



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Centro Universitario UAEM Tenancingo



Efectividad *in vitro* de aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* y *Syzygium aromaticum* frente a *Botrytis cinerea* Pers.

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**

P R E S E N T A

JOCELYN MENDOZA ARANDA

DIRECTORES

M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi

Dr. en C. Rómulo García Velasco

ASESORA

Dra. Martha Elena Mora Herrera

Tenancingo, Estado de México

Diciembre de 2021

Contenido

ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	V
RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Importancia del cultivo de rosa	3
2.2. Generalidades de <i>Botrytis cinerea</i>	4
2.2.1. Clasificación taxonómica de <i>B. cinerea</i>	5
2.2.2. Características morfológicas de <i>B. cinerea</i>	6
2.2.3. Síntomas causados por <i>B. cinerea</i> en <i>Rosa hybrida</i>	7
2.2.4. Ciclo de infección.....	8
2.2.5. Estrategias de manejo de <i>B. cinerea</i>	10
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
5.1. Objetivo general.....	25
5.1.2. Objetivos específicos	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Ubicación de la investigación	26
6.2. Material biológico.....	26
6.3. Preparación de medio de cultivo PDA	26
6.4. Reactivación de la cepa de <i>B. cinerea</i> TBc2	27
6.5. Preparación de medio de cultivo PDA con aceites esenciales.....	27
6.6. Siembra de <i>B. cinerea</i>	29
6.7. Variables evaluadas	29
6.8. Diseño experimental y análisis estadístico.....	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Aceite esencial de canela	32

7.2. Aceite esencial de clavo de olor	36
7.3. Mortalidad <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> frente a los aceites esenciales de canela y clavo .	40
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	47
10. RECOMENDACIONES	48
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
12. ANEXOS	60
Anexo 1	60
Anexo 2	61
Anexo 3	62
ESCALA DIAGRAMÁTICA DE SEVERIDAD DE <i>Botrytis cinerea</i> EN <i>Rosa hybrida</i> CULTIVAR POLAR	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Superficie cultivada y valor de la producción de <i>Rosa hybrida</i> en los municipios de Villa Guerrero, Tenancingo y Coatepec de Harinas, Estado de México.....	3
Cuadro 2. Concentraciones evaluadas de los aceites esenciales de canela y clavo de olor.....	28
Cuadro 3. Área de crecimiento micelial (cm ²) de <i>B. cinerea</i> , réplicas 1 y 2, cinco días después de la siembra con los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20®, y aceite esencial de canela, clavo y tomillo, a las concentraciones de 0.01 %, 0.02 %, 0.03 %, 0.04 % y 0.05%.....	31
Cuadro 4. Comparación de medias del área de crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> cinco días después de la siembra, con los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20®, y aceite esencial de canela a las concentraciones de 0.01 %, 0.02 %, 0.03 % y 0.04 %.....	33
Cuadro 5. Comparación de medias del área de crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> cinco días después de la siembra, con los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20® y aceite esencial de clavo de olor a las concentraciones de 0.01 %, 0.02 %, 0.03 % 0.04 % y 0.05 %.....	37
Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad de <i>B. cinerea</i> con los aceites esenciales de canela (C) y clavo de olor (Co) a la concentración de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 %.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Botrytis cinerea</i>	9
Figura 2. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de canela a la concentración de 0.01, 0.02, 0.030, 0.04 y 0.05 %, frente a <i>B. cinerea</i>	34
Figura 3. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> cinco días después de la siembra, en medio de cultivo con los tratamientos: (a) testigo absoluto, (b) testigo + Tween 20®, (c) canela al 0.01 % y (d) canela 0.02 %.....	35
Figura 4. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de clavo a la concentración de 0.01, 0.02, 0.030, 0.04 y 0.05 %, frente a <i>B. cinerea</i> ..	38
Figura 5. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> cinco días después de la siembra, en medio de cultivo con los tratamientos: (a) testigo absoluto, (b) testigo + Tween 20®, (c) clavo de olor al 0.01 %, (d) clavo de olor al 0.02 % y (e) clavo de olor al 0.03 %.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Área de crecimiento micelial de *B. cinerea* al día cinco después de la siembra en las réplicas 1 y 2 sometida a los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20[®], y aceite esencial de canela a las concentraciones de 0.01 %, 0.02 %, 0.03 %, 0.04 % y 0.05%.....60

Anexo 2. Área de crecimiento micelial de *B. cinerea* al día cinco después de la siembra en las réplicas 1 y 2 sometida a los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20[®], y aceite esencial de clavo a las concentraciones de 0.01 %, 0.02 %, 0.03 %, 0.04 % y 0.05 %.....61

Anexo 3. Escala diagramática de severidad de *Botrytis cinerea* en *Rosa hybrida* cultivar polar.....62

RESUMEN

Botrytis cinerea Pers. es el agente causal del “moho gris” del cultivo de *Rosa hybrida*, la enfermedad provoca serias afectaciones en las flores a lo largo de la etapa de producción, almacenamiento y transporte. En la región florícola del Estado de México, el patógeno se maneja a través del uso de fungicidas, a los que (de acuerdo con recientes estudios) ha perdido sensibilidad y desarrollando resistencia. Por lo que es importante la búsqueda de estrategias de manejo eficientes y a su vez amigables con el ambiente; una de estas, es el uso de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), que de acuerdo con diversos estudios son efectivos para el manejo de hongos fitopatógenos, entre estos *B. cinerea*. Derivado de lo anterior, se planteó por objetivo: determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) frente a *Botrytis cinerea* proveniente de botones florales de rosa.

Se utilizó la cepa de *B. cinerea* TBc2, que fue sometida *in vitro* a los aceites esenciales de canela y clavo de olor a las concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 %, un testigo + Tween 20® y un testigo absoluto (estos últimos sin aceites esenciales). Por aceite esencial y concentración se determinó el crecimiento micelial y la efectividad biológica; adicionalmente, se realizó un análisis comparativo entre la mortalidad causada por ambos aceites. Los datos de crecimiento micelial y mortalidad se analizaron por medio de un ANOVA de una vía y comparación de medias Tukey ($P < 0.05$) con el programa InfoStat versión 2020e.

La respuesta del patógeno estuvo en función del aceite esencial y la concentración a la que fue expuesto. En lo que respecta al aceite esencial de canela, se presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre el testigo absoluto y todas las concentraciones evaluadas; la concentración de 0.02 % fue de los mejores tratamientos, con este el crecimiento micelial se redujo considerablemente a 6.65 cm², equivalente a una efectividad biológica de 87.19 %; no obstante, la mejor respuesta se observó a partir de la concentración del 0.03 %, con la que se presentó efectividad biológica del 100 %. Con el aceite esencial de clavo de olor la concentración de 0.01 % no fue diferente estadísticamente al testigo absoluto, pero sí en comparación con las demás concentraciones ($P < 0.05$); con 0.03 % se registró crecimiento micelial de 1.92 cm², equivalente al 80.56 % de efectividad biológica, mientras que con las concentraciones 0.04 y 0.05 % se presentó efectividad biológica del 100 %. Los resultados obtenidos evidencian el potencial que tienen los aceites esenciales de canela y clavo de olor a las concentraciones de 0.03 y 0.04 %, respectivamente, para el manejo de la enfermedad del moho gris provocado por *B. cinerea*.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la rosa como flor de corte es una de las especies más conocidas, cultivadas y solicitadas; su insuperable belleza, la amplia variedad de colores, tonos y combinaciones, su suave fragancia y la diversidad de formas, la hacen un elemento de exquisita plasticidad para ocupar un lugar preferente en la decoración y el gusto del público consumidor (Yong, 2004).

De acuerdo con datos del SIAP (2020), en el año 2018 en el Estado de México se cultivaron 849 ha, con un valor de la producción de MNX \$ 1643, 010,150.00. El cultivo es afectado tanto en campo abierto como en invernadero por un complejo de organismos fitopatógenos entre ellos *Botrytis cinerea* Pers., que actúa como un hongo necrótrfico, lo que implica que es capaz de matar las células del hospedero durante el proceso de infección.

En la región florícola del Estado de México, el manejo del fitopatógeno se realiza principalmente por medio de la aplicación de fungicidas; no obstante, de acuerdo con García (2017), ha perdido sensibilidad a tiabendazol y probablemente al cloratalonil; además, se ha reportado que en algunos casos ha desarrollado resistencia (López, 2019; Manzanos-Ayala *et al.*, 2019). Por esta problemática se requieren productos alternativos para su manejo, entre los que se encuentran los extractos acuosos (EA) y aceites esenciales (AE) de origen vegetal.

Los AE son sustancias olorosas obtenidas a partir de plantas mediante destilación en corriente de vapor o por expresión del material vegetal entre otras. Proviene fundamentalmente del metabolismo secundario de los vegetales superiores en los que ejercen funciones de defensa y atracción. Tras su producción, los aceites esenciales se almacenan en distintos órganos de la planta; por ejemplo, en el caso del jengibre y cúrcuma se obtienen aceites de la raíz y rizomas, del anís, hinojo y enebro del fruto y de la mostaza a partir de la semilla. En general el rendimiento de la extracción es muy bajo, variando entre el 0.01 y el 2 %. Los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos de aromas volátiles pertenecientes a diferentes clases de la química orgánica: hidrocarburos (compuestos terpénicos), alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles. Obteniéndose de la canela (cinamaldehído), clavo (eugenol), oregano (carvarol), eucalipto (cineol) y tomillo (timol) entre otros (Zekaria, s/a).

La importancia de esta nueva tendencia en los extractos (extractos acuosos, etanólicos, acetónicos y aceites esenciales) se debe a su efectividad ante los patógenos, ya que de acuerdo con diversos estudios tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos fitopatógenos; por lo que, representan una alternativa económica y eficiente. Por lo anterior la presente investigación tiene por objetivo: determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) frente a *Botrytis cinerea* proveniente de botones florales de rosa.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del cultivo de rosa

A nivel nacional en el año 2018 se cultivaron con rosa 1,682 ha con un valor de la producción de MNX \$ 2162, 865,050.00 Los estados con mayor superficie son el Estado de México, Puebla, Morelos, Querétaro entre otros. Cultivándose en el Estado de México 849 ha, cuyo valor fue de MNX\$ 1643, 010,150.00; la mayor producción se concentra en los municipios de Villa Guerrero, Tenancingo y Coatepec Harinas, con una superficie de 758 ha y valor de la producción de MNX \$1425,524,730.00 (SIAP, 2020) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Superficie cultivada y valor de la producción de *Rosa hybrida* en los municipios de Villa Guerrero, Tenancingo y Coatepec de Harinas, Estado de México.

Municipio	Superficie (ha)	Valor de la producción (MNX \$)
Villa Guerrero	450.00	696,504,250.00
Tenancingo	204.00	548,274,000.00
Coatepec Harinas	104.00	180,746,480.00

Fuente: SIAP (2020).

2.2. Generalidades de *Botrytis cinerea*

El género *Botrytis* representa a uno de los hongos fitopatógenos y saprófitos de mayor distribución geográfica, afecta una amplia variedad de especies de plantas, es responsable de la enfermedad conocida como el “moho gris” en cientos de plantas dicotiledóneas, cuyos daños en muchos casos alcanzan pérdidas totales del cultivo (Holz *et al.*, 2007).

Se ha registrado que las especies de *Botrytis* atacan a un total de 596 géneros de plantas vasculares, que representan más de 1400 especies de plantas, aunque es muy probable que el rango de hospedadores sea mucho más amplio, ya que hay informes limitados de enfermedades en plantas silvestres. Geográficamente, *Botrytis* spp. se presenta en cualquier lugar donde se cultiven sus plantas hospedantes, desde áreas tropicales y subtropicales hasta zonas templadas frías de las regiones del mundo del norte y sur, incluidas las regiones donde las plantas se cultivan en climas extremadamente fríos o donde se practica la agricultura en el desierto (Elad *et al.*, 2016).

La enfermedad del moho gris afecta casi todas las etapas de las plantas atacadas: durante el crecimiento, almacenamiento y transporte del producto final. Por lo tanto, la presencia ubicua de *B. cinerea* se manifiesta como graves pérdidas económicas para la industria hortícola y frutícola; en este sentido, se ha estimado que al menos el 20% de los cultivos mundiales se ven afectados por *B. cinerea.*, conduciendo a

pérdidas económicas de alrededor de 10 a 100 millones de dólares al año (Brito *et al.*, 2021).

Botrytis cinerea es común en diferentes tipos de flores de exportación cultivadas bajo invernadero; además es uno de los principales problemas en la producción de rosas de corte en el Estado de México, en donde puede ocasionar pérdidas importantes tanto en campo como en postcosecha (Camacho, 2009).

2.2.1. Clasificación taxonómica de *B. cinerea*

De acuerdo con Kirk (2020), *B. cinerea* se encuentra ubicado en la siguiente clasificación taxonómica:

Phylum: Ascomycota

Clase: Leotiomycetes

Orden: Heliales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: *Botryotinia* (*Botrytis* anamórfico)

Especie: *B. fuckeliana* Whetzel (*B. cinerea* Pers.)

