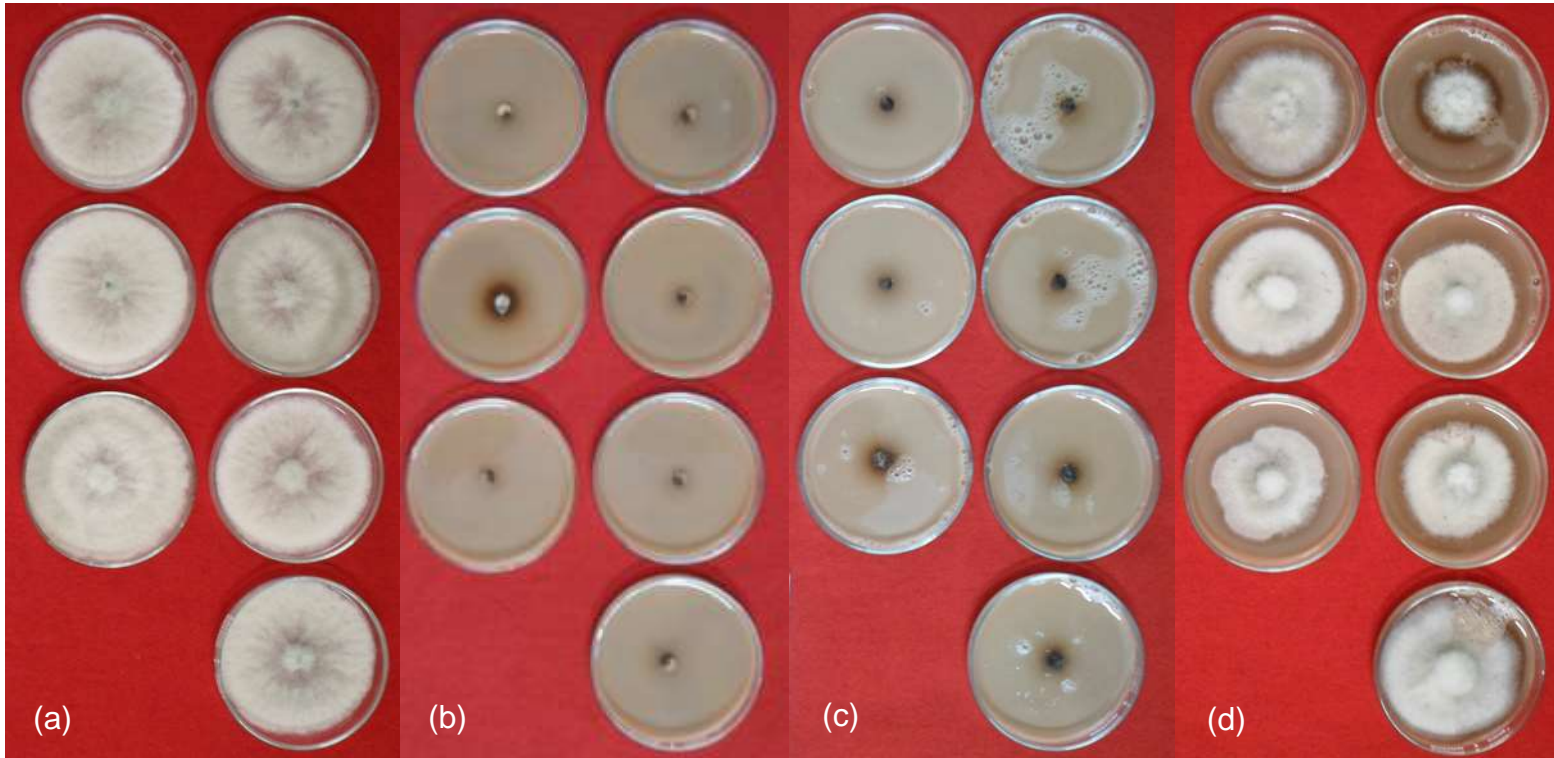


Figura 8. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cepa VBC1, al día cinco después de la siembra en medio de cultivo con EA de canela. (a) Testigo, (b) 15 %, (c) 10 %, (d) 5 %.

7.3. Comparación de la respuesta *in vitro* de *B. cinerea*, cepas VBc1 y TBc2 frente a los EA de ajo y canela

Al comparar el porcentaje de crecimiento micelial de las dos cepas de *B. cinerea* frente a los EA de ajo y canela al 5, 10 y 15 %, se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

7.3.1. Comparación de la respuesta *in vitro* del patógeno frente a los EA de ajo

Los resultados muestran que la efectividad de los EA de ajo estuvo en función de la cepa. Como se observa en el cuadro 5, el menor porcentaje de crecimiento micelial para VBc1 se presentó con el tratamiento del 10 % y para TBc2 con el 15 %, los cuales crecieron 10 % y 12.2 %, respectivamente. Cabe señalar que de acuerdo con la comparación de medias no presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

No se presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) con las concentraciones de los EA al 15 % con VBc1, 10 % con TBc2 y 5 % con VBc1, en las cuales se presentó crecimiento de 21.1 y 22.4 y 28 %, respectivamente. La concentración de menor efectividad fue la del 5 % con TBc2, donde el crecimiento micelial fue de 36.5 % (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de crecimiento micelial de las cepas VBc1 y TBc2 con los EA de ajo.

