

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“EFECTO DEL ACEITE DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) EN
Botrytis cinerea Pers. *IN VITRO* e *IN VIVO*”

Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el grado
de Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

MENTOR RICARDO LAGOS PEREZ

TUTOR:

Ing. Mg. Eduardo Cruz Tobar

CEVALLOS – ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El suscrito, **MENTOR RICARDO LAGOS PEREZ**, portador de la cédula de identidad número: **180439342-7**, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EFECTO DEL ACEITE DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) EN *Botrytis cinerea* Pers. *IN VITRO* e *IN VIVO*”, es original, auténtico y personal.

En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas

.....
MENTOR RICARDO LAGOS PEREZ

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EFECTO DEL ACEITE DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) EN *Botrytis cinerea* Pers. *IN VITRO* e *IN VIVO*”, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

.....
MENTOR RICARDO LAGOS PEREZ

“EFECTO DEL ACEITE DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) EN
Botrytis cinerea Pers. *IN VITRO* e *IN VIVO*”

REVISADO POR:

Ing. Mg. Eduardo Cruz Tobar

TUTOR

Ing. Mg. Giovanni Velástegui

BIOMETRÍA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

FECHA

.....

Ing. Mg. Hernán Zurita

PRESIDENTE TRIBUNAL

.....

.....

Ing. Mg. Giovanni Velástegui

MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

.....

Ing. Mg. Marco Pérez

MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
SUMMARY	xiv
CAPÍTULO I.....	15
INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO II	17
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO.....	17
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	17
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL.....	21
2.2.1. VARIABLE INDEPENDIENTE.....	21
2.2.1.2. CANELA (<i>Cinnamomun zeylanicum</i> Blume).....	23
METABOLITOS SECUNDARIOS	25
CINAMON®.....	25
• Propiedades	25
• Modo de acción	26
• Compatibilidad	26
• Presentación.....	26
• Dosis	26
SWITCH (FUNGICIDA TESTIGO).....	27
• Características	27
• Formulación.....	27
• Modo de acción	27
• Las recomendaciones de uso de Switch se presenta en la tabla 1.	27
• Modo de empleo.....	28

• Riesgos toxicológicos y ambientales.....	28
2.2.2. VARIABLE DEPENDIENTE.....	29
2.2.2.1. MOHO GRIS, PUDRICIÓN GRIS (<i>Botrytis cinerea</i> Pers.).....	29
GENERALIDADES	29
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	29
MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE <i>Botrytis cinerea</i>	30
CICLO DE INFECCIÓN	30
2.2.3. UNIDAD DE ANÁLISIS	32
2.2.3.1. PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	32
2.2.3.2. PROPAGACIÓN <i>IN VIVO</i>	32
CAPÍTULO III.....	33
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
3.1. HIPÓTESIS	33
3.2. OBJETIVOS	33
CAPÍTULO IV.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO (ENSAYO).....	34
4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR	34
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES	34
4.4. FACTORES EN ESTUDIO	35
4.4.1. Dosis de aplicación	35
4.5. TRATAMIENTOS	35
4.5.1. Tratamientos <i>in vitro</i>	35
4.5.2. Tratamientos <i>in vivo</i>	36
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
4.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	38

4.7.1. Dilución del producto.....	38
- Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	38
• Extracción.....	38
• Identificación del hongo	38
• Purificación de <i>B. cinerea</i> Pers.	38
4.8. VARIABLES RESPUESTA	39
4.8.1. IN VITRO	39
DETERMINACIÓN DEL EFECTO EN LA GERMINACIÓN EN EL INOCULO DEL FITOPATÓGENO (EFIP).....	39
VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DEL TUBO GERMINATIVO (VCTG) .	39
4.8.2. IN VIVO	40
- DETERMINACIÓN DE MODOS DE ACCIÓN POR MEDIO DE CITO HISTOQUÍMICA-	40
4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	40
CAPÍTULO V	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1. <i>IN VITRO</i>	41
5.1.1. Germinación de conidias (GC) de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Purificadas, <i>In vitro</i> bajo condiciones de laboratorio	41
5.2.1 Velocidad de crecimiento del tubo germinativo (VCTG), para <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i> Pers. Purificada.	47
5.2.2 Velocidad de crecimiento del tubo germinativo (VCTG), para <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i> Pers. Sin Purificar.....	49
5.3. Citohistoquímica <i>In vitro</i>	50
5.3.4. <i>IN VIVO</i>	52
Determinación de modos de acción por medio de cito histoquímica.....	52
CAPÍTULO VI.....	53
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFIA Y ANEXOS	53