2.2.2. Características morfológicas de *B. cinerea*

Botrytis cinerea se caracteriza por sus conidióforos ramificados, que regularmente se encuentran en la superficie de los tejidos infectados y se originan principalmente de la masa de las hifas, aunque también pueden hacerlo a partir de los esclerocios (Rojas, 2016). Produce microconidios y macronidios; los micronidios al parecer no cumplen ninguna función en la infección de los tejidos vegetales, pero corresponden a los gametos masculinos unicelulares, es decir son los espermacios que actúan en la reproducción sexual del hongo. Por su parte, los macroconidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo, son hialinos, unicelulares, ovoides, multinucleados con 3 a 18 núcleos (Holz *et al.*, 2007), presentan forma de amerospora ovoide o elipsoidales, un tanto redondeados incoloros de color marrón claro, cuyo tamaño es de: (9.63) 10.25-14.55 (14.86) x (6.80) 7.33–11.79 (13.28) μm (Rojas, 2016). Son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo (Holz *et al.*, 2007).

Todas las especies de *Botrytis* forman esclerocios los cuales difieren de forma y tamaño, dependiendo del aislado y condiciones de cultivo; se considera que dichas estructuras están involucradas en la sobrevivencia de especies del género (Rojas, 2016). Los aislados de *B. cinerea* presentan cierta variabilidad en la morfología del hongo en medio de cultivo; en este sentido, Rojas (2016) reporta que colonias de cinco días de edad presentan micelio de color blanquecino a gris claro, que

posteriormente cambia a textura algodonosa con exuberante cantidad de micelio de color gris oscuro.

2.2.3. Síntomas causados por *B. cinerea* en *Rosa hybrida*

Los síntomas por *Botrytis* se observan principalmente en las flores y botones florales, pero también se presenta en los tallos, en las yemas y de manera esporádica en hojas. Los tejidos debilitados o lesionados, como heridas y tejidos vegetales envejecidos también son susceptibles a la infección. Los síntomas iniciales se manifiestan en los tejidos blandos de las plantas, aparecen como pequeñas manchas de color marrón, aparentando estar empapadas de agua que posteriormente se convierten en un moho gris conformado por micelio, conidióforos y conidios. Los pétalos de las flores con altos niveles de infección pueden enredarse y pegarse; este deterioro es común cuando persisten condiciones favorables para el patógeno (Ong y Brake, S/A; Horst y Cloy, 2007). Otro tipo de daños se asocian con heridas donde se han cortado flores o se han podado las plantas, lo que provoca la muerte descendente del tallo. En estacas tomadas para propagación, el hongo puede entrar a través de las heridas ocasionadas por el corte y matar ramas jóvenes e incluso la estaca completa (Ong y Brake, S/A).

En general, el patógeno puede afectar a las flores bajo condiciones de invernadero, durante el almacenamiento y transporte. En la superficie de los pétalos infectados es común observar agrupaciones de conidios del hongo. A partir de la flor el hongo avanza hacia el cáliz, el pedúnculo y el tallo esto se debe a que los tejidos vegetales

son más susceptibles a la infección en la medida en que envejecen (Horst y Cloy, 2007).

2.2.4. Ciclo de infección

Las esporas de *B. cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal infectado y transportadas a grandes distancias por corrientes de aire. Una vez que la spora se ha depositado sobre la superficie del huésped se inicia el ciclo de infección, este puede dividirse en varias fases tal y como lo mencionan Benito y colaboradores (2000) (Figura 1):

- 1) Adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped.
- 2) Penetración en el tejido vegetal a través de heridas, aberturas naturales, o bien directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración en algunos sistemas).
- 3) Establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta.
- 4) En algunos casos inicia una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en las áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias.

5) Transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación en el tejido vegetal circundante a partir de aquéllas, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.

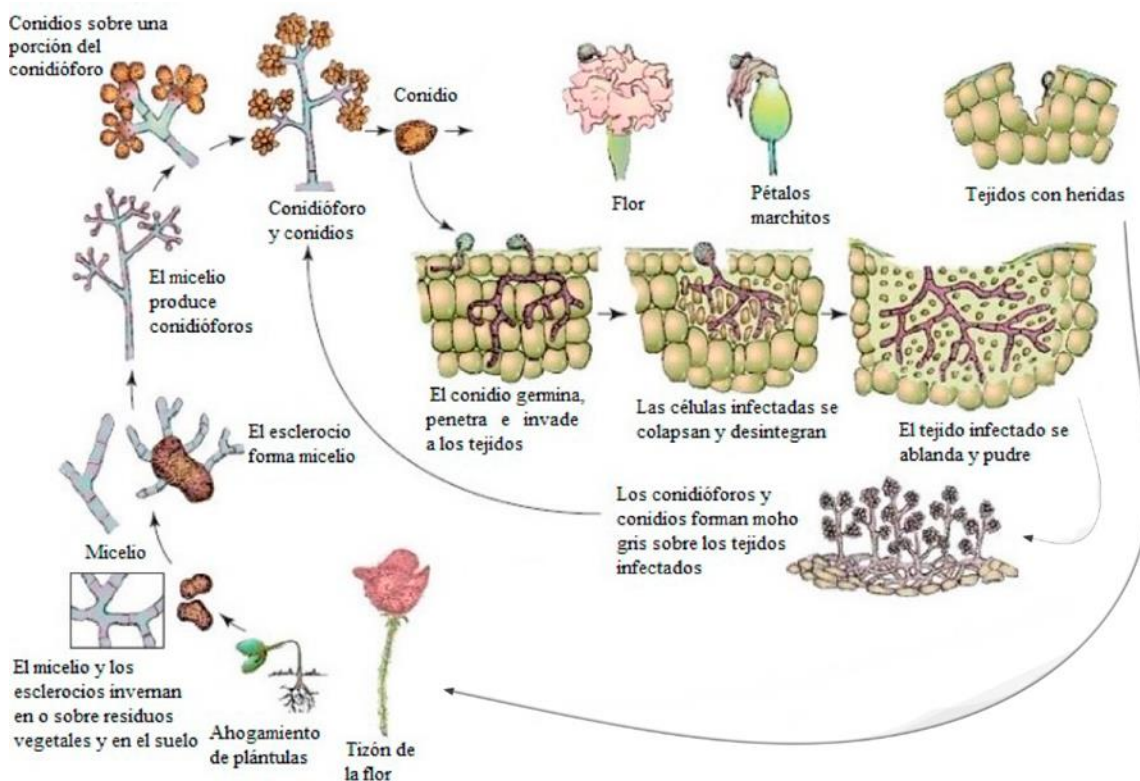


Figura 1. Ciclo biológico de *Botrytis cinerea* (Fuente: Agrios, 2005).

2.2.5. Estrategias de manejo de *B. cinerea*

El uso apropiado de productos químicos para la protección de cultivos es aún el principal camino para combatir este hongo; sin embargo, se debe tener en cuenta que existen reportes de pérdida de sensibilidad y desarrollo de resistencia a diferentes ingredientes activos (Manzanos-Ayala, 2019; Camacho, 2009). Actualmente el manejo de la enfermedad se logra integrando medidas para disminuir la cantidad de inóculo presente y el uso de tratamientos fungicidas en momentos críticos de la infección.

2.2.5.1. Manejo con fungicidas de origen químico

El control químico con fungicidas sigue siendo la principal forma de reducir la incidencia y severidad del moho gris (*Botrytis* spp.) en cultivos de importancia económica. Las dosis aplicadas varían de 2000-3000 g ha⁻¹ (p. e. maneb, tiram, dichlofluanid) o, a 400-500 g ha⁻¹ con los fungicidas carbendazim, fludioxonil, pirimetanil entre otros. Sin embargo, este método se ve obstaculizado por el desarrollo de resistencia a muchos botrycidas y la percepción pública negativa sobre la seguridad de los plaguicidas. Como consecuencia, en diversos países, las autoridades regulatorias han restringido el uso de nuevos fungicidas registrados para este patógeno; también han recomendado limitar, a una, el número de aplicaciones por temporada de cada familia de fungicidas, con la finalidad de evitar el desarrollo de resistencia y al mismo tiempo evitar que se superen los valores del límite máximo de residuos (LMR). Son varias las familias de fungicidas sintéticos

disponibles para *Botrytis*, las cuales se clasifican según sus modos de acción bioquímicos:

1. Fungicidas que afectan la respiración fúngica.
2. Tóxicos a los microtúbulos.
3. Compuestos que afectan la osmorregulación.
4. Fungicidas cuya toxicidad es revertida por los aminoácidos.
5. Inhibidores de la biosíntesis de esteroides (Leroux, 2007).

2.2.5.2. Manejo cultural

Para reducir los daños que ocasiona *B. cinerea* en el cultivo de rosa es recomendable cortar, 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 estas (Romero, 1993).

2.2.5.3. Manejo biológico

Algunos de los microorganismos más usados como agentes de control biológico son hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*. El género *Trichoderma* spp., destaca por ser el más utilizado para el biocontrol de patógenos fúngicos, presenta diferentes mecanismos de acción: micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes, antibiosis por efecto de metabolitos volátiles y difusibles, desactivación

de enzimas del patógeno, inducción de resistencia sistémica en las plantas y estimulación del crecimiento vegetal (Companioni *et al.*, 2019)

Ong y Brake (S/A), señalan que algunos fungicidas biológicos comerciales, tales como Actinovate[®] (*Streptomyces lydicus*) o PlantShield[®] (*T. harzianum*), pueden proporcionar cierta protección contra *B. cinerea* cuando se usan de manera preventiva en el cultivo de rosa.

En un estudio en el que se evaluó la efectividad *in vitro* de *T. asperellum* (cepa TFR3), *T. tomentosum* (cepa SS1), *T. harzianum* (TA4) y *T. barbatum* (cepa SS2) frente a *B. cinerea* aislado del cultivo de rosa, se registró inhibición del crecimiento micelial del patógeno en un 67.7, 67.2, 65.8 y 43.3% respectivamente; así mismo, se reportó alto porcentaje de inhibición de crecimiento micelial por efecto de metabolitos volátiles y metabolitos difusibles. Las cuatro especies de *Trichoderma* evaluadas presentaron micoparasitismo, que consiste en la adhesión del micelio y la penetración de haustorios; además, en el caso de las cepas SS1 y TA4 presentaron superenrollamiento al micelio de *B. cinerea* (Alonso, 2020).

2.2.5.4. Manejo con extractos vegetales

Los extractos vegetales, son mezclas de compuestos con propiedad antifúngica que pueden afectar a patógenos, ya sea de manera individual o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones (Villa-Martínez *et al.*, 2015). Se ha demostrado también la capacidad de algunos extractos vegetales en la inducción de síntesis de enzimas propias de la planta huésped y fortalecer así su respuesta

defensiva ante el ataque de patógenos; en este sentido Hanaa *et al.* (2011), reportan que al emplear extractos acuosos de neem (*Azardiachta indica*) y sauce (*Salix babylonica*) en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) redujeron la incidencia de la marchitez causada por *F. oxysporum* hasta en un 30%, lo cual se atribuyó al aumento de la actividad de las enzimas defensivas antioxidantes secretadas por la planta de tomate, como la peroxidasa (POX), la catalasa (CAT) y el súper óxido dismutasa (SOD).

Por otra parte, Álvarez (2012) evaluó dos extractos etanólicos obtenidos de plantas de fresa desechadas al término de su ciclo productivo; el primero lo obtuvo utilizando etanol y aplicando alta temperatura (EFEC) y el segundo fue de forma similar, pero a temperatura ambiente (EFES). Se realizó una prueba *in vitro* de la actividad biocontroladora de los extractos con tres volúmenes en el medio papa dextrosa agar (PDA), y una prueba *in vivo* asperjando los extractos sobre frutos de fresa. El extracto EFES a la concentración de 125 μ L permitió la inhibición de la producción de biomasa del hongo con base al peso seco; otro resultado interesante fue la inhibición de la formación de esporas con ambos extractos en al menos una concentración. En la evaluación *in vivo*, ambos extractos mostraron una importante inhibición del desarrollo de la enfermedad con un porcentaje de inhibición de 73.8% para el extracto EFEC y un 66.3% para el extracto EFES en contraste con el control. Esta actividad biocontroladora podría ser atribuida a la presencia de compuestos de tipo flavonoides.

Los extractos de las plantas pueden obtenerse de diversas maneras las cuales son, acuosa y a través del uso del alcohol (etanol). El extracto acuoso permite la extracción de metabolitos solubles en agua y puede ser fácilmente utilizado por los agricultores con un mínimo de requerimiento tecnológico, mientras que el extracto etanólico, como solvente de los metabolitos, requiere un equipo de separación antes de utilizar el extracto (Hernández-Ochoa *et al.*, 2012).

A los extractos vegetales y compuestos obtenidos se les evalúa su potencial biológico en los diferentes modelos biológicos a nivel *in vitro* e *in vivo*. En su mayoría los métodos de evaluación biológica sobre hongos fitopatógenos consisten en la exposición del hongo a diferentes concentraciones de extracto en medio PDA (Nene, 2002; Castillo *et al.*, 2010).

2.2.5.4.1. Extractos etanólicos

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 (González, 2004).

2.2.5.4.2. Extractos acuosos

Los extractos vegetales acuosos juegan un papel importante en la agroecología, ya que estos benefician al ambiente combatiendo organismos fitopatógenos sin recurrir a agentes químicos, ya que estos dejan de ser efectivos cuando los organismos desarrollan resistencia. El proceso de obtención de los extractos a partir de diferentes estructuras de los materiales vegetales (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, madera, frutos y raíces) es variable (Bautista-Baños *et al.*, 2002).