Concentración de EA de ajo	Cepa	Porcentaje de crecimiento micelial*
10 %	VBc1	10.0 ^a
15 %	TBc2	12.2 ^a
15 %	VBc1	21.1 ^{ab}
10 %	TBc2	22.4 ^{ab}
5 %	VBc1	28.0 ^{ab}
5 %	TBc2	37.5 ^b

*Cifras con literales diferentes indican diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey ($P < 0.05$).

7.3.2. Comparación de la respuesta *in vitro* del patógeno frente a los EA de canela

En los tratamientos del 15 y 10 % no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$); cabe señalar que en la concentración del 15 % el crecimiento fue nulo, mientras que con el 10 % fue de 1.7 y 3.5 % para VBc1 y TBc2, respectivamente. Por otra parte, no presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) con la concentración del 5 %, la cepa TBc2 presentó crecimiento de 45.3 % y la VBc1 de 59.4 %. Los resultados indican que la efectividad del extracto depende de la cepa y la concentración a la que es expuesta (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de crecimiento micelial de VBc1 y TBc2 con los EA de canela.

Concentración de EA de canela	Cepa	Porcentaje de crecimiento micelial*
15 %	VBc1	0 ^a
15 %	TBc2	0 ^a
10 %	TBc2	1.7 ^a
10 %	VBc1	3.5 ^a
5 %	TBc2	45.3 ^b
5 %	VBc1	59.4 ^b

*Cifras con literales diferentes indican diferencias estadísticas. Comparación de medias Tukey (P < 0.05).

8. DISCUSIÓN

Los EA de canela y ajo presentaron alta efectividad frente a las cepas VBc1 y TBc2 de *B. cinerea*, la cual estuvo en función de la concentración de EA y la cepa evaluada. Estos resultados muestran el potencial que tienen los EA como alternativa al manejo químico del patógeno; ya que como lo reportó Camacho (2009) la cepa VBc1 presenta pérdida de sensibilidad a tiabendazol y la TBc2 es insensible a tiabendazol y procloraz; adicionalmente, López (2019) reporta que ambas cepas presentan resistencia a tiabendazol, tal aseveración se basa en que el factor de resistencia para la DL_{95} que es de 18,494.19 para VBc1 y 2,652.37 para la TBc2.

Aunado a la efectividad de los EA, el presente estudio es de especial relevancia debido a que complementa una serie de estudios que han sumado alternativas sostenibles para el manejo de *B. cinerea* proveniente del cultivo de rosa: por ejemplo, se ha determinado que existen cepas nativas de *Trichoderma* spp. con potencial de inhibir el crecimiento micelial y micoparasitarlas a nivel *in vitro* (Alonso, 2020); además, recientemente se han evaluado aceites esenciales de canela y clavo de olor, los cuales presentan efectividad biológica de hasta el 100 % a las concentraciones de 0.03 y 0.04 %, respectivamente (datos por publicar). Cabe señalar que en conjunto estas alternativas, además de ser amigables con el ambiente, contribuyen con la producción de ornamentales inocuos, aspecto de calidad que poco a poco ha cobrado especial atención.

En la presente investigación se obtuvo la mayor efectividad biológica con el EA canela a las concentraciones de 15 y 10 %, cuyos resultados fueron de 100 % y

96.5 % para la cepa VBc1 y de 100 y 98.28 % para TBc2, respectivamente. En este sentido, autores como Velosa *et al.* (2003) reportan que, a nivel *in vitro*, el extracto canela al 50 % (en hidrolato y de purín) reduce el crecimiento micelial, la esporulación y la formación de esclerocios de *B. cinerea* aislado de mora (*Rubus glaucus* Benth); por su parte, Pazmiño-Miranda *et al.* (2017) mencionan que los extractos hidro-etanólicos de esta especie son una alternativa para el manejo del patógeno debido a que el uso de 15 mL L⁻¹ reducen la incidencia y severidad en flores y frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). Aun cuando los resultados contrastados no se obtuvieron a partir de EA, son de utilidad porque muestran el potencial que tiene dicha especie en el manejo del patógeno. En este orden de ideas, se ha reportado que la canela produce compuestos que inhiben el crecimiento no solo de hongos, sino también de oomycetes y bacterias (Nanasombat y Wimuttigosol, 2011; Mercier y Jiménez, 2004); por ejemplo, el aldehído cinámico presenta actividad antibacterial, inhibe el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas (Hitokoto *et al.*, 1980).