6.1. CONCLUSIONES	53
6.2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
6.3. ANEXOS	1
CAPÍTULO VII	1
PROPUESTA.....	1
7.1. TÍTULO	1
7.2. DATOS INFORMATIVOS	1
7.3. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	1
7.4. JUSTIFICACIÓN	1
7.5. OBJETIVOS	2
7.6. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	2
7.7. FUNDAMENTACIÓN	2
7.8. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO	2
7.9. ADMINISTRACIÓN	3
7.10. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	3

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Recomendaciones de uso de Swicht.....	29
Tabla 2.- Dosis tratamientos <i>in vitro</i>	38
Tabla 3.- Dosis tratamientos <i>in vivo</i>	39
Tabla 4.- Prueba de Tukey para la variable porcentaje de germinación en el inóculo del fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i> Pers. purificación, <i>In vitro</i>	45
Tabla 5.- Prueba de Tukey para la variable porcentaje de germinación en el inóculo del fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificación, <i>In vitro</i>	47
Tabla 6.- <i>In vitro</i> : Velocidad de crecimiento del tubo germinativo (VCTG) <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Purificación.....	50
Tabla 7.- <i>In vitro</i> : Velocidad de crecimiento del tubo germinativo (VCTG) <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin Purificación.....	52

ÍNDICE DE ANEXOS

6.1.1. Análisis de varianza <i>B. cinerea</i> Pers Purificado.....	1
Anexo. 1. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. purificado. 08H00	
Anexo. 2. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. purificado. 10H00	
Anexo. 3. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. purificado. 12H00	
Anexo. 4. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. purificado. 14H00	
Anexo. 5. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. purificado. 16H00	
6.1.2. Análisis de varianza <i>B. cinerea</i> Pers sin purificar.....	3
Anexo. 6. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificar. 08H00	
Anexo. 7. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificar. 10H00	
Anexo.8. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificar. 12h00	
Anexo. 9. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificar. 14h00	
Anexo. 10. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificar. 16h00	
6.1.3. Análisis de varianza crecimiento tubo germinativo <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Purificado.....	5
Anexo. 11. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. purificado. 08H00	
Anexo. 12. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. purificado 12h00	
Anexo. 13. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. purificado 16h00	
6.1.4. Análisis de varianza crecimiento tubo germinativo <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificar.....	6
Anexo. 14. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificar 08h00	
Anexo. 15. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificar 12h00	
Anexo. 16. Análisis de Varianza lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificar 16h00	
6.1.5. Datos de campo, lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Purificado.....	7
Anexo. 17. Lecturas a las 08H00	
Anexo. 18. Lecturas a las 10H00	
Anexo. 19. Lecturas a las 12H00	
Anexo. 20. Lecturas a las 14H00	
Anexo. 21. Lecturas a las 16H00	

6.1.6. Datos de campo, lectura de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Sin purificación.....	8
Anexo. 22. Lecturas a las 08H00	
Anexo. 23. Lecturas a las 10H00	
Anexo. 24. Lecturas a las 12H00	
Anexo. 25. Lecturas a las 14H00	
Anexo. 26. Lecturas a las 16H00	
6.1.7. Datos de campo, lecturas de velocidad de crecimiento del tubo germinativo. Purificación.....	10
Anexo. 27. Lecturas a las 08H00	
Anexo. 28. Lecturas a las 12H00	
Anexo. 29. Lecturas a las 16H00	
6.1.8. Datos de campo, lecturas de velocidad de crecimiento tubo germinativo. Sin purificación.....	11
Anexo. 30. Lecturas a las 08H00	
Anexo. 31. Lecturas a las 12H00	
Anexo. 32. Lecturas a las 16H00	
Anexo. 33. Porcentaje de crecimiento del hongo bajo el efecto del aceite de canela.....	12