González *et al.* (2017), evaluaron el extracto de canela *in vitro* a concentraciones de 5, 10 y 15% contra *B. cinerea* obteniendo efectividad con las dosis al 10 y 15%, las cuales inhibieron el desarrollo del hongo en un intervalo de 96 al 100%; la esporulación también fue afectada, esto se evidenció cuando se comparó el testigo con los tratamientos que presentaron crecimiento micelial. Sin embargo, los autores señalan que es necesario evaluar su efectividad en campo.

2.2.5.5. Aceites esenciales

Se sabe desde hace muchos siglos que las plantas aromáticas son fuente de compuestos que poseen propiedades interesantes para diferentes aplicaciones. Mediante la extracción de plantas aromáticas se obtienen mezclas complejas de compuestos volátiles como terpenos y terpenoides, conocidos genéricamente como aceites esenciales (AE), hasta el momento se han identificado más de 3000 y al menos 300 son de importancia económica por su uso en las industrias (Bakkali *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2017).

Los aceites esenciales se han utilizado ampliamente como bactericidas, viricidas, fungicidas, antiparasitarios, insecticidas, medicinales (especialmente hoy en día en las industrias farmacéutica), sanitaria, cosmética (perfumes y aromatizantes), agrícola y alimentaria (condimentos y saborizantes) (Bakkali *et al.*, 2008; Martínez, 2001). Los aceites esenciales son las fracciones líquidas aromáticas y volátiles extraídas de las plantas, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria (Martínez, 2001).

Debido al modo de extracción, principalmente por destilación de plantas aromáticas, contienen una variedad de moléculas volátiles como terpenos y terpenoides, componentes aromáticos derivados de fenol y componentes alifáticos. Los ensayos fisicoquímicos *in vitro* caracterizan a la mayoría de ellos como antioxidantes; Sin embargo, un trabajo reciente muestra que, en las células eucariotas, los aceites esenciales pueden actuar como prooxidantes que afectan las membranas celulares internas y orgánulos como las mitocondrias. Dependiendo del tipo y la concentración, exhiben efectos citotóxicos en las células vivas, pero generalmente no son genotóxicos. En algunos casos, los cambios en el potencial redox intracelular y la disfunción mitocondrial inducida por los aceites esenciales pueden asociarse con su capacidad para ejercer efectos antígenotóxicos. Estos hallazgos sugieren que, al menos en parte, los efectos beneficiosos encontrados de los aceites esenciales se deben a los efectos prooxidantes a nivel celular (Bakkali *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales como agentes antimicrobianos presentan dos características principales: su origen natural generalmente significa más seguridad para las personas y el ambiente; y pueden considerarse de bajo riesgo de desarrollo de resistencia ya que son mezclas de compuestos que pueden presentar diferentes mecanismos de actividad antimicrobiana (Nostro *et al.*, 2004; Daferera *et al.*, 2003). Hyldgaard *et al.* (2012), señalan que los aceites esenciales están conformados por los metabolitos secundarios tienen una función importante en la defensa de las plantas.

2.2.5.5.1. Clasificación de los aceites esenciales con base en su consistencia

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. De acuerdo con su consistencia se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (Martínez, 2001; Rodríguez *et al.*, 2012).

2.2.5.5.2. Extracción de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden extraer de las plantas mediante varios métodos como son: expresión, destilación por arrastre con vapor de agua, extracción con

solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos. Por el método de expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado; este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos. Los otros métodos tienen sus propias características; sin embargo, la extracción con fluidos supercríticos es de reciente desarrollo, el material vegetal es cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (dióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor es eliminado por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura; este método presenta varias ventajas como un rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia; sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso (Martínez, 2001; Rodríguez *et al.*, 2012).

2.2.5.5.3. Aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume)

La canela tiene muchas propiedades biológicas como analgésico, antiséptico, antiespasmódico, afrodisíaco, astringente, hemostático, insecticida y parasiticida. La corteza de las ramas sin la epidermis se aprovecha como la canela comercial que tiene uso en los campos de la perfumería, la cocina y la medicina.

Investigaciones más recientes han revelado un efecto antimicrobiano interesante en el aceite esencial de *C. zeylanicum* (Carmo *et al.*, 2008).

La composición del aceite esencial está en función del órgano de la planta utilizada para su extracción; por ejemplo, de las hojas se obtiene principalmente el cinamaldehído: 1.0 a 5.0% y eugenol de 70.0 a 95.0 %, de corteza cinamaldehído: 65.0 a 80.0% y eugenol de 5.0 a 10.0 %, de corteza de raíz alcanfor en un 60 %, de fruta *trans*-Cinnamyl acetato 42.0 a 54.0% y cariofileno de 9.0 a 14.0%, de brotes hidrocarburos terpenos 78%, alfa-bergamotene 27.38%, alfa-copaeno 23.05% y terpenoides oxigenados 9.0% y de flores (E)-Cinnamyl acetate 41.98%, *trans*-alpha-Bergamotene 7.97% y óxido de cariofileno 7.20% (Rao y Gan, 2014). Sin embargo, debe señalarse que las concentraciones; así como la presencia de otros compuestos estarán en función de otros factores, por lo que no siempre serán las mismas, tal y como se reportan en otro análisis del aceite de canela cinamaldehído (68,95%), benzaldehído (9,94%), acetato de (E) -cinamilo (7,44%), limoneno (4,42%) y eugenol (2,77%) (Mohammadi *et al.*, 2015).

Un estudio sobre la interferencia del aceite esencial de *C. zeylanicum* en el crecimiento y la morfogénesis de *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus* y *A. ochraceus* -cepas potencialmente patógenas- indica que las concentraciones de 320 - 80 $\mu\text{L mL}^{-1}$ inhibieron fuertemente el crecimiento de todas las cepas evaluadas. La dosis de 40 $\mu\text{L mL}^{-1}$ fue la CMI₅₀ (Concentración Mínima Inhibitoria), es decir la concentración más baja que inhibió en 50 % el crecimiento de las cepas analizadas; mientras que 80 $\mu\text{L mL}^{-1}$ fue la CMI₉₀, en otras

palabras, la concentración más baja que causó una inhibición del crecimiento del 90%. A las concentraciones de 320 a 40 $\mu\text{L mL}^{-1}$ el aceite esencial presentó inhibición del crecimiento igual o superior a las causadas por dos antifúngicos estándar; a 80 y 40 $\mu\text{L mL}^{-1}$ se inhibió el 100 % de la germinación de las esporas en tres especies de los hongos evaluados. Los principales cambios morfológicos causados por el aceite esencial, observados bajo microscopía óptica fueron disminución de la conidiación, fuga de citoplasma, pérdida de pigmentación y estructura celular alterada que indica degeneración de la pared celular de los hongos (Carmo *et al.*, 2008).

En otro estudio donde se evaluó a nivel *in vitro* e *in vivo* el efecto del aceite esencial *C. zeylanicum* para el manejo de la pudrición del fruto de fresa por *B. cinerea*, se registró que *in vitro* se redujo el crecimiento de hongos de manera dependiente de la concentración, es decir, a medida que aumentó la concentración el crecimiento radial micelial disminuyó; con las concentraciones de 0.1 y 0.15% se presentó crecimiento de 20.66 y 12.85 mm respectivamente en contraste con 55 mm del control; esto representó el 62.44 y 76.64 del índice antifúngico, respectivamente. En lo que respecta a los efectos antifúngicos *in vivo* en frutos de fresa, se registró menor incidencia y severidad a la dosis de 0.15 % del aceite esencial con relación al testigo. Cabe señalar que este efecto se potencializó cuando el aceite esencial de canela se combinó con quitosano (Mohammadi *et al.*, 2015).

Resultados reportados por Necha y Barrera (2008), señalan que al evaluar *in vitro* el aceite esencial de canela sobre *Fusarium* sp., aislado de papaya, a

concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se presentó inhibición del crecimiento micelial el cual estuvo en función a la dosis. La tasa de crecimiento disminuyó de 4.16 a 2.76 mm d^{-1} al incrementar la dosis de 100 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Otro estudio sugiere que el aceite esencial de canela a dosis de 500 o 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ puede ser efectivo para controlar el crecimiento y la producción de la toxina FB1 (toxina fumonisina B1) de *F. proliferatum* en granos de maíz (Velluti *et al.*, 2003).

2.2.5.5.4. Aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. y Perry)

El aceite esencial de clavo de olor ha sido ampliamente estudiado debido a sus propiedades, vasta disponibilidad y alto rendimiento. De hecho, el aceite de esta especia ha sido reconocido por sus propiedades medicinales (Machado *et al.* 2011). Además, con base en lo que citan Moura *et al.* (2012), posee muy variados efectos dentro de las que destacan: antiséptico, analgésico, antibacteriano, anestésico, antimutagénico y antifúngico. Cabe mencionar que el aceite de *S. aromaticum* también ha demostrado poseer actividad antioxidante, tal como lo señalan Silvestri *et al.* (2010).

Por otra parte, se reporta que el aceite de clavo también posee efecto repelente contra especies de mosquitos vectores de enfermedades en el humano tales como *Aedes aegypti* vector del virus causante de la fiebre amarilla, el mosquito *Culex quinquefasciatus* vector de filariasis y el mosquito *Anopheles dirus* vector de la malaria (Nerio *et al.*, 2010).

De acuerdo con el estudio realizado por Costa *et al.* (2011), la composición del aceite obtenido por la técnica de arrastre de vapor presenta en su composición al eugenol 83.6 %; acetato de eugenilo 11.6 % y cariofileno 4.2 % como componentes mayoritarios; aunque, Moura *et al.* (2012) señalan que estas cantidades pueden variar eugenol 49-87 %, acetato de eugenilo 0.5-21% y cariofileno 4-21 %, además reportan trazas de α -humuleno. Cabe señalar que Srivastava *et al.* (2005), identificaron por lo menos 28 constituyentes en el aceite esencial de clavo proveniente de la India, mientras que identificaron 35 y 22 componentes para los aceites esenciales obtenidos de los botones y las hojas del clavo provenientes de Madagascar, respectivamente.

Hassani *et al.* (2011), condujeron investigaciones con diversos aceites esenciales incluyendo a *S. aromaticum* para controlar el crecimiento de los hongos *Monilinia fructicola* y *B. cinerea* sobre chabacano (*Prunus armeniaca* L.) durante el almacenamiento postcosecha. En este caso, se redujo tanto la incidencia como la severidad de la infección de las frutas tratadas al adicionar los aceites esenciales en comparación con el testigo, la máxima actividad antifúngica se obtuvo a concentraciones de 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ en todos los aceites; sin embargo, la eficacia del aceite de clavo en la reducción de la incidencia y severidad en los chabacanos inoculados con *B. cinerea* fue mayor que la de los otros aceites.

3. JUSTIFICACIÓN

Ante la incesante búsqueda de alternativas más confiables y benéficas para el manejo de plagas y enfermedades en cultivos, se ha abierto un amplio panorama de investigación en torno al uso de extractos vegetales, aceites esenciales y metabolitos secundarios provenientes de plantas, los cuales hoy en día constituyen una alternativa promisoriosa para contrarrestar el efecto negativo de algunos microorganismos fitopatógenos por su bajo costo, por ser amigables con el ambiente y la salud en general (Villa-Martínez, 2015).

En la horticultura ornamental, el cultivo de la rosa como flor de corte es uno de los más importantes a nivel mundial. En México, el Estado de México es el principal productor de dicha especie, la cual es afectada por el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* que causa la enfermedad del “moho gris” tanto en condiciones de invernadero como en postcosecha, los daños que ocasiona se pueden presentar en todos los órganos de la planta; sin embargo. Las mayores pérdidas se manifiestan en los pétalos durante la postcosecha, lo que trae como consecuencia la pérdida de calidad de la flor.

De manera convencional los productores de la región utilizan fungicidas químicos, entre estos tiabendazol y procloraz a los cuales el patógeno ha desarrollado resistencia y perdido sensibilidad respectivamente. Ante esta situación, hay una incesante búsqueda de alternativas confiables y benéficas para el manejo de este fitopatógeno. Esto ha conducido, en años recientes, hacia un amplio panorama de

investigaciones en torno al uso de extractos vegetales, aceites esenciales y metabolitos secundarios presentes en plantas, que constituyen hoy en día una alternativa promisoría para contrarrestar el efecto negativo de algunos microorganismos fitopatógenos, por su bajo costo, por ser amigables con el ambiente y la salud en general.

En este sentido, se plantea que una alternativa de manejo es el uso de aceites esenciales, de los cuales se ha demostrado que a nivel *in vitro* disminuyen del crecimiento micelial de fitopatógenos. De acuerdo con lo anterior, en la presente investigación se planteó por objetivo: determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) frente a *Botrytis cinerea* proveniente de botones florales de rosa.

4. HIPÓTESIS

Los componentes de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) inhiben el crecimiento *in vitro* del hongo *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris en *Rosa hybrida*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) frente a *Botrytis cinerea* proveniente de botones florales de rosa.

5.1.2. Objetivos específicos

Determinar la actividad antifúngica y efectividad biológica *in vitro* del aceite esencial de canela contra *Botrytis cinerea*, a cinco concentraciones.