En lo que respecta al EA de ajo, se obtuvieron resultados satisfactorios con las concentraciones de 15 y 10 %, con las cuales la efectividad biológica fue de 78.9 y 90 % para la cepa VBc1 y de 87.78 y 77.65 % para TBc2. Resultados similares fueron obtenidos por Aguirre *et al.* (2012) quienes reportan que el extracto de ajo al 100 % (obtenido mediante hidrodestilación) inhibió 10.4 mm del crecimiento micelial *in vitro* del patógeno. Por su parte, Campa-Siqueiros *et al.* (2017), evaluaron la incidencia de la pudrición gris causada por *B. cinerea* en uva de mesa por efecto de extracto de ajo (EHA) y compuestos del mismo como la alicina, dialilsulfuro (DADS)

y dialil trisulfuro (DATS), una vez que los racimos se expusieron a los compuestos mencionados, se inhibió el desarrollo de la enfermedad 14 días a 4 y 25°C, presentando una mejor efectividad a bajas temperaturas. De acuerdo con Ghannoum *et al.* (2004), hongos -incluidos *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*, *Aspergillus niger*, *C. albicans* y *Paracoccidioides*- han mostrado sensibilidad a los compuestos del ajo debido a la disminución en el consumo de oxígeno, lo que provoca reducción del crecimiento e inhibición de la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que en consecuencia ocasionan daños a las membranas.

Como se puede observar, aun cuando en la literatura se encuentran pocos estudios relacionados con la efectividad de EA frente a *B. cinerea*, es evidente que a partir de diversos métodos se pueden obtener compuestos efectivos en el manejo del fitopatógeno. En general, las plantas producen compuestos con propiedades antimicrobianas que a nivel *in vitro* pueden inhibir el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación de las esporas. Es importante señalar que los efectos *in vivo* dependen de varios factores, entre estos: la metrología de preparación, la especie vegetal, el órgano utilizado, la fecha de cosecha, etc. (Hernández *et al.*, 2007).

En el presente estudio se evaluaron extractos vegetales acuosos obtenidos a partir de bulbos frescos de ajo y corteza seca de canela; no obstante, el proceso para obtener metabolitos secundarios de los extractos vegetales es variable; se pueden obtener extractos acuosos (Bautista *et al.*, 2002), polvos (Bautista *et al.*, 2003), o utilizar otros solventes para obtener diferentes compuestos, según su polaridad

(Abou-Jawdah *et al.*, 2002). Cabe señalar que las metodologías y tiempo de preparación también difiere; por lo que, la facilidad de preparación de los EA aunado a los resultados obtenidos, representan una alternativa viable para el manejo del patógeno. Por otro lado, es importante destacar que los efectos *in vitro* e *in vivo* de los EA dependen de varios factores, entre estos: la metodología de preparación, la especie vegetal, el órgano utilizado, la fecha de cosecha, etc. (Hernández *et al.*, 2007).

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos para la cepa VBc1, los mejores tratamientos fueron los extractos acuosos de canela al 15 y 10 %, seguido de ajo al 10 y 15 %, los cuales presentaron una efectividad biológica de 100, 96.5, 90 y 78.9 %, respectivamente.

Los extractos acuosos con mayor efectividad biológica frente a la cepa TBc2 fueron canela al 15 y 10 % y ajo al 15 %, con 100, 98.3 y 87.8 %, respectivamente.

Los resultados muestran que el extracto acuoso de canela 15 y 10 % son efectivos frente a *Botrytis cinerea* cepas VBc1 y TBc2.

10. RECOMENDACIONES

Se sugiere evaluar el extracto acuoso de *A. sativum* y *C. zeylanicum* en campo, ya que los resultados obtenidos en cultivos *in vitro* son competentes para el control de *B. cinerea*.

Realizar estudios para determinar la efectividad de los extractos acuosos de *A. sativum* y *C. zeylanicum* frente a otros hongos fitopatógenos del cultivo de rosa.

11. LITERATURA CITADA

- Abou-Jawdah, Y., Sobh, H. and Salameh, A. 2002. Antymicotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. J. Agric. Food Chem 50 (11): 3208-3213.
- Aegerter, B. J., Nuñez, J. J. and Davis, R. M. 2002. Detection and management of downy mildew in rose rootstock. Plant Diseases. 86(12): 1363-1368 p.
- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. 2ª Edición. Editorial Limusa. Eds. Grupo Noriega. México D. F. 836 p.
- Aguirre, A., Delgado, V., Arango, M. J. y Díaz, N. 2012. Obtención y evaluación *in vitro* de eficiencia de extractos con principios activos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), ajo (*Allium sativum*) y crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) como fungicidas naturales para el control de *Botrytis cinerea*, *Phragmidium mucronatum* y *Sphaerotheca pannosa* presentes en el cultivo de rosas orgánicas. Centro de investigaciones científicas ESPE. Sangolquí, Ecuador. 17.
- Allum, J. F., Bringloe, D. H. and Roberts, A. V. 2010. Interactions of four pathotypes of *Diplocarpon rosae* with species and hybrids of Rosa. Plant Pathol. 59(3): 516-522.
- Alonso B., A. 2020. Actividad antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*,