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Efectos de la dosis 0.9 ml x L ⁻¹ en el tubo.....	53
Fig. 2. Efectos de la dosis 1.4 ml x L ⁻¹ en el tubo germinativo. Fase A.....	53
Fig. 2. Efectos de la dosis 1.4 ml x L ⁻¹ en el tubo germinativo. Fase B.....	53
Fig. 3. <i>Botrytis cinerea</i> Pers. hidratación de conidias. (Lagos, 2018).....	54
Fig. 4. <i>Botrytis cinerea</i> Pers. matriz compuesta. (Lagos 2018).....	54
Fig. 5. <i>Botrytis cinerea</i> Pers. (Lagos, 2018).....	54

RESUMEN EJECUTIVO

Con el propósito de evaluar el efecto del aceite de canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume) sobre *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro* e *in vivo*. En los laboratorios BIONIKA, ubicado en la ciudad de Quito. El factor en estudio fue las dosis de aplicación del producto comercial CINAMON, con este propósito, se prepararon diluciones de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.3, 1.4 ml L⁻¹. La concentración del fitopatógeno fue de log 6, tanto en los ensayos en *in vivo* como en *in vitro*, además se empleó un testigo absoluto (sin aplicación de aceite de canela) y de un testigo positivo con la aplicación de un fungicida cuyos ingredientes activos son Ciprodinil+Fludioxonil.

Los tratamientos investigados fueron 14, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estadísticamente se aplicó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con 4 repeticiones, se efectuaron análisis de varianza y pruebas significativas Tukey al 1%, para los tratamientos que demostraron significación estadística. Para el aislamiento de *B. cinerea*, se aplicó la metodología desarrollada en el laboratorio Bionika y que implica las siguientes fases: extracción, identificación del hongo y purificación.

Las variables respuesta fueron: la germinación de conidias de *Botrytis cinerea* Pers., El proceso de evaluación se inició luego de 12 horas de inoculación, la toma de datos se efectuó cada 2 horas; para los cálculos correspondientes se aplicó la fórmula propuesta por Cañedo y Ames, y modificada por Falconí: % GC=(número de conidias germinadas/número total de conidias)* 100; la velocidad de crecimiento del tubo germinativo (vctg), se midió a intervalos de 4 horas, previo a la inoculación de 24 horas y se aplicó la fórmula propuesta por Arango et. Al. y modificado por Falconi: vctg (mm/d) = crecimiento tubo germinativo (mm)/ horas de incubación; los modos de acción se determinaron organográficamente por medio de Cito Histoquímica.

La evaluación del efecto del aceite de canela en el fitopatógeno determinó que la mejor dosis fue de 1.4 ml x L⁻¹ ya que inhibió el crecimiento del hongo y su proliferación en *in vitro* e *in vivo*. En el establecimiento para determinar la dosis de aceite se realizó un previo ensayo con dosis de 0.25 ml x L⁻¹, 0.50 ml x L⁻¹ y 1.0 ml x L⁻¹. Los resultados del test *in vivo*, se analizaron organográficamente los potenciales sitios de acción, y su efecto por los ingredientes activos del aceite de canela CINAMON®. En este caso los efectos se evidenciaron a partir de la dosis 1.0 ml x L⁻¹ hasta 1.4 ml x L⁻¹.

Palabras claves: aceite de canela, CINAMON, *Botrytis cinerea* Pers, rosa.

SUMMARY

To evaluate the effect of cinnamon oil (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) on *Botrytis cinerea* Pers. *In vitro* and *in vivo*. In the BIONIKA laboratories, located in the city of Quito. The factor under study was the application doses of the commercial product CINAMON, for this purpose, dilutions of 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 were prepared, 1,2, 1.3, 1.4 ml L⁻¹. The concentration of the phytopathogen was log 6, both in the *in vivo* and *in vitro* tests, in addition an absolute control (without application of cinnamon oil) and a positive control with the application of a commercial fungicide (Ciprodinil + Fludioxonil)

The treatments investigated were 14, both *in vitro* and *in vivo*. Statistically, a completely randomized block design (DBCA) with 4 replications was applied, analysis of variance and Tukey significant tests were performed at 1%, for the treatments that showed statistical significance. For the isolation of *B. cinerea*, the methodology developed in the Bionika laboratory was applied and involved the following phases: extraction, identification of the fungus and purification.