Determinar la actividad antifúngica y efectividad biológica *in vitro* del aceite esencial de clavo de olor contra *Botrytis cinerea*, a cinco concentraciones.

Comparar la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales de canela y clavo contra *Botrytis cinerea* a las concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 %.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Ubicación de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado en la carretera Tenancingo – Villa Guerrero, Km 1.5, Tenancingo, Estado de México, México.

6.2. Material biológico

Se utilizó la cepa de *B. cinerea* TBc2, la cual forma parte de la colección de hongos del Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario Tenancingo. Se tiene el antecedente de que fue aislada por Camacho (2009) a partir de botones florales de rosa provenientes del municipio de Tenancingo, Estado de México. Cabe señalar que previamente ha sido estudiada la efectividad de fungicidas frente a dicha cepa; derivado de lo cual se ha demostrado que ha perdido sensibilidad a procloraz (Camacho, 2009) y desarrollado resistencia a tiabendazol (López, 2019).

6.3. Preparación de medio de cultivo PDA

Se preparó medio de cultivo PDA, para lo cual se utilizaron 39 g de medio de cultivo (BD Bioxon™), y se mezcló con 1 L de agua destilada en un matraz Erlenmeyer; enseguida se esterilizó en autoclave (Felisa®) a 120 °C durante 15 minutos. Una vez estéril se dejó enfriar a 45-50 °C y en condiciones asépticas bajo una campana de flujo laminar vertical (Scorpion Scientific®) se vació en cajas de Petri de cristal estériles (Kimax®), se dejó solidificar y se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio hasta su uso.

6.4. Reactivación de la cepa de *B. cinerea* TBc2

La cepa de *B. cinerea* TBc2 se encontraba conservada en tubos de cultivo con medio PDA y aceite mineral estéril. La reactivación se realizó bajo condiciones asépticas tomando un trozo de medio de cultivo, que posteriormente se secó con papel absorbente estéril para eliminar el aceite mineral; enseguida se sembró en medio de cultivo PDA y se mantuvo en una incubadora (Riossa®) a 25 ± 2 °C en obscuridad.

6.5. Preparación de medio de cultivo PDA con aceites esenciales

Los aceites esenciales de canela y clavo de olor evaluados fueron de grado terapéutico (Essential Oils-Essencefleur), los cuales (por separado) se adicionaron en medio de cultivo PDA como se indica a continuación:

Se preparó medio de cultivo PDA (metodología descrita en el apartado 6.3), una vez estéril se enfrió hasta alcanzar aproximadamente de 50 °C; enseguida se adicionó la respectiva dosis de aceite mineral más Tween 20® (la dosis de este surfactante se incrementó en $20 \mu\text{L L}^{-1}$ por cada 0.01 % de aceite mineral) (Vázquez *et al.*, 2013) (Cuadro 2) y se mantuvo en agitación a 50 °C en un termo agitador (Thermo Scientific®) hasta que se disolvieron por completo; posteriormente el medio de cultivo se vació en cajas de Petri de cristal de 9 cm de diámetro.

Se consideraron dos testigos: el testigo absoluto consistió en medio de cultivo PDA sin aceite esencial, y un testigo sin aceite esencial, pero con la adición de Tween

20[®]; este último con la finalidad de determinar si el surfactante tenía algún efecto sobre el crecimiento del hongo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones evaluadas de los aceites esenciales de canela y clavo de olor.

Aceite esencial	Concentración de aceite esencial (%)	Tween 20[®] ($\mu\text{L L}^{-1}$)
Testigo absoluto	0	0
Testigo + Tween 20 [®]	0	20
Canela	0.01	20
	0.02	40
	0.03	60
	0.04	80
	0.05	100
Clavo de olor	0.01	20
	0.02	40
	0.03	60
	0.04	80
	0.05	100

6.6. Siembra de *B. cinerea*

Una vez solidificado el medio de cultivo PDA, con el respectivo aceite esencial, se procedió a la siembra del hongo, para lo cual con el apoyo de un horador se cortaron discos de medio de cultivo de 0.8 cm de diámetro con crecimiento de *B. cinerea* de siete días de edad. Posteriormente, los discos fueron colocados en el centro de cada caja de Petri. Las siembras se mantuvieron en incubación a 25 ± 2 °C en obscuridad.

6.7. Variables evaluadas

Cinco días después de la siembra se trazó el crecimiento micelial del patógeno; y se tomaron fotografías y con el apoyo del programa Image J (versión 1.43) se determinó el área de crecimiento micelial y, a partir de este dato, el porcentaje de mortalidad.

Por otro lado, se determinó la efectividad biológica de los aceites esenciales con las cinco concentraciones evaluadas a través de la siguiente fórmula:

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

Donde:

Pr= Efectividad biológica (%)

Po=Mortalidad observada (%)

Pc=Mortalidad del testigo sin extracto acuoso (%)

6.8. Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con 12 tratamientos (Cuadro 2) y siete repeticiones. Para asegurar la veracidad de los resultados se realizaron al menos dos réplicas. Los datos de crecimiento micelial y la mortalidad se analizaron por medio de un ANOVA de una vía y comparación de medias Tukey ($P < 0.05$) con el programa InfoStat versión 2020e.

7. RESULTADOS

De acuerdo con el análisis de varianza, no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) en el área de crecimiento micelial de las dos réplicas de cada tratamiento (Cuadro 3, Anexos 1 y 2); por esta razón, se procedió a calcular el promedio del área de crecimiento micelial de cada repetición y enseguida se realizaron los análisis correspondientes.

Cuadro 3. Área de crecimiento micelial (cm^2) de *B. cinerea*, réplicas 1 y 2, cinco días después de la siembra con los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20[®], y aceite esencial de canela, clavo y tomillo, a las concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05%.

Tratamientos	Área de crecimiento micelial (cm^2)			
	Aceite esencial de canela		Aceite esencial de clavo	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
Testigo absoluto	53.83	49.95	8.158	11.603
Testigo + Tween 20 [®]	50.74	53.75	11.431	6.849
0.01%	26.49	25.64	11.923	11.528
0.02%	3.84	9.46	5.535	4.668
0.03%	0	0	1.093	2.749
0.04%	0	0	0	0
0.05%	0	0	0	0

No se presentaron diferencias estadísticas entre las réplicas de cada tratamiento. Comparación de medias Tukey ($P > 0.05$).

7.1. Aceite esencial de canela

Se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en el área de crecimiento micelial de *B. cinerea* a las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela, respecto al testigo absoluto. Pero en el caso del testigo absoluto y el testigo + Tween 20[®] no se encontró diferencia significativa (Cuadro 4), lo que muestra que la adición de este surfactante no influye en el crecimiento del hongo, en el resto de los tratamientos.

La concentración de 0.01 % fue la que registró menor efectividad biológica, la cual fue de 49.77 %; cabe señalar que, de acuerdo con el análisis de varianza del área de crecimiento micelial, este tratamiento fue estadísticamente diferente a los demás ($P > 0.05$). Con la concentración de 0.02 % se alcanzó una efectividad biológica de 87.19 %; no obstante, los más efectivos fueron los tratamientos de 0.03, 0.04 y 0.05 %, cuya inhibición fue del 100 % (Cuadro 4, Figura 2).

En el medio de cultivo el patógeno presentó diferencias en la coloración y la textura del micelio. En el testigo absoluto presentó crecimiento radial, ligeramente algodonoso y de coloración gris; en el caso del testigo + Tween 20[®] se presentó crecimiento irregular, de coloración más grisácea en comparación con el testigo absoluto. En los tratamientos cuya concentración de aceite esencial de canela fue de 0.01 y 0.02 % el hongo presentó características similares: crecimiento algodonoso, con mayor cantidad de micelio en el disco de medio de cultivo; en

cuanto a la coloración, con la concentración de 0.01 % esta tendió a gris, mientras que a 0.02 % el hongo fue color beige (Figura 3).

Cuadro 4. Comparación de medias del área de crecimiento micelial de *B. cinerea* cinco días después de la siembra, con los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20®, y aceite esencial de canela a las concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 %.

Tratamiento	^a Área de crecimiento micelial (cm ²)	Efectividad biológica (%)*
Testigo + Tween 20®	52.24 ^a	
Testigo absoluto	51.89 ^a	
0.01 %	26.06 ^b	49.77
0.02 %	6.65 ^c	87.19
0.03 %	0 ^d	100
0.04%	0 ^d	100
0.05 %	0 ^d	100

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

* Respecto al testigo absoluto.

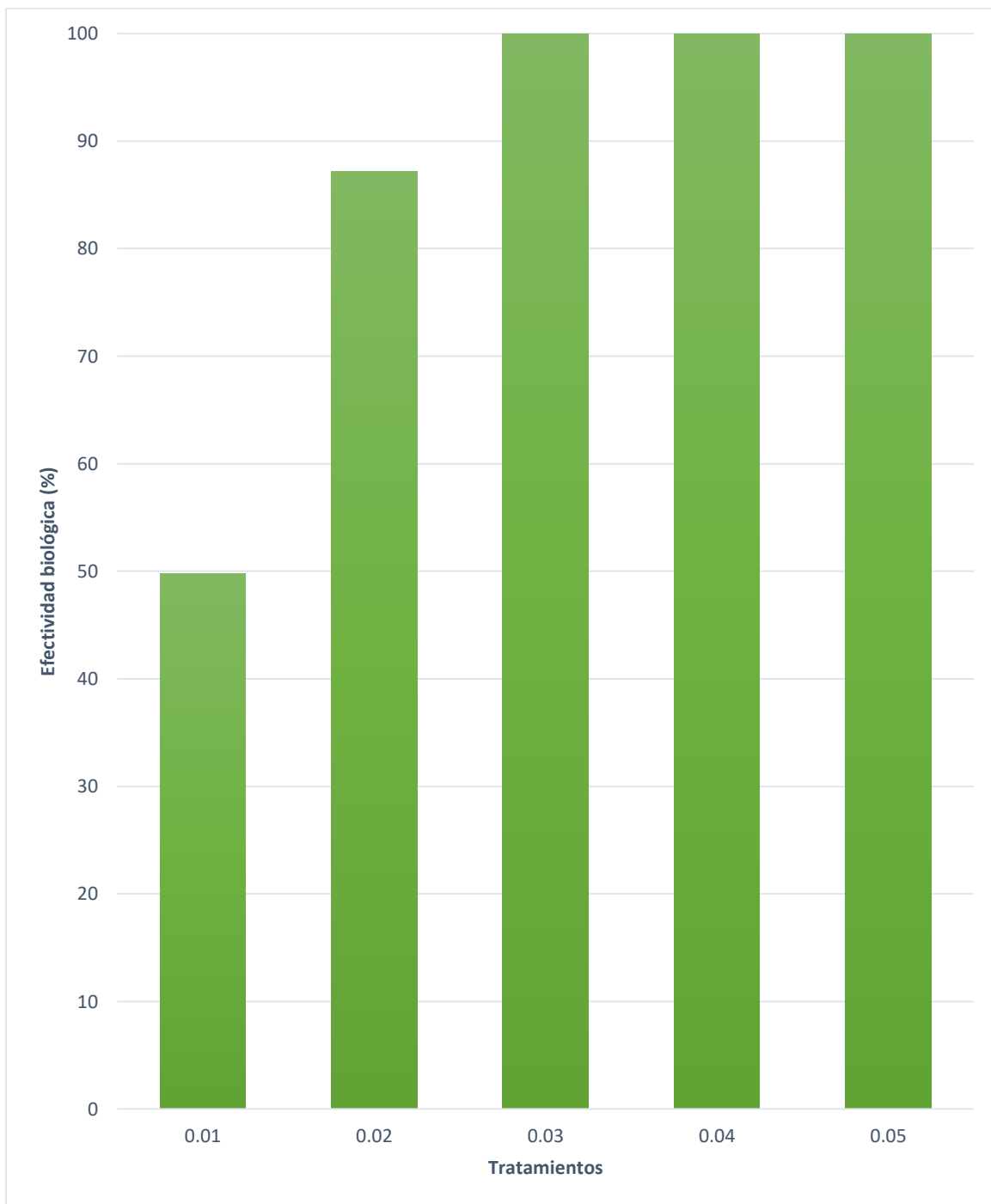


Figura 2. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de canela a la concentración de 0.01, 0.02, 0.030, 0.04 y 0.05 %, frente a *B. cinerea*.