- patógenos del cultivo de rosa. Tesis de Licenciatura. Tenancingo, Estado de México. 99 p.
- Bañon, A. S., Cifuentes, D., Fernández J. A. y Benavente-García, A. G. 1993. Gerbera, Liliium, Tulipán y Rosa. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 250 p.
- Bañon, A. S., González, B. G. A., Fernández, H. J. A. y Cifuentes, R. D. 1993. Gerbera, Liliium, Tulipan y Rosa. Mundi-Prensa. Madrid. 250 p.
- Bañuelos, H. 2013. Manejo de plantas de rosa bajo condiciones de invernadero. 6 simposio internacional de invernaderos. Puebla. Del 17 al 19 abril de 2013.
- Barnes, S. E. and Shaw, M. W. 2002. Factors affecting symptom production by latent *Botrytis cinerea* in *Primula x polyantha*. Plant Pathology 51: 746-754.
- Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bravo-Luna, L. and Bermúdez-Torres, K. 2002. Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidente of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage. Revista Mexicana de Fitopatología 20(1): 8-12.
- Bautista-Baños, S., García-Domínguez, E., Barrera-Necha, L. L., Reyes-Chilpa, R. and Wilson, C. 2003. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology 29(1): 81-92.

Bender-Bojalil, D. y Bárcenas-Pozos, M. E. 2013. El ajo y sus aplicaciones en la conservación de los alimentos. Revista Temas Selectos Ingeniera en Alimentos 7(1): 25-36.

Benito, E. P., Arranz, M. y Eslava, A. P. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista Iberoamericana de Micología 17: 43-46.

Camacho L., M. D. 2009. Aislamiento de cepas de *Botrytis cinerea* en el cultivo de *Rosa* sp. en la zona de Villa Guerrero, Estado de México y la evaluación de su sensibilidad *in vitro* a fungicidas. Tesis de Licenciatura. Tenancingo, Estado de México. 79 p.

Camargo, P. A. A. y Rodríguez, L. N. F. 2008. Respuestas fenotípicas de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* a la disponibilidad de agua en el suelo. Acta biol. Colombia 13(39): 133-148.

Campa-Siqueiros, P., Vallejo-Cohen, S., Corrales-Maldonado, C., Martínez-Téllez, M. A. y Vargas-Arispuro, I. 2017. Reducción en la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa por el efecto de volátiles de un extracto de ajo. Revista Mexicana de Fitopatología. 35(3): 494-508.

Carbú, M. 2006. Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz. España. 206 p.

Coley-Smith, J. R. 1980. Sclerotia and other structures in survival. pp. 85-114. *In*: Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. (eds) *The Biology of Botrytis*. Academic Perss, London, UK.

CONABIO [Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad]. 1998. La diversidad biológica de México. "Estudio de país". Disponible en Línea: <https://www.gob.mx/conabio>. Fecha de consulta 3 de abril de 2019.

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*10: 564-582.

Darnetty, J.F., Leslie, S., Muthukrishnan, M., Swegle, A.J. and Selentrinnikoff, C.P. 1993. Variability in antifungal proteins in the grains of maize, sorghum and wheat. *Physiologia Plantarum* 88:339-349.

Domínguez, G. F. 1993. *Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas*. 9a Edición. Editorial: Mundi-Prensa. Madrid España. 821 p.

Duke, S., Baerson, S. R., Dayan, F. E. and Rimando. A. 2003. United states department of agriculture-agricultural research service research on natural products for pest management. *Pest Management Science*. 59: 708-717.

Esterio, M. y Auger, J. 1997. Análisis molecular de las poblaciones de *Botrytis* presentes en vides de mesa en Chile, y su implicancia en el manejo de las enfermedades. Folleto divulgativo, pp. 683-690.

Fernández, A. J. 2006. Aplicación de la proteómica a la caracterización de mecanismos de patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Utilización y evaluación

- de nuevos fungicidas. Tesis doctoral. Puerto real, Cádiz, España. Universidad de Cádiz. 83 p.
- Ferrer, M. y Palomo, S. 1986. La producción de rosa en cultivo protegido. Editorial Universal Plantas. S.A. España. 382 p.
- Forbes, G. 2001. Resistance to fungicides. Theory and practice. Disponible en Línea: <https://www.argenpapa.com.ar/img/FUNGICIDAS%20%20RESISTENCIA.pdf>. Fecha de consulta 14 de junio de 2018.
- Gallegos, P., Merino, R., Orellana, H., Proaño, G., Suquilandia, M., Velastegui, R. y Zurita, G. 1999. Manual técnico de fitosanidad en 38 floricultura. Universidad Central del Ecuador (UCE) y Asociación Nacional de Productores y/o Exportadores de Flores del Ecuador. Quito, Ec. 150 p.
- Genoscope. 2008. Sequencing projects of *Botrytis cinerea*. Estimated losses for vineyards in France amount to 15-40% of the harvest, depending on climatic conditions. Disponible en Línea: <http://www.genoscope.cns.fr/spip/Botrytis-cinerea-estimated-losses.html>. Fecha de consulta 23 de abril de 2019.
- Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M., Romero, G., Silvera, E., González, P., Rebellato, J., Ferreira, Y. y Bentancur, O. 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en Uruguay. *Agrociencia Uruguay*. 16(1): 97-107.
- Gessler, C. and Jermini, M. 1985. Role of flower infections of grape by *Botrytis cinerea* y consequences for the spraying schedule. *Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura ed Enologia* 9: 245-253.