The response variables were: the germination of conidia of *Botrytis cinerea* Pers., The evaluation process was started after 12 hours of inoculation, the data collection was made every 2 hours; for the corresponding calculations, the formula proposed by Cañedo & Ames was applied, and modified by Falconí: % GC = (number of germinated conidia / total number of conidia) * 100; the germinative tube growth rate (vctg) was measured at intervals of 4 hours, prior to the 24-hour inoculation, and the formula proposed by Arango et. Al. And modified by Falconi: vctg (mm / d) = germ tube growth (mm) / hours of incubation; the modes of action were determined organographically by means of Cytohistochemistry.

The evaluation of the effect of cinnamon oil on the phytopathogen determined that the best dose was 1.4 ml x L⁻¹ since it inhibited the growth of the fungus and its proliferation *in vitro* and *in vivo*. In the establishment to determine the oil dose, a previous test was carried out with doses of 0.25 ml x L⁻¹, 0.50 ml x L⁻¹ and 1.0 ml x L⁻¹. The results of the *in vivo* test were analyzed organographically the potential sites of action, and their effect by the active ingredients of the cinnamon oil CINNAMON[®]. In this case the effects were evidenced from the dose 1.0 ml x L⁻¹ up to 1.4 ml x L⁻¹.

Keywords: cinnamon oil, CINAMON, *Botrytis cinerea* Pers, rose.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Los sectores florícolas en el Ecuador constituyen uno de los rubros más importantes dentro de las exportaciones, dada la importancia de estos cultivos para la economía nacional, los productores ciclo a ciclo procuran mejorar las técnicas del cultivo, con el fin de satisfacer los requerimientos de la diversidad de variedades. Por ello, es importante realizar un adecuado manejo del cultivo y control fitosanitario programado, debido a que son varios los problemas que afectan a los rosales, que, al encontrarse bajo condiciones de invernadero, potencializan a la aparición de plagas y enfermedades las cuales provocan mayores pérdidas económicas, entre ellas se pueden destacar: *Botrytis cinerea*, *Sphaeroteca* sp. y *Peronospora* sp. entre otras. Por esta razón los diversos productores cuentan con programas de control fitosanitarios, considerando el tiempo de aplicación, dosificación, y frecuencia de rotación (Iza y Lincango, 2018),(Espinoza y Rene, 2016).

Las rosas ecuatorianas tienen como principales mercados a Estados Unidos, Alemania, Rusia, Italia y Canadá, en menor cantidad se exporta a Francia, Argentina entre otros países. Por su crecimiento vertiginoso se ha convertido en una de las fuentes más importantes para la generación de empleos. Una de las principales amenazas fitosanitarias que tienen las rosas de exportación es; *Botrytis cinerea*, hongo que ataca principalmente a las estructuras aéreas de la planta, generando micelios de color pardo esto provoca que la flor no se abra, el mayor daño sucede durante el almacenamiento o en el transporte por la alta humedad presentada en estos sitios (González, Leon, Molina, y Vera, 2018).

Con estos antecedentes en los sistemas productivos de Rosas. Se están buscando y aplicando de estrategias de control biológico a través de diferentes tipos de microorganismos que reducen el riesgo de resistencia del patógeno (Bautista, Barbosa, y Uribe, 2016).

Botrytis cinerea Pers., es un hongo fitopatógeno denominada “podredumbre gris”, con gran importancia en el sector agrícola de numerosos países, (Heard *et. al.*,2015). Es el agente causal de la “podredumbre gris” en numerosas especies de plantas,

como la vid, la fresa, la frambuesas y flores entre ellas rosas (Van Kan, Shaw, y Grant-Downton, 2014).

El control de esta enfermedad depende principalmente de las aplicaciones frecuentes de fungicidas. La evolución de *B. cinerea* Pers. creó resistencia a diferentes clases de fungicidas, en consecuencia, los productores deben cambiar su estrategia de control y utilizar mezclas de fungicidas y alternativas con diferentes modos de acción (Wenyong, Yu, Weichao, y Changjun, 2015).