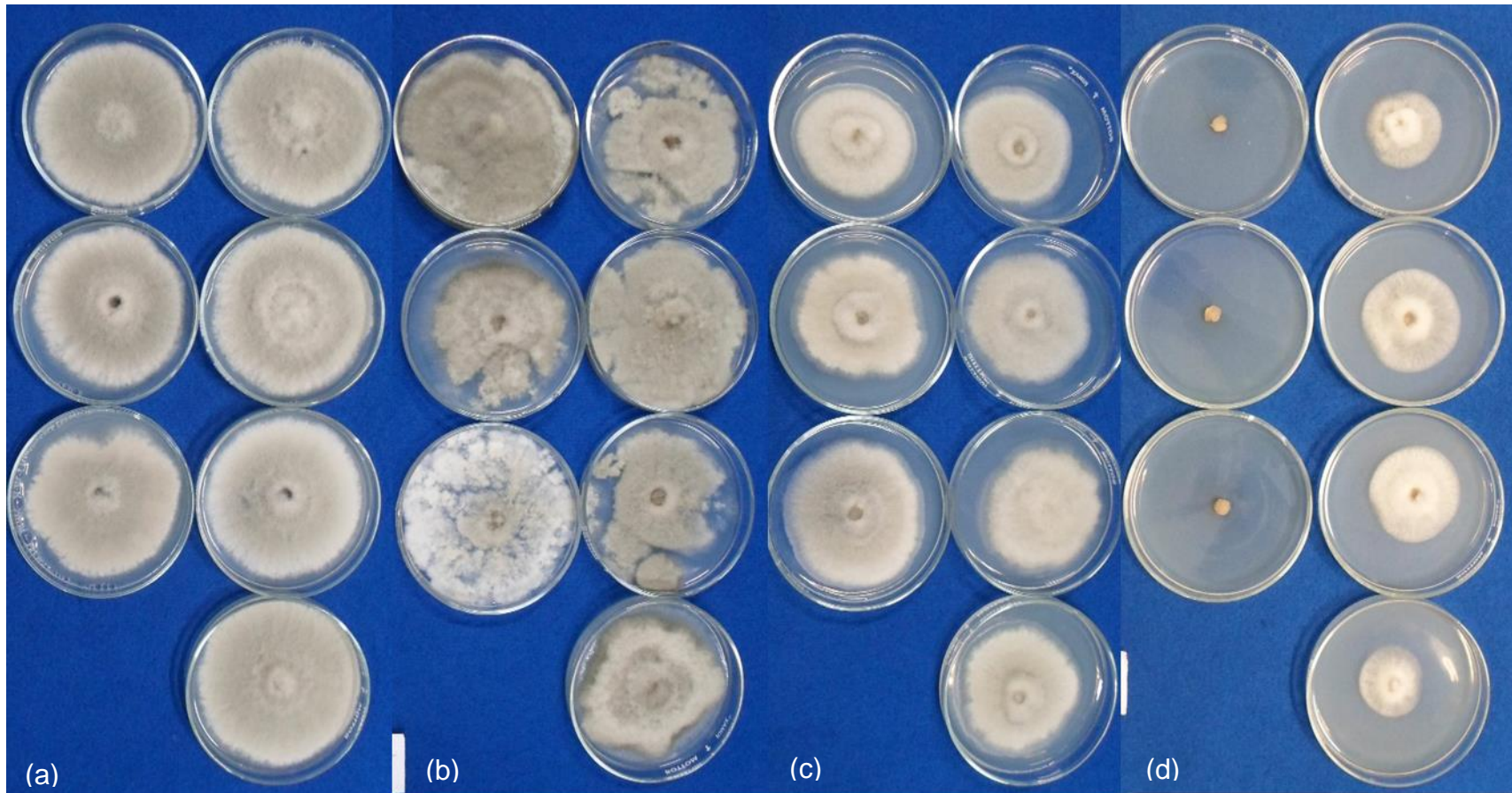


Figura 3. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cinco días después de la siembra, en medio de cultivo con los tratamientos: (a) testigo absoluto, (b) testigo + Tween 20®, (c) canela al 0.01 % y (d) canela 0.02 %.

7.2. Aceite esencial de clavo de olor

De acuerdo con el análisis estadístico, se presentaron diferencias ($P < 0.05$) entre el área de crecimiento micelial de *B. cinerea* del testigo absoluto y las concentraciones de aceite esencial de clavo al 0.04 y 0.05 %. Por otro lado, el análisis muestra que no existieron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre el aceite esencial de clavo al 0.01 %, el testigo + Tween 20[®] y el testigo absoluto; a pesar de que no existieron diferencias estadísticas, con la concentración de 0.01 % el hongo presentó crecimiento micelial 11.73 cm², siendo mayor que el testigo + Tween 20[®] y el testigo absoluto, cuyo crecimiento fue de 9.88 y 9.14 cm², respectivamente (Cuadro 5).

Como se observa en el cuadro 5, las concentraciones del 0.02 y 0.03 % no fueron estadísticamente diferentes al testigo absoluto ($P > 0.05$); no obstante, presentaron efectividad biológica de 48.37 y 80.56 %, respectivamente. Finalmente, los tratamientos que presentaron la mayor efectividad biológica correspondieron a las concentraciones de 0.04 y 0.05 % la cual fue de 100 % (Cuadro 5, Figura 4).

En el medio de cultivo el patógeno presentó diferencias en la coloración y la textura del micelio dependiendo del tratamiento. El testigo absoluto y el testigo + Tween 20[®] presentaron crecimiento micelial compacto y algodonoso; la coloración de ambos fue diferente entre sí, ya que el testigo absoluto tendió a ser grisáceo, mientras que el testigo + Tween 20[®] fue color beige, sobre todo en el centro de la colonia. En el caso de los tratamientos a la concentración de 0.01, 0.02 y 0.03 % el

hongo presentó crecimiento regular y algodonoso, en todos los casos la coloración fue blanca (Figura 5).

Cuadro 5. Comparación de medias del área de crecimiento micelial de *B. cinerea* cinco días después de la siembra, con los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20® y aceite esencial de clavo de olor a las concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 %.

Tratamiento	^a Área de crecimiento micelial (cm ²)	Efectividad biológica (%) [*]
0.01 %	11.73 ^a	
Testigo + Tween 20®	9.88 ^a	
Testigo absoluto	9.14 ^{ab}	
0.02 %	5.10 ^b	48.37
0.03 %	1.92 ^b	80.56
0.04%	0 ^c	100
0.05%	0 ^c	100

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

* Respecto al testigo absoluto.

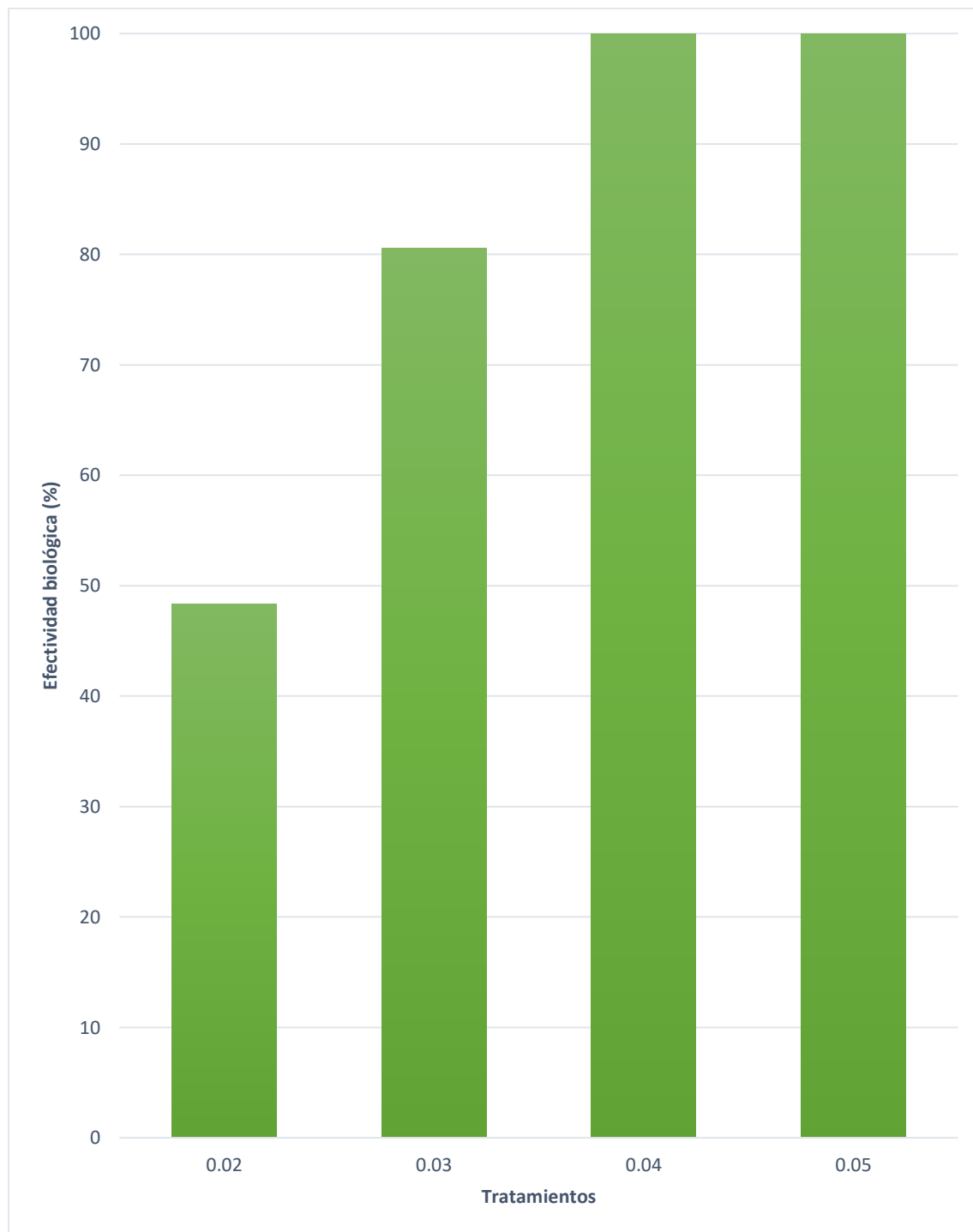


Figura 4. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de clavo a la concentración de 0.01, 0.02, 0.030, 0.04 y 0.05 %, frente a *B. cinerea*.

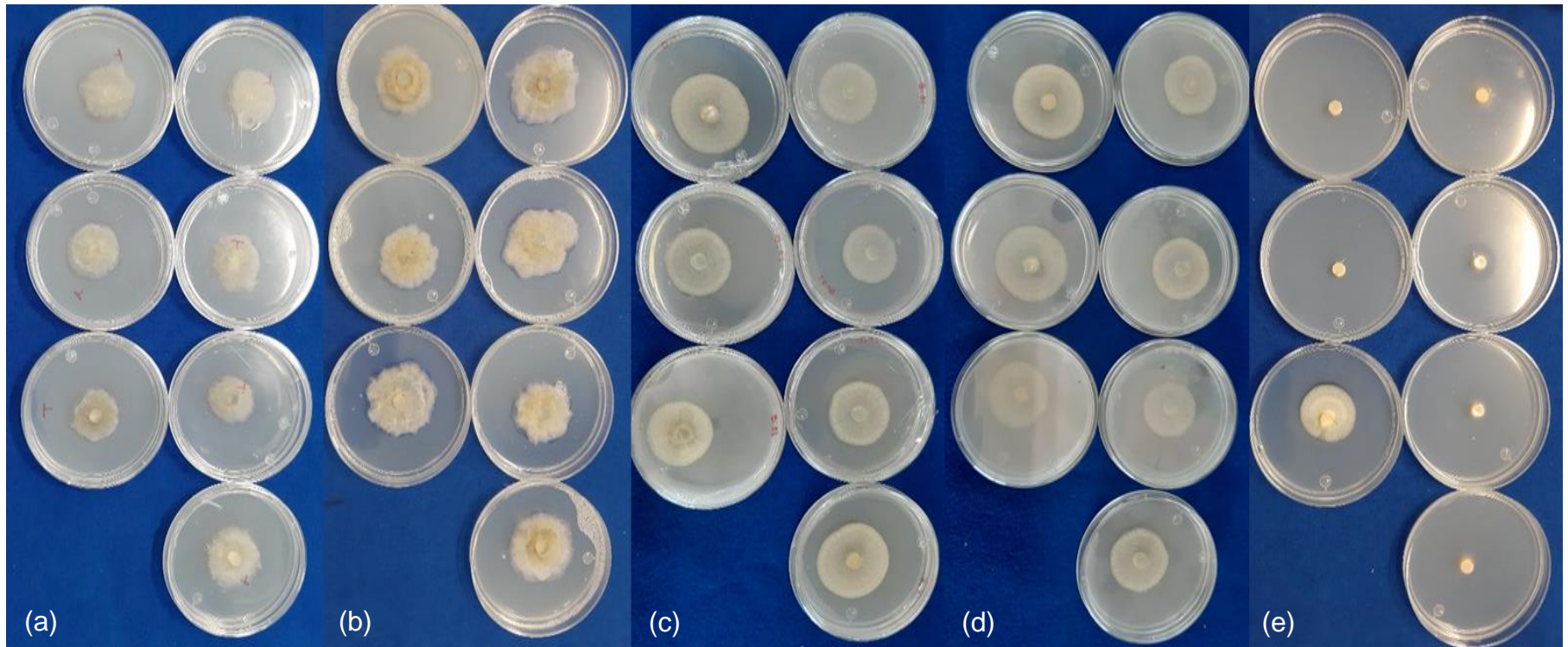


Figura 5. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cinco días después de la siembra, en medio de cultivo con los tratamientos: (a) testigo absoluto, (b) testigo + Tween 20®, (c) clavo de olor al 0.01 %, (d) clavo de olor al 0.02 % y (e) clavo de olor al 0.03 %.