Ghannoum, M. A., Hossain, M. A., Long, L., Mohamed, S., Reyes, G. and Mukherjee, P.K. 2004. Evaluation of antifungal efficacy in an optimized animal model of Trichophyton mentagrophytes-dermatophytosis. J. Chemother. 16(2): 139-44.

Ghorbani, R., Wilcockson, S., Koocheki, A. and Leifert, C. 2008. Soil management for sustainable crop disease control: a review. Journal Environmental Chemistry Letters 6: 149-162.

Ghosh, R., Nadiminty, N., Fitzpatrick, J. E., Alworth, W. L., Slaga, T. J. and Kumar, A. P. 2005. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. The Journal of Biological Chemistry 280(7): 5812-5819.

Gill, A. O. y Holley, R. A. 2004. Mecanismos de acción bactericida en cinamaldehido contra *Listeriamonocytogenes* y de eugenol contra *L. monocytogenes* y *Lactobacillus sakei*. Applied and Environmental Microbiology 70: 5750-5755.

Gómez, V. 2001. La podredumbre gris en los cultivos hortícolas del sudeste español. Terralia No.22. Disponible en Línea: <http://www.terralia.com/index.php?revista=22-&articulo=140>. Fecha de consulta 26 de junio de 2019.

Gomora-Jiménez, J. A., Sánchez-Meza, J. C., Pacheco-Salazar, V. F., Pavón-Silva, T. B., Adame-Martínez, S. y Barrientos- Becerra, B. 2006. Integración de indicadores de desempeño ambiental para la producción florícola. Disponible en Línea: https://www.researchgate.net/profile/Juan_Carlos120/

[publications/228443881-INTEGRACION-DE-INDICADORES-DE-DESEMPEÑO-AMBIENTAL-PARA-LA-PRODUCCION-FLORICOLA/links/57fb507208ae280dd0c0268c/INTEGRACION-DE-INDICADORES-DE-DESEMPEÑO-AMBIENTAL-PARA-LA-PRODUCCIONFLORICOLA.pdf?origin=publication_list](https://publications.cesga.gov.co/publication/228443881-INTEGRACION-DE-INDICADORES-DE-DESEMPEÑO-AMBIENTAL-PARA-LA-PRODUCCION-FLORICOLA/links/57fb507208ae280dd0c0268c/INTEGRACION-DE-INDICADORES-DE-DESEMPEÑO-AMBIENTAL-PARA-LA-PRODUCCIONFLORICOLA.pdf?origin=publication_list). Fecha de consulta 22 de abril de 2019.

Gonzalez, V. A. A. 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólico de plantas del amazonas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales, Departamento de Ingeniería Química. 100 p.

González-Martínez, G., García-Velasco, R. y Domínguez-Arizmendi, G. 2017. Actividad antifúngica de extractos vegetales acuosos sobre *Botrytis cinerea*. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 97.

Gordillo, M. O. 2004. Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de la enfermedad moho gris (*Botrytis cinerea*) por tres diferentes extractos hidrosolubles de gobernadora (*Larrea tridentata*. (D.C.) Coville). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila, México. 45 p.

Grayer, R.J. and Harborne, J.B. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. Phytochemistry 37:19-42.

Guédez, C., Cañizález, L., Castillo, C. y Olivar, R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum*. Sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria sp.*) Revista de Sociedad Venezolana de Microbiología. 29(1): 34-38.

Hernández, L. A. N., Bautista, B. S. y Velázquez, V. M. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30(2): 119-123.

Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakal, S. y Kurata, H. 1980. Efectos inhibitorios de especias en el crecimiento y la producción de toxinas de hongos toxigénicos. *Appl. Environ Microbiol*. 39: 818-822.

Hollier, C. A., Overstreet, C. and Holcomb G. E. 2001. *Rose diseases*. Louisiana State University, Agricultural Center. Louisiana, USA. 2613.

Holz, G., Coertze, S. and Williamson, B. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. *Botrytis: Biology Pathology and Control*. Springer, USA. 9-27.

Horst, R. K. and Cloyd, R. A. 2007. *Compendium of Rose Diseases and Pests*. 2nd Edition. APS Press, St. Paul, MN. EE.UU. 83 p.

International Trade Center. 2016. Mexico: fourth producer in worldwide flower production. Disponible en Linea: <http://www.intracen.org/blog/Mexico-fourth-producer-in-worldwide-flower-production/>. Fecha de consulta 07 de mayo de 2021.