La resistencia del patógeno puede ser monogénica o poligénica, las cuales están determinadas por el grupo químico y el modo de acción de los fungicidas, (Iza y Lincango, 2018)

El uso de compuestos vegetales con actividad antimicrobiana pueden ser alternativas viables a la aplicación de fungicidas sintéticos para el control de patógenos que atacan a los cultivos. La actividad de los extractos podría atribuirse a compuestos fenólicos conocidos por poseer altos niveles de actividad antimicrobiana, la composición fenólica de los extractos puede tener una importancia peculiar para la eficacia antimicrobiana, debido a la estructura de cada compuesto fenólico (Gatto, Ippolito, Sergio y Di Venere, 2016),(Schumacher et al., 2015).

Además, estudios sobre aceites esenciales, que son líquidos viscosos semivolátiles, obtenidos de material vegetal como hierbas, flores, hojas, semillas, ramas, y cortezas entre otros demostraron que sus componentes químicos han ganado un creciente interés, debido a su posible uso como antimicrobianos, antifúngicos y antioxidantes. Un ejemplo de ellos, es el aceite esencial de canela, bien conocido por su actividad antimicrobiana, antioxidante, derivada principalmente de sus componentes fenólicos Valenzuela et al., (2016),(Echegoyen y Nerín, 2015),(Xing et al., 2014) (Reyes, Palou y López, 2014).

La presente investigación permitió evaluar el efecto fungicida que posee el aceite de canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume) aplicando en diferentes dosis para el control de *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro* e *in vivo* en rosa.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

González, *et al.*, (2014), investigó las propiedades antifúngicas y antioxidantes de los aceites esenciales, demostrando que el aceite esencial de hoja de canela posee un alto poder antifúngico atribuido principalmente al eugenol, que es su compuesto mayoritario, y que posee una capacidad alta para la estabilización y neutralización de radicales libres, razón por la cual se le otorga propiedades antifúngicas y antioxidantes con potencial de ser utilizado como tratamiento pos-cosecha.

Silva-Espinoza, *et al.*, (2013), mostraron que los aceites esenciales de canela poseen actividad antimicrobiana, insecticida, acaricida, antioxidante y antimutagénica, otra función del aceite de la canela es la de inducir a la apoptosis, esto a su vez genera la consecuente necrosis a través de un mecanismo, que interfiere con la función mitocondrial de las células.

Black Solís, Ventura Aguilar, Barrera Necha y Bautista Baños, (2017), desarrollaron modelos matemáticos del crecimiento y germinación *in vitro* de *Alternaria alternata* en presencia de aceites esenciales, considerando sus componentes principales, también se encontraron similitudes entre ellos considerando su composición volátil. El crecimiento micelial y germinación de conidios de *A. alternata* se evaluó en PDA con aceites de limón y de canela comercial y no comercial, en el que predominó el cis-cinamaldehído. El aceite de canela con dosis de (0.5 y 1.0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$) inhibió el crecimiento micelial de *A. alternata* mientras que, la germinación se inhibió el 100% con la presencia de aceite de limón (D-Limoneno) utilizando dosis desde (0.25 y 0.5 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$). Los modelos matemáticos y los análisis de componentes principales son herramientas eficaces para entender el efecto de los aceites esenciales en *A. alternata*.

Entre los efectos antimicrobianos de la canela tenemos el aumento de la permeabilidad y la salida de iones de la membrana. Esta actividad microbiana se da gracias a la acción de sus componentes tales como: taninos, saponinas, aceites esenciales, compuestos fenólicos y flavonoides, sus extractos etanólicos muestran gran actividad contra las cepas resistentes, a diferencia de los antibióticos convencionales (López, Castaño y Mejía, 2013).

Jiménez y Mosquera. (2014), investigaron la “Actividad antifúngica *In vitro* de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* Pers. (Moho gris) los extractos evaluados fueron de *Ruta graveolens*, *Nicotiana tabacum* y *Crisanthemum morifolium* para combatir el hongo de *Botrytis cinerea