7.3. Mortalidad *in vitro* de *B. cinerea* frente a los aceites esenciales de canela y clavo

Los resultados muestran que conforme se aumenta la concentración de ambos aceites esenciales, la mortalidad tiende a incrementarse de manera gradual hasta alcanzar el 100 %. Se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en el porcentaje de mortalidad de *B. cinerea* frente a los aceites esenciales de canela y clavo de olor; los tratamientos se concentraron en cuatro grupos en función de las diferencias estadísticas presentadas.

El primer grupo se integró por los tratamientos de ambos aceites con mayor mortalidad: 0.03, 0.04 y 0.05 %, cabe señalar que en todos los casos esta fue de 100 % a excepción de clavo de olor al 0.03 %, con el cual fue de 96.54 %. El segundo grupo se conformó por ambos aceites a la concentración del 0.02 %, la mortalidad registrada fue de 90.82 % con clavo y 88.18 % con canela. Finalmente, con la concentración del 0.01 % se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre ambos aceites esenciales; la menor efectividad se presentó con canela, cuya mortalidad fue de 53.66 %, en contraste con clavo en el que el resultado fue de 78.9 % (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad de *B. cinerea* con los aceites esenciales de canela (C) y clavo de olor (Co) a la concentración de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 %.

Tratamiento	^a Porcentaje de mortalidad (cm ²)
0.03-C	100 ^a
0.04-C	100 ^a
0.04-Co	100 ^a
0.05-C	100 ^a
0.05-Co	100 ^a
0.03-Co	96.54 ^a
0.02-Co	90.82 ^b
0.02-C	88.18 ^b
0.01-Co	78.9 ^c
0.01-C	53.66 ^d

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

8. DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación demuestran el potencial de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) para el manejo de *B. cinerea* (cepa TBc2) aislado de botones de rosa. Cabe señalar que se ha reportado que dicha cepa de *B. cinerea* ha perdido sensibilidad al fungicida procloraz (Camacho, 2009) y desarrollando resistencia a tiabendazol (López, 2019). En este sentido, diferentes estudios relacionados con la evaluación de aceites esenciales en las áreas de la industria farmacéutica, sanitaria, cosmética y alimentaria (condimentos y saborizantes) han demostrado su alta actividad biológica; en el área fitopatológica su importancia se ha incrementado en los últimos años, ya que se ha demostrado (en los niveles *in vitro* e *in vivo*) su alto potencial para ser utilizados en el manejo de microorganismos fitopatógenos perjudiciales en los diferentes procesos productivos de frutas y hortalizas (Pandey *et al.*, 2017) y ahora en ornamentales.

Las cinco dosis (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 %) del aceite esencial de canela provocaron reducción del crecimiento micelial de *B. cinerea*; el efecto mayor se registró con las dosis de 0.03, 0.04 y 0.05 % en las cuales la inhibición del crecimiento fúngico fue total, por lo tanto, la efectividad biológica correspondió a 100%. Bastante aceptable fue la efectividad registrada con la dosis de 0.02%, la cual registró el 87.19 % (Cuadro 4). Lo anterior indica que a medida que se incrementa la dosis incrementa la efectividad del AE de canela.

Es interesante contrastar los resultados obtenidos en la presente investigación con el aceite esencial de canela, con los reportados por Mohammadi *et al.* (2015), quienes examinaron la actividad antifúngica a las concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 y 0.15 % de los aceites esenciales de *C. zeylanicum* (AEC), *Zataria multiflora* (AEZ) y quitosano (QS) frente a *B. cinerea*. Todas las concentraciones evaluadas de AEC, AEZ y CS presentaron diferentes grados de actividad antifúngica sobre *B. cinerea*; los resultados indicaron que los tratamientos redujeron el crecimiento micelial del hongo de una manera dependiente de la concentración, es decir, a medida que aumenta la concentración el crecimiento radial disminuyó. De los tratamientos y dosis evaluadas por estos autores; destacó el tratamiento con el aceite esencial de canela a las dosis de 0.1 y 0.15 % con los cuales se presentó una reducción de crecimiento en 76.64 y 62.44 %, respectivamente, en contraste con el testigo. Dichos valores de reducción del crecimiento son inferiores a los obtenidos en la presente investigación con la concentración de 0.02 %, en la que se registró efectividad biológica del 87.19 %. Estas diferencias de valores en la reducción del crecimiento micelial del hongo pueden deberse a diferentes razones entre la que destaca el origen del material del cual se extrae el AE y por consecuencia concentraciones diferentes de los compuestos (Visweswara y Hua, 2014) o bien por el método de extracción del AE (Gonzalez, 2004).

En otro estudio se evaluó el efecto de mezclas de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Citrus limon* (limón) y *Citrus sinensis* (naranja dulce) y sus respectivos hidrolatos (HYS) (hidrolatos, fracción de

solución acuosa que se separa de los aceites esenciales al final del proceso de hidrodestilación) frente a *B. cinerea* en poscosecha sobre frutos de tomate. Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición *in vitro* e *in vivo* muestran que los efectos dependen de la dosis; además, los resultados indican que los aceites esenciales de *O. vulgare* y *T. vulgaris* son los más efectivos para reducir el crecimiento, alcanzando inhibición completa de 400 a 600 ppm. Cabe señalar que este efecto de inhibición se ha atribuido a la presencia de timol y/o carvacrol (Brito *et al.*, 2021). En otro estudio se evaluó la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *T. vulgaris*, *Eugenia caryophyllata* y *C. zeylanicum* contra *B. cinerea* en frutos de *Prunus armeniaca* (chabacano). Los resultados mostraron que con los aceites esenciales de *T. vulgaris* y *E. caryophyllata* se obtuvo una buena actividad antifúngica, manifestada en la reducción de la incidencia y la severidad (Hassani *et al.*, 2012). Como se observa, tanto los resultados obtenidos en el presente estudio, así como los reportados por diferentes autores, muestran resultados eficaces para el uso del aceite esencial de canela en el manejo de *B. cinerea*.

En la presente investigación se demostró que el aceite de clavo presenta alta actividad antifúngica a nivel *in vitro* contra la cepa de *Botrytis cinerea* TBc2, cepa que cuenta con antecedentes de resistencia a fungicidas. Los datos demostraron que a medida que se incrementa la dosis aumenta la actividad antifúngica, de tal forma que a dosis de 0.03 % la efectividad biológica fue de 80.56%, mientras que a 0.04 y 0.05 fue del 100 % (Cuadro 5, Figura 4). Es importante resaltar que la prueba se realizó por duplicado y los resultados mostraron el mismo comportamiento, por

lo que el efecto se atribuye a los tratamientos con una probabilidad de error ($p < 0.05$). Se ha reportado que clavo representa una de las principales fuentes vegetales de compuestos fenólicos; su principal compuesto bioactivo es el eugenol que se encuentra en concentraciones que oscilan entre 9381.7 y 14650 mg por cada 100 g de material vegetal fresco (Neveu, 2009). Además, una cantidad significativa de compuestos se presentan en el aceite esencial, cuya su actividad fungicida ha sido demostrada en trabajos de investigación. Por ejemplo, Rana *et al.* (2011) reportaron que existe actividad antifúngica de este aceite esencial frente a diversos hongos, pero en diferentes grados de sensibilidad de acuerdo con el siguiente orden de mayor a menor: *Mucor* sp., *Microsporium gypseum*, *F. moniliforme* NCIM1100, *Trichophyllum rubrum*, *Aspergillus* sp. y *F. oxysporum* MTCC 284.

Zafar y Ahmad (2002), evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* del aceite de clavo frente a los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *F. chlamydosporum*, *Helminthosporium oryzae* y *Rhizoctonia bataticola* mediante el método de difusión de pozos de agar; los resultados obtenidos evidenciaron alta sensibilidad de los cuatro hongos al aceite esencial a concentración de 100 μL /pozo, cuyo nivel de inhibición estuvo entre 55 a 65 mm de diámetro. Estos mismos autores evaluaron el efecto del aceite esencial de clavo sobre la germinación de conidios y el crecimiento de *A. alternata* en medio líquido, de lo cual reportan que la toxicidad fue dependiente de la concentración y el tiempo de exposición [0.05 a 20 % (v/v)]. Se encontró que la concentración fungistática mínima fue del 0.05 %; además reportaron de 20 a 40 % de lisis de conidios después de 72 h con la concentración del 5 %. Además,

reportan que con la concentración del 10 % a las 24 h después de la incubación se lisaron hasta el 20 % de los conidios.

Los análisis cromatográficos del AE de clavo han mostrado que el eugenol es el principal compuesto responsable de la actividad antifúngica, cuyo efecto se manifiesta como lisis de los conidios y el micelio (Zafar y Ahmad, 2002). Un mecanismo de acción similar de disrupción de la membrana y la deformación de conidios producidas por eugenol se reporta en otros estudios (Devi *et al.*, 2010; Rana *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2017). Los hallazgos encontrados en este trabajo, así como en las diferentes investigaciones citadas, indican que el aceite de clavo posee actividad fungicida contra hongos y oomicetes fitopatógenos, entre los que se encuentran: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sharma *et al.*, 2017), *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *F.oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Pythium aphanidermatum*, *A. brassicae*, *Cladobotryum mycophilum* (Diánez *et al.*, 2018).

El efecto inhibitor de los aceites esenciales de canela y clavo mostró una actividad dependiente de la dosis sobre el hongo evaluado. Este estudio justifica una mayor investigación sobre el uso práctico de los AE para el control de importantes hongos fitopatógenos en la floricultura intensiva.

9. CONCLUSIONES

Con el aceite esencial de canela, la mayor efectividad se presentó a las concentraciones de 0.03, 0.04 y 0.05 %; los cuales inhibieron el 100 % del crecimiento micelial de *B. cinerea*.

En lo que respecta al aceite esencial de clavo de olor, se presentaron los mejores resultados con las concentraciones de 0.04 y 0.05 %, en los cuales la efectividad biológica fue del 100 %.

Los resultados evidencian que la dosis mínima para inhibir el 100 % del crecimiento micelial es: aceite esencial de canela al 0.03 % y aceite esencial de clavo de olor al 0.04 %

10. RECOMENDACIONES

Se sugiere evaluar los aceites esenciales de canela y clavo de olor a las concentraciones de 0.03 y 0.04 %, respectivamente, bajo condiciones de invernadero y postcosecha para determinar su efectividad en el manejo de *Botrytis cinerea*.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. 2ª Edición. Editorial Limusa. Eds. Grupo Noriega. México D. F. 836 p.
- 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. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Estado de México, México. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/105592>.
- Álvarez, G. T. B. (2012). Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa. Tesis de Maestría. CIDIR-IPN-Unidad Michoacán. Michoacán, México. 72 p.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-a review. Food Chemical Toxicology 46 (2): 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- 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 incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage. Revista Mexicana de Fitopatología 20: 8-12.
- Beever, R. E. and Weeds, P. L. (2004). Taxonomic and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and N. Delen,

(eds.). *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 29-52). Dordrecht, the Netherlands. Springer.

Benito, P. E., Arranz, M. y Eslava P. A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista Iberoamericana de Micología 17: S43-S46. <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S43S46.pdf>.

Brito, C., Hansen, H., Espinoza, L., Faúndez, M., Olea, A.F., Pino, S. and Díaz, Katy. (2021). Assessing the control of postharvest gray mold disease on tomato fruit using mixtures of essential oils and their respective hydrolates. *Plants*, 10(8): 1719. <https://doi.org/10.3390/plants10081719>.

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 (No publicada). Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Estado de México, México.

Carmo, E. S., de Oliveira Lima, E., de Souza, E. L. and de Sousa, F. B. (2008). Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology* 39 (1): 91-97. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080001000021>.

Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, Gabriel., Méndez, M., Rodríguez, R., Reyes, A. and Aguilar, CN. (2010). *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Industrial Crops and Products* 32 (3): 324-328. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.05.013>.

Companioni, G. B., Domínguez, A. G. y García, V. R. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal* 19(4): 237 – 248. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/639/pdf>.

Correa-Pacheco, Z. C., Bautista-Baños, S., Hernández-López, M. and Marquina-Valle, M. A. (2018). Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36 (3): 457-467. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1803-2.

Costa, A. R. T., Amaral M. F. Z. J., Martins, P. M., Paula J.A.M., Fiuza, T. S., Tresvenzol, L.M.F, Paula, J.R. y Bara M. T. F. (2011). Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. y L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Espécies Mediciniais* 13 (2):240-245.

Daferera, D. J., Ziogas, B. N. and Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop Protection* 22 (1): 39-44. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9).

Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R. and Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130 (1): 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025>.

Diáñez, F., Santos, M., Parra, C., Navarro, M. J., Blanco, R. and Gea, F.J. 2018. Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. *Letters in Applied Microbiology* 67 (4): 400-410. <https://doi.org/10.1111/lam.13053>.

Elad, Y., Pertot, I., Prado, A. M. C. and Stewart, A. (2016). Plant Hosts of *Botrytis* spp. *In: Botrytis-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*; Fillinger, S., Elad, Y. (eds.). Springer International Publishing: Cham, Switzerland, p. 413.

García, V. R. (2017). *Botrytis cinerea* en el cultivo de *Rosa hybrida* en la zona florícola sur del Estado de México y la evaluación de su sensibilidad *in vitro* a fungicidas. Universidad Autónoma del Estado de México. Recuperado de URI: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/68560>.