Kirk P. M. 2019. Species Fungorum (version Oct 2017). *In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*, 25th March 2019. Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., (eds.). Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the

Netherlands. ISSN 2405-8858. Disponible en Línea:
<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/d779684fe36d98f5c46f2c346d81ac55>. Fecha de consulta 25 de abril de 2019.

Latin, R. 2011. A practical guide to turfgrass fungicides. APS PRESS. St. Paul, Minnesota. USA. 270 p.

Latorre, B. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. 6ed. Santiago de Chile. 638 p.

Latorre, G. B. A. 2013. Control biológico de *Botrytis cinerea* en especies frutales en Chile. pp. 35-44. En: Montealegre, A. J. R. y Pérez R. LM. (Eds). Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Sanidad Vegetal. 147.

Ledezma, E. y Aritz-Castro, R. 1998. Del folklore al mecanismo molecular: el ejemplo del ajoene. *Interciencia* 23 (4): 227-31.

Lediuk, K. D., Lorenzo, L. y Damascos, M. A. 2010. Primer registro de *Podosphaera pannosa* (Ascomycota) sobre *Rosa canina* en Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 45: 231-233.

Lehmann-Danzinger, H. 2004. Introduction to integrated pest management of plant diseases and pests in the tropics/subtropics. Germany University of Göttingen. 396 p.

Lira-Saldivar, R. H., Balvantín-García, G. F., Hernández-Castillo, F. D., Jasso-Cantú, D., and Díaz- Jiménez, F. 2003. Evaluation of resin content and the

antifungal effect of *Larrea tridentata* (Seese and Moc. Ex DC.) Coville extracts from two Mexican deserts against *Pythium* sp. Pringsh. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 97-101.

Lisboa, M. M. A. 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en vid vinífera. Memoria de licenciatura. Universidad de Talca. Talca, Chile. 49 p.

Lizcano, G. M. C. 2007. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de licenciatura. Bogotá D. C. 71 p. Disponible en Línea: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis100.pdf>. Fecha de consulta 25 de abril de 2019.

López, A. N. 2019. Efectividad *in vitro* de Tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario UAEM, Tenancingo. 90 p.

López-Benítez, A., López-Betancourt, S. R., Vázquez-Badillo, M. E., Rodríguez-Herrera, S. A., Mendoza-Elos, M. y Padrón-Corral, E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 183-190. Disponible en Línea:

<http://www.redalyc.org/pdf/612/61223212.pdf>. Fecha de consulta 12 de abril de 2019.

Macnish, A. J., Morris, K. L., Theije, M. G. J., Boerrigter, H. A. M., Reid, M. S., Jiang, C. Z. and Woltering, E. J. 2010. Sodium hypochlorite: A promising agent for reducing *Botrytis cinerea* infection on rose flowers. *Postharvest Biology and Technology* 58: 262-267.

Martsynovska, O. 2011. Global floriculture industry value chain. Position of the Ukrainian firms in the floriculture business. Master Thesis off Master. Lund University. Europe. 62 p.

Mena, V. L., Tamargo, S. B., Sala, O. E., Plaza, P. L. E., Blanco, H. Y., Otero, G. A. y Sierra, G. G. 2015. Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 20(1): 106-116.

Mendoza, D., Piedrahita, A. y Ramírez, E. 2005. Estudio económico comparativo del control manual vs. el control químico de *Peronospora sparsa* en *Rosa* sp. Programa de Agronomía. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. 13: 47-53.

Mendoza, Z. C. 2002. Fungicidas en Ornamentales. pp. 119-147. *In*: Bautista, M. N., J. Alvarado., J. C. Chavarín., H. Sánchez (eds.). Manejo fitosanitario de ornamentales. Instituto de Fitosanidad y Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 237 p.

- Merchán-Gaitán, J. B., Ferrucho, R. L. y Álvarez-Herrera, J. G. 2014. Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 8(1): 44-56.
- Mercier, J. and Jiménez, J. I. 2004. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biology and Technology* 31: 1-8.
- Mohsin, G. A. I. 1990. Le cycle sexue *in vitro* de *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) forme parfaite de *Botrytis cinerea* (Pers.): Dèterminisme; optimisation des conditions d'obtention. Thesis off Doctorate. Université de Lille. 219 p.
- Molina, M. G., Zaldúa, F. S., González, V. G. y Sanfuentes, V. S. E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque* 27(2): 126-134.
- Montes, B. R., Cruz, C. V., Martínez, M. G., Sandoval, G. G., García, L. R., Zilch, D. S., Bravo, L. L., Bermúdez, T. K., Flores, M. H. E. y Carvajal, M. M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18(2): 125-131.
- Moorman, G. W. and Lease, J. L. 1992. Benzimidazole and dicarboximide resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania Greenhouses. *The American Phytopathological Society* 76: 477-480.

Murillo, W. y Salazar, D. 2011. Tendencias verdes en la agricultura para el manejo y control de plagas. Revista Tumbaga 1(6): 63-92.

Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S. and Tzavella-Klonari, K. 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole and dicarboximide fungicides. Plant Disease 91: 407 - 413.

Nanasombat, S. and Wimuttigol, P. 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. Food Science Biotechnology, 20:45-53.

Orellana, H. 2013. Principales enfermedades en flores: Vademécum florícola. 8ª ed. Quito, Ecuador. Editado por Edifarm. 548 p.

Pazmiño-Miranda, P., Velástegui-Espín, G. P., Curay, S., Yáñez-Yáñez, W. y Vásquez, C. 2017. Efecto de los extractos hidro-etanólicos de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y cola de caballo (*Equisetum arvense* L.) sobre la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en fresa. Journal of the Selva Andina Biosphere 5(1):29-38.

Perry, R. H. 1998. Manual del ingeniero químico. 6ta ed TII. Colombia: McGraw-Hill.

Perryman, S., Fitt, B. and Harold, J. 2002. Factors affecting development of *Botrytis cinerea* on linseed (*Linum usitatissimum*) buds, flowers and capsules. Annual of Applied Biology 140: 1-12.

Ponce-González, F., García-Aguirre, M. G., Lozoya-Saldaña, H. y Herrera-Suarez, T. 2002. Resistencia de *Botrytis cinerea* (Pers.) Fr., a dos fungicidas

- benzimidazoles utilizados en la floricultura. Revista Chapingo, Serie Horticultura 8(1): 95-105.
- Ramírez-Concepción, H. R., Castro-Velasco, L. N. y Martínez-Santiago, E. 2016. Efectos terapéuticos del ajo (*Allium sativum*). Salud y Administración 3(8): 39-47.
- Rankovic, B. and Comic, L. 1997. Contribution to the knowledge of fungi of the genus *Sphaerotheca* in Yugoslavia. Mycotaxon 63: 301-305.
- Romero, C. S. 1996. Plagas y enfermedades de Ornamentales. Universidad Autónoma Chapingo. 243 p.
- SAGARPA [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación]. 2015. Listos floricultores para 10 de mayo. Disponible en Línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/edomex/boletines/2015/mayo/Documents/B0352015.pdf>. Fecha de consulta 10 de abril de 2019.
- Senanayake, U. M., Lee, T. H. and Wills, R. B. H. 1978. Volatile constituents of *cinnamom* (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. Journal of Agriculture Food Chemistry 26(4): 822–824.
- Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos. Editado por Secretaría ejecutiva del convenio Andrés Bello (CAB). Santafé de Bogotá, D.C., Colombia, 247.
- SIAP [Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera]. 2019. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en Línea:

<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Fecha de consulta 19 de abril de 2021.

SIAVI [Sistema de Información Arancelaria Vía Internet]. 2019. Estadísticas anuales. Disponible en Línea: <http://www.economia-snci.gob.mx/>. Fecha de consulta 17 de junio de 2019.

Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramírez, L. A., González-Aguilar, G. A., Olivas, I. y Ayala-Zavala, J. F. 2013. Protección antifúngica y enriquecimiento antioxidante de fresa con aceite esencial de hoja de canela. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(3): 217-224.

Smith, M., Dunez, J., Lelliott, R. A., Philips, D. H. y Archer, S. A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Edición española. Editorial Mundi-prensa. Madrid. 37: 671 p.

Soliman K. M. and Badeaa, R. I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40(11): 1669-1675.

Stashenko, E. E. 2009. Aceites esenciales. Universidad Industrial de Santander. República de Colombia. 180.

Suarez, J. 2006. Fertilidad de los suelos y recomendación de fertilización en el rosal (*Rosa* sp.) de Coatepec Harinas, México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Suelos. 67 p.

Tatagiba, J. S., Mafia, L. A., Barreto, R., Alfenas, A. and Sutton, J. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in Residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26(1): 8-19.

Tatagiba, J. S., Mafia, L. A., Barreto, R., Alfenas, A. and Sutton, J. 1998. Biological Control of *Botrytis cinerea* in Residues and Flowers of Rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26(1): 8-19.

Tejeda-Sartorius, O. y Arévalo-Galarza, M. L. 2012. La floricultura, una opción económica rentable para el minifundio mexicano. *Agroproductividad* 5(3): 11-19.

Tsair-Bor, Y. y Shang-Tzen, C. 2008. Los efectos sinérgicos de cinamaldehído en combinación con eugenol contra hongos xilófagos. *Tecnología Bioresource* 99: 232-236.

Urdaneta, L., Sanabria, M. E., Rodríguez, D. y Pérez de Camacaro, M. 2013. Grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Gliricidia sepium* y su potencial antifúngico sobre *Colletotrichum acutatum*. *Interciencia* 38 (6): 449-454.

Van Den Bosch, F., Paveley, N., Shaw, M., Hobbelen, P. and Oliver, R. 2011. The dose rate debate does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose. *Plant Pathology* 60: 597–606.