González, V. AA. 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de las amazonas. Trabajo de pregrado. Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales. Colombia. url <https://Repositorio.Unal.Edu.Co/Handle/Unal/2800>

González-Martínez, G., Domínguez-Arizmendi, G. y García-Velasco, R. (2017).

Actividad antifúngica de extractos vegetales acuosos sobre *Botrytis cinerea*.

Revista Mexicana de Fitopatología 35 (suplemento): S97.

Hanaa, R. F., Abdou, Z. A., Salama, D. A., Ibrahim, M. A. and Srour, H. A. M. (2011).

Effect of neem and willow aqueous extracts on Fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. Annals of Agricultural Sciences 56 (1): 1-7.

Hassani, A., Fathi, Z., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Meshkatalasadat, H. M. and Marandi,

J.R. (2012). Evaluation of plant essential oils for control of postharvest brown and gray mold rots on apricot. Journal of Food Safety 32 (1): 94-101.

<https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00353.x>.

Holz, G., Coertze, S. and Williamson, B. (2007). The ecology of Botrytis on plant

surfaces. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (eds.).

Botrytis: Biology, pathology, and control (pp. 9-24). Dordrecht, The Netherlands. Springer.

Horst, K. R. and Cloyd, A. R. (2007). Compendium of rose diseases and pests. (2da

ed.). Sta. Paul, Minnesota. U.S.A. APS PRESS.

Hyldgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food

preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix

components. *Frontiers in Microbiology* 3: 1-24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>.

Kirk, P. M. (2020). *Species fungorum* (version Oct 2017). *In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, Checklist* (Roskiv Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Baily N., Kirk P.M., Bourgoïn T., Dewalt R.E., Decock W., Nieuwerkerken E. van, Zarucchi J., Penev L. (eds.) Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.

Leroux, P. (2007). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. Pp. 195-222. *In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen* (eds.). *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer. Dordrecht, The Netherlands.

López, A. N. (2019). Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Estado de México, México. URL: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/99923>.

Machado, M., Dinis, A. M., Salgueiro, L., Custódio J. B. A., Cavaleiro, C. and Sousa, M.C. (2011). Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Experimental Parasitology* 127: 732–739.

Manzanos-Ayala, D., López-Aguilar, N., Domínguez-Arizmendi, G. y García-Velasco, R. (2019). Efectividad *in vitro* de tiabendazol frente a *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37 (1): 29.

Martínez M. A. (2001). Aceites esenciales. Facultad Química Farmacéutica Medellín. Universidad de Antioquia. Colombia. Recuperado de: http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf.

Mohammadi, A., Hashemi, M. and Hosseini, S. M. (2015). The control of *Botrytis* fruit rot in strawberry using combined treatments of chitosan with *Zataria multiflora* or *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Journal of Food Science and Technology* 52(11):7441–7448. DOI 10.1007/s13197-015-1871-7.

Moura, J., Sarmiento, F. Q., de Oliveira, F., Pereira, J., Nogueira, V. y de Oliveira E. (2012). Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Especies Medicinales y Aromática* 11 (3): 208-217.

Necha, L. L. B. y Barrera, L. J. G. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. Aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista Científica UDO Agrícola* 8 (1): 33-41. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3094829>.

Nene, Y. L. and Thapliyal, R. N. (2002). Evaluation of fungicides in Fungicides for Plant Disease Control (3 ed.). Oxford, IHB Pub. Co. New Delhi. p. 331.

Nerio, L., Olivero-Verbel, J. and Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101: 372–378.

Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D. and Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* 2010: 1-9. doi: 10.1093/database/bap024.

Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Sudano Roccaro, A. and Alonzo, V. (2004). Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters* 230 (2): 191-195. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00890-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00890-5).

Ong, K. and Brake, A. (S/A). Botrytis blight of roses. Texas A & M Agrilife. Recuperado de: <https://cdn-ext.agnet.tamu.edu/wp-content/uploads/2018/10/EPLP-015-botrytis-blight-of-roses.pdf>.

Pandey, A., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N. and Bajpai, V. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology* 7. 2161. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>.

Rana, I. S., Rana, A. S. and Rajak, R. C. (2011). Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian Journal of Microbiology* 42 (4): 1269-1277.

Rao, P. V. and Gan, S. H. (2014). Cinnamon: A multifaceted medicinal plant Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2014/642942>.

Rodríguez, A. M., Alcaraz, M. L. y Real, C. S. M. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Proyecto SAGARPA-CONACYT 126183. 47 P. Recuperado de: <file:///C:/Users/GARCIA/OneDrive%20%20Universidad%20Aut%C3%B3noma%20del%20Estado%20de%20M%C3%A9xico/Desktop/Procedimientos%20para%20la%20Extraccion%20de%20AE%20en%20plantas%20aromaticas%202012.pdf>.

Rojas, R. J. E. (2016). Estudio de la diversidad genética de *Botrytis* sp. en orquídeas y la resistencia al ataque del hongo. Universidad Politécnica de Madrid. Recuperado de: http://oa.upm.es/39846/1/JACQUELINE_ROJAS_ROJAS.pdf

Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, M. F. and Smilanick, J. L. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 63 (1): 141-147.

Romero, C. S. (1993). Plagas y enfermedades de ornamentales. UACH-Patronato. Chapingo, México.

Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S. and Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. Journal of Bioscience and Bioengineering 123(3): 308-313. DOI: 10.1016 / j. jbiosc.2016.09.011.

SIAP [Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera]. (2020). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Recuperado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.

Silvestri, J., Paroul, N., Czyewski, E., Lerin, L., Rotava, I., Cansian, R. L., Mossi, A., Toniazzo, G., de Oliveira, D. y Treichel, H. (2010). Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). Revista Ceres 57 (5): 589-594.

Tripathi, P. and Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology 32(3): 235-245.

Vázquez, 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 Línea: <https://www.redalyc.org/pdf/612/61231509008.pdf>. Fecha de consulta 8 de abril de 2019.

Visweswara, R. P. and Hua, G. S. 2014. Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant. Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Vol. 2014. Article ID 642942: 1-12. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/642942>.

Wong-Paz, J. E., Castillo-Inungaray, M. L. López-López, L. I. Contreras-Esquivel, J. C. Nevárez-Moorillon, G. V., y Aguilar C. N. (2010). *Jatropha dioica*: Fuente potencial de agentes antimicrobianos. Acta Química Mexicana 2(4): Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/237092367>.

Yong, A. (2004). El cultivo del Rosal y su propagación. Cultivos Tropicales 25(2): 53-67. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193217832008.pdf>.

Zafar, B. A. and Ahmad I. (2002). *In vitro* fungitoxicity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 18 (4): 317-319 DOI: 10.1023/A:1015242901360.

Zekaria, D. (s/a). Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos. Asociación Española de Ciencia Avícola (AECA). 6 p. Recuperado de: https://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id_articulo=846.

12. ANEXOS

Anexo 1. Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* al día cinco después de la siembra en las réplicas 1 y 2 sometida a los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20®, y aceite esencial de canela a las concentraciones de 0.01 %, 0.02 %, 0.03 %, 0.04 % y 0.05%.

Repetición	Testigo absoluto		Testigo+ Tween 20®		0.01%		0.02%		0.03%		0.04%		0.05%	
	*R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	56.243	48.044	48.209	56.243	22.687	29.713	4.906	0	0	0	0	0	0	0
2	56.243	49.059	56.243	56.243	26.246	30.317	10.136	0	0	0	0	0	0	0
3	48.058	53.899	44.875	47.942	29.642	24.389	9.015	0	0	0	0	0	0	0
4	56.243	54.582	48.502	56.243	31.857	18.476	2.834	23.535	0	0	0	0	0	0
5	56.243	55.761	56.243	56.243	19.266	28.384	0	11.837	0	0	0	0	0	0
6	56.243	47.98	44.857	56.243	26.6	23.819	0	14.477	0	0	0	0	0	0
7	47.509	40.359	56.243	47.078	29.149	24.348	0	16.35	0	0	0	0	0	0
**Promedio	53.83	49.95	50.74	53.75	25.64	26.49	3.84	9.46	0	0	0	0	0	0

*R = réplica.

**No se presentaron diferencias estadísticas entre las réplicas de cada tratamiento. Comparación de medias Tukey (P > 0.05).

Anexo 2. Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* al día cinco después de la siembra en las réplicas 1 y 2 sometida a los tratamientos: testigo absoluto, testigo + Tween 20®, y aceite esencial de clavo a las concentraciones de 0.01 %, 0.02 %, 0.03 %, 0.04 % y 0.05 %.

Repetición	Testigo absoluto		Testigo+ Tween 20®		0,01%		0,02%		0,03%		0,04%		0,05%	
	*R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	6.291	8.077	23.185	4.478	12.901	1.349	3.855	4.237	3.278	3.593	0	0	0	0
2	5.782	8.45	7.523	5.563	11.369	14.085	7.276	4.295	1.07	4.405	0	0	0	0
3	5.78	12.36	8.82	4.124	12.375	14.686	6.072	3.431	3.3	6.912	0	0	0	0
4	9.616	12.018	9.698	9.489	11.894	18.872	7.568	5.061	0	4.332	0	0	0	0
5	8.527	7.789	8.51	6.603	12.181	7.881	4.463	6.081	0	0	0	0	0	0
6	9.524	18.275	12.237	8.334	12.035	11.774	3.811	3.879	0	0	0	0	0	0
7	11.589	14.254	10.044	9.352	10.708	12.048	5.703	5.692	0	0	0	0	0	0
**Promedio	8.158	11.603	11.431	6.849	11.923	11.528	5.535	4.668	1.093	2.749	0	0	0	0

*R = réplica.

**No se presentaron diferencias estadísticas entre las réplicas de cada tratamiento. Comparación de medias Tukey (P > 0.05).

Anexo 3.

ESCALA DIAGRAMÁTICA DE SEVERIDAD DE *Botrytis cinerea* EN *Rosa hybrida* CULTIVAR POLAR

RESUMEN

Los fitopatógenos causan graves pérdidas a los cultivos en términos de calidad y productividad; por lo que es fundamental realizar estimaciones que apoyen en la toma de decisiones a nivel de productores, mejoradores de plantas, fabricantes de plaguicidas, investigadores y profesionistas de la agronomía. En la literatura se reportan diversos métodos para la cuantificación de severidad; entre estos, las escalas diagramáticas que permiten visualizar el grado de daño provocado por fitopatógenos en diversos cultivos, incluyendo flores de corte, tales como la rosa que es afectada por *Botrytis cinerea* (agente causal del “moho gris”); no obstante, estas presentan inconvenientes, por ejemplo: existen las que establecen clases en pétalos individuales u otras que no representan el avance de la enfermedad en las flores. En este orden de ideas, y con la finalidad de aportar información valiosa para la determinación de la severidad de *B. cinerea* en investigaciones científicas y en campo, se planteó por objetivo: diseñar una escala diagramática para la cuantificación de la severidad de *Botrytis cinerea* en flores de rosa, cultivar Polar. Se inocularon flores de rosa con una suspensión de 2×10^3 conidios mL^{-1} , se colocaron en cámara húmeda e incubaron a 22 °C con 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Diariamente se revisaron las flores, se tomaron fotografías para registrar

los síntomas y el avance de la enfermedad, y finalmente se determinó el porcentaje de severidad. Derivado de lo anterior, se estableció una escala de seis clases, donde: 0= flor sana, en la que el color y constitución de los pétalos se conservan íntegros; 1= flor con lesiones primarias color café claro, cuya severidad es menor al 1 %; 2= severidad entre 1 al 8%, que se manifiesta con puntos necróticos aislados a lo largo y ancho de la flor; 3= severidad del 8.1 al 25%, coalescencia cuyo color de la necrosis es café claro; 4= severidad del 25.1 al 30%, manchas irregulares, caracterizadas por presentar coloración café oscuro; 5= severidad mayor al 30.1 %, manchas color café oscuro que cubren la totalidad de los pétalos y además se presenta la esporulación del patógeno. La presente escala tiene la ventaja de mostrar una visión general del avance de la enfermedad del moho gris en las flores de rosa.

1. INTRODUCCIÓN

La estimación de enfermedades causadas por fitopatógenos -también llamada fitopatometría- involucra la medición y cuantificación de enfermedad, por lo que es de suma importancia para el estudio y análisis de las epidemias provocadas por fitopatógenos. De manera puntual, es esencial en estudios epidemiológicos, a partir de los cuales es posible estimar las pérdidas a consecuencia de enfermedades, e incluso decidir sobre estrategias de manejo; por lo que son de utilidad para productores, mejoradores de plantas, fabricantes de plaguicidas, investigadores y profesionistas de la agronomía (Cooke, 2006).

Entre las mediciones que se realizan se encuentran la incidencia y severidad. La incidencia se refiere al número de plantas enfermas dentro una población (Nutter y Teng, 1991). Mientras que la severidad se refiere a la cantidad de enfermedad por unidad de muestra; es decir, el área afectada por la enfermedad expresada en porcentaje, con respecto al área total (Nutter *et al.*, 2007; Nutter y Teng, 1991).

Existen diversos métodos utilizados para la cuantificación de severidad, entre estos: escalas diagramáticas que representan la severidad en función del área afectada (generalmente en escala de 0 a 100 %), métodos computacionales, métodos de análisis de imágenes, métodos enfocados en detectar estrés en cultivos a consecuencia del desarrollo de enfermedades (por ejemplo, el uso de cambios en la fluorescencia de clorofila y temperatura de follaje). Cabe señalar que la precisión

en el cálculo de la severidad, así como el tiempo y esfuerzo requeridos están afectados por la técnica aplicada (Cooke, 2006).

Retomando a las escalas diagramáticas de severidad, estas se diseñan a partir de diagramas que ilustran el desarrollo de una enfermedad en unidades simples (por ejemplo: hojas, frutos, flores y raíz) e incluso en ramas o plantas completas. Dichas escalas se derivan de una serie de imágenes que muestran los síntomas, las cuales pueden ser: dibujos, fotografías o ejemplares conservados (Cooke, 2006).

Para los fines del presente estudio, destacan las escalas diagramáticas diseñadas para cuantificar la severidad de *B. cinerea* en el cultivo de rosa, entre estas las propuestas por Martínez y Moreno (2008) y Bautista *et al.* (2016). La escala de Martínez y Moreno (2008) toma como referencia pétalos individuales (no la totalidad de la flor), en los que consideran tanto los daños como el desarrollo de esporas por parte del patógeno en el tejido vegetal, de tal forma que se establecen 6 clases, donde: 0= 0 % de daño; 1= <25 % de daño; 2= 25 – 50 % de daño; 3= 50 – 100 % de daño; 4= <50 % de esporulación; 5= 50 – 100 % de esporulación. Mientras que en la escala de Bautista *et al.* (2016) se proponen cinco clases en función del porcentaje de daño en la flor: 0= flor sana; 1= 1 al 25 % de daño; 2= 26 al 50 % de daño; 3= 51 al 75 % de daño; y 4= 76 al 100 % de daño.

Cabe señalar que la rosa es una flor de corte de especial relevancia en los ámbitos nacional e internacional; aunado a que *B. cinerea* ocasiona grandes pérdidas tanto en campo como en postcosecha (Camacho, 2009). Los síntomas del patógeno se

manifiestan como pequeñas manchas de color marrón que aumentan de tamaño de manera gradual hasta cubrir la flor; en ocasiones el daño avanza hacia el cáliz, el pedúnculo y el tallo. En los tejidos infectados es habitual observar agrupaciones de conidios del hongo, de ahí el nombre común de la enfermedad: “moho gris” (Horst y Cloy, 2007).

Con base en la información anterior, es necesario el desarrollo de herramientas que permitan evaluar los daños con la mayor precisión posible; por lo que se planteó por objetivo: diseñar una escala diagramática para la cuantificación de la severidad de *Botrytis cinerea* en flores de rosa, cultivar Polar.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación de la investigación

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.

2.2. Material vegetal

Se utilizaron tallos florales de rosa cultivar Polar, el cual es de color blanco y en el cual es posible identificar el progreso del moho gris causado por *B. cinerea*.

2.3. Preparación de medio de cultivo para estimular la producción de esporas de *B. cinerea*

Se preparó el medio de cultivo propuesto por Hammer y Evensen (1994) con modificaciones, cuyos componentes estimulan la esporulación del hongo. El medio estuvo compuesto por: 1000 mL de agua ionizada, 1 g de K_2HPO_4 , 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g de KCL, 0.01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 g de glucosa y 20 g de Agar (Bioxon[®]). Los componentes fueron disueltos uno a uno, posteriormente el medio se esterilizó en autoclave (Felisa[®]) a temperatura de 120-121 °C con presión de 20 PSI, durante 15; una vez estéril se vació en cajas de Petri de cristal (Kimax[®]) de 9 cm de diámetro.

2.4. Siembra de *B. cinerea*

Una vez solidificado el medio de cultivo se sembró al patógeno, colocando un disco de medio PDA con crecimiento del hongo en el centro de la caja de Petri. Las siembras se incubaron en una cámara de crecimiento (Thermo Scientific®) a 22 °C con 12 horas luz y 12 horas oscuridad, durante 10 días.

2.5. Preparación de la suspensión de *B. cinerea*

Diez días después de la siembra se preparó la fuente de inóculo de *B. cinerea* como se indica a continuación: en cada caja de Petri se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril y se realizó un raspado con una varilla de aluminio estéril para liberar los conidios; posteriormente, la suspensión se transfirió a vasos de precipitado estériles y se realizó el conteo de conidios con una cámara de Neubauer (Marienfeld®) visualizada en microscopio compuesto (Carl Zeiss®). La determinación de la concentración se realizó por medio de la siguiente formula:

$$\text{Número de conidios} = \frac{\text{Conidios en C1} + \text{Conidios en C2}}{2} * 2000$$

Donde:

C1: cámara 1

C2: cámara 2

Una vez determinada la concentración se procedió a ajustar la suspensión a 2000, conidios mL⁻¹ a través de la siguiente fórmula:

$$V2 = \frac{C1 \times V1}{C2}$$

Donde:

C1: concentración inicial de conidios (determinada por medio del conteo).

V1: volumen inicial (volumen obtenido al preparar el inóculo).

C2: concentración final deseada (2000 conidios mL⁻¹).

V2: volumen final.

2.6. Inoculación de *B. cinerea* en flores de rosa cultivar Polar

Se inocularon 30 flores de rosa cultivar Polar, para lo cual con un atomizador se asperjaron 540 µL de la suspensión de conidios de *B. cinerea*, abarcando la totalidad de la flor. Enseguida, de manera individual las flores se mantuvieron en hidratación y colocaron en cámara húmeda, la cual consistió en vasos de polietileno de 250 mL con 70 mL de agua purificada colocados dentro de vasos de 500 mL y a su vez, este último cubierto con otro del mismo volumen y sellados con parafilm

para mantener condiciones de alta humedad relativa y promover la infección por *B. cinerea* (Figura 1). Las cámaras húmedas se colocaron dentro de una cámara de crecimiento de plantas (Thermo Scientific®), a 22°C con 12 horas luz y 12 horas oscuridad.



Figura 1. Cámara húmeda utilizada para estimular el desarrollo de síntomas de *B. cinerea* en flores de rosa cultivar Polar.

2.7. Diseño de la escala diagramática de severidad de *B. cinerea*

A partir de las 24 hasta las 96 horas después de la inoculación (hdi) se tomaron fotografías de las flores con la finalidad de registrar los síntomas típicos causados por *B. cinerea*, así como el avance de la enfermedad. Posteriormente, se determinó el porcentaje de severidad a través del programa Image J (versión 1.43).

A partir de los resultados de severidad se diseñó la escala diagramática de severidad de *B. cinerea*, en la que se consideraron diferentes grados de lesiones: desde flor totalmente sana (sin lesiones), hasta alto grado de avance de las lesiones.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas de *B. cinerea* en las flores de rosa cultivar Polar, se manifestaron a partir de las 24 hdi y aumentaron de manera gradual hasta las 96 hdi, momento en el que se finalizó el experimento. En un estudio similar, con el cultivar Virginia, Martínez (2008) reporta que el máximo porcentaje de severidad se presentó a las 96 hdi. Cabe señalar que como parte del proceso de inoculación no se produjeron heridas, debido a que, además de penetrar a través de esta vía, *B. cinerea* es un patógeno con capacidad de penetrar directamente el tejido vegetal a través de aberturas naturales, lo cual logra por medio de la producción de enzimas o mediante diversos procesos mecánicos que incluyen la diferenciación de estructuras de penetración, tales como los apresorios (Benito *et al.*, 2000).

A las 24 hdi se observaron puntos necróticos aislados de color café claro, los cuales se encontraron dispersos a lo largo y ancho de los pétalos de la flor. A las 48 hdi se registró coalescencia, cuya necrosis fue color café; a partir de este momento el tamaño de las machas aumentó de manera gradual, de tal forma que a las 72 hdi la necrosis fue más evidente y a las 96 hdi las manchas cubrieron la mayor proporción de los pétalos externos; una característica importante en esta etapa es el desarrollo de micelio gris, conidióforos y conidios del patógeno (Figura 2). Los síntomas descritos coinciden con los reportados por diversos autores en flores de rosa (Camacho, 2009; Horst y Cloy, 2007); sin embargo, es importante destacar que la enfermedad también se puede presentar en otros tejidos tales como los brotes e incluso tallos (Horst y Cloy, 2007).

Con base en los síntomas registrados y el avance de la enfermedad, se diseñó una escala diagramática de severidad; en la cual, diferentes niveles de severidad se representaron en seis clases, donde: clase 0: flor sana, el color y la constitución de los pétalos se conservan íntegros; clase 1: flor con lesiones primarias de color café claro, cuya severidad es menor al 1 %; clase 2: severidad de 1 al 8 %, se observan puntos necróticos aislados a lo largo y ancho de la flor; clase 3: severidad del 8.1 al 25 %, se presenta coalescencia, las manchas son de color café claro; clase 4: severidad del 25.1 al 30 %, manchas irregulares, caracterizadas por presentar coloración café oscuro; clase 5: severidad mayor al 30.1 %, manchas color café oscuro que pueden cubrir la totalidad de los pétalos y además se observa micelio, conidióforos y conidios del patógeno (Figura 3).

Diversos autores han diseñado escalas diagramáticas de severidad en rosa, tales como la desarrollada por Martínez (2008), la cual consta de 6 clases clasificadas con base en el porcentaje de daño y el desarrollo de esporas del patógeno, como se indica a continuación: 0= 0 %; 1= <25 %; 2= 25 – 50 %; 3= 50 – 100 %; 4= <50 % de esporulación; 5= 50 – 100 % de esporulación; cabe destacar que esta escala no ofrece una visión global de las lesiones en la flor, ya que para su aplicación propone tomar 10 pétalos de las flores evaluadas. Por su parte, Bautista *et al.* (2016), establece una escala en rosa, cultivar Vendela, en la que muestra el grado de severidad porcentaje distribuida en cinco clases: 0= flor sana; 1= 1 al 25 % de daño; 2= 26 al 50 % de daño; 3= 51 al 75 % de daño; y 4= 76 al 100 % de daño. Tanto la escala de Martínez (2008) como la de Bautista *et al.* (2016), coinciden en

que los niveles máximos de severidad se encuentran en el 100 %; lo cual difiere con la diseñada en el presente estudio, en la que el nivel máximo se considera en la clase 5 con severidad mayor al 30.1 %; esto debido a que, para que las flores de corte tengan valor comercial deben estar libres de daños mecánicos, plagas y enfermedades; por lo tanto, flores con severidad mayor al 30.1 % no se consideran valiosas desde el punto de vista comercial.



Figura 2. Síntomas y avance de la enfermedad del moho gris, causada por *Botrytis cinerea* en rosa cultivar Polar. a y b). 24 hdi. c y d) 48 hdi. e y f) 72 hdi. g y h) 96 hdi.



Figura 3. Escala diagramática para cuantificación de la severidad de *Botrytis cinerea* en rosa cultivar Polar. a y b) Clase 0. Flor sana, el color y la constitución de los pétalos se conservan íntegros. c y d) Clase 1. Flor con lesiones primarias de color café claro, cuya severidad es menor al 1 %. e y f) Clase 2. Severidad de 1 al 8 %, se observan puntos necróticos aislados a lo largo y ancho de la flor. g y h) Clase 3. Severidad del 8.1 al 25 %, se presenta coalescencia, las manchas son de color café claro. i y j) Clase 4. Severidad del 25.1 al 30 %, manchas irregulares, caracterizadas por presentar coloración café oscuro. k y l) Clase 5. Severidad mayor al 30.1 %, manchas color café oscuro que pueden cubrir la totalidad de los pétalos y además se observa micelio, conidióforos y conidios del patógeno.

4. CONCLUSIONES

En la ciencia de la fitopatología, la severidad de la enfermedad representa un parámetro para la toma de decisiones; por lo que, la presente escala diagramática de seis clases es una herramienta útil y sencilla para aplicar de manera visual y cuantificable.

La escala diseñada considera lesiones primarias con valores de severidad menores al 1 % y mayores al 30.1% cuando *Botrytis cinerea* ha cubierto pétalos completos y desarrollado estructuras.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bautista, J. P., Barborsa, H. y Uribe-Vélez, D. (2016). Prototipo de formulación a base de *Rhodotorula mucilaginosa* para el control de *Botrytis cinerea* en rosas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18: 13-23. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55826.
- Benito, E. P., Arranz, M. y Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: S43-S46.
- 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. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Estado de México, México.
- Cooke, B. M. (2006). Disease assessment and yield loss. In: Cooke B. M., Jones D. G. and Kayne B (eds.). *The Epidemiology of Plant Diseases*. Second Edition. Springer. Netherlands. 576 p.
- Horst, K. R. and Cloyd, A. R. (2007). *Compendium of rose diseases and pests*. (2da ed.). Sta. Paul, Minnesota. U.S.A. APS PRESS.
- Martínez, O. M. A. (2008). Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos para la protección de cultivo (PPC) preventivos para el control de *Botrytis* sp. en condiciones semicontroladas. Trabajo de grado para obtener el título de microbiólogo industrial. Pontificia Universidad

Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. Disponible en línea:
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8532/tesis104.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Fecha de consulta: octubre 5 de 2021.

Nutter, F. W., Esker. P. and Netto, R. (2007). Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *European Journal of Plant Pathology* 115(1): 95-103.

Nutter, F. W. and Teng, P. P. S. (1991). Disease assessment terms and concepts. *Plant Disease* 75: 1187-1188.