Van Hemert, N. 2005. E-business and the dutch flower industry. A survey for strategic opportunities. *In: proc. of the 15th Annual World Food and*

- Agribusiness Forum, Symposium and Case Conference (IAMA). Chicago, IL. USA. 1-15 p.
- Van Kan, J. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11(5): 247-253.
- Van Uffelen, R. L. M. and Groot, N. S. P. 2005. Floriculture World Wide; production, trade and consumption patterns show market opportunities and challenges. Wageningen University and Research. 11 p.
- Vásquez, C. D. A., Montes, B. R., Jiménez P. A. y Flores, M. H. E. 2013. Aceites esenciales y extractos acuosos para el manejo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: 170-179. Disponible en Linea: <https://www.redalyc.org/pdf/612/61231509008.pdf>. Fecha de consulta 8 de abril de 2019.
- Velosa, M., Ramírez, S., Miño, J., Uricoechea, J., Ramírez, J. y González, C. 2003. Manejo biológico de la pudrición del fruto (*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr.) en la mora (*Rubus glaucus* Benth) en condiciones de laboratorio. Memorias del XXIV Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Armenia, Quindío, Colombia. 3-4 p.
- Whitaker, V. M. and Hokanson, S. C. 2009. Breeding roses for disease resistance. In: Janick, J. (ed). *Plant Breeding Reviews*. Vol. 31. Board. New York, USA. pp: 277-324.

Whitaker, V. M. and Hokanson, S. C. 2009. Breeding roses for disease resistance. In Plant Breeding Reviews 31: 324 p.

Wijnands, J. H. M., Bijman, J. and Huirne, R. B. M. 2007. Impact of institutions on the performance of the flower industry in developing countries. Wageningen University. 18 p.

Wilson, C. L., Ghaouth, A. E. I. y Wisniewski, M. E. 1999. Prospecting in nature's storehouse for biopesticides. Revista Mexicana de Fitopatología 17(1): 49-53.

Wilson, C. L., Solar, J. M., Ghaouth, E. A., and Wisniewski, M. E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81: 204-210.

Xu, X. M. 1999. Effects of temperature on the length of the incubation period of rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*). Eur. J. Plant Pathol. 105: 13-21.

12. ANEXOS

Anexo 1. Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* cepa VBc1, en las réplicas 1 y 2, con los extractos acuosos de ajo y canela a las concentraciones de 5, 10 y 15 %, cinco días después de la siembra.

Repetición	Testigo		Ajo						Canela					
			5 %		10 %		15 %		5 %		10 %		15 %	
	*R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	17.36	36.93	10.08	0	0	0	8.10	0	23.01	14.70	0	4.57	0	0
2	33.26	41.89	18.60	10.65	0.35	8.65	10.63	22.24	14.32	13.30	0	0.24	0	0
3	19.20	33.47	14.80	8.49	3.59	0	0	0	14	15.30	0	1.21	0	0
4	35.33	32.95	16.35	13.06	8.61	0	0	21.56	36.41	13.28	0	3.45	0	0
5	27.41	35.02	9.76	13.22	4.71	8.98	0	10.69	19.12	19.67	0	1.27	0	0
6	42.70	44.20	0	3.45	2.91	0	8.81	0	18.52	17.48	0	4.33	0	0
7	23.49	32.19	9.02	0	7.84	0	0	14.17	34.50	16.67	0	0.74	0	0
Promedio**	28.39	36.66	11.23	6.98	4	2.52	3.93	9.81	22.84	15.77	0	2.26	0	0

*R= réplica

**No existen diferencias estadísticas entre réplicas por tratamiento. Comparación de medias Tukey (P<0.05).

Anexo 2. Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* cepa TBc2, en las réplicas 1 y 2, con los extractos acuosos de ajo y canela a las concentraciones de 5, 10 y 15 %, cinco días después de la siembra.

Repetición	Testigo		Ajo						Canela					
			5 %		10 %		15 %		5 %		10 %		15 %	
	*R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	56.24	56.24	24.25	2.68	22.38	12.53	7.95	8.96	0	10.63	0	0	0	0
2	56.24	56.24	32.77	21.68	26.16	23.23	0	9.65	25.16	30.73	0	0	0	0
3	56.24	56.24	38.90	28.38	0	6.44	8.90	4.75	27.94	27.45	13.39	0	0	0
4	55.16	56.24	1.75	41.61	18.97	0	19.89	0.31	28.97	41.34	0	0	0	0
5	53.49	56.24	0	17.59	11	23.90	0	4.18	20.91	34.61	0	0	0	0
6	56.24	56.24	11.57	27.25	13.65	4.35	0	3.76	22.76	35.53	0	0	0	0
7	56.24	56.24	20.77	24.36	3.59	8.93	19.20	8.26	25.89	23.08	0	0	0	0
Promedio**	55.69	56.24	18.57	23.36	13.68	11.34	7.99	5.70	21.66	29.05	1.91	0	0	0

*R= réplica

**No existen diferencias estadísticas entre réplicas por tratamiento. Comparación de medias Tukey (P<0.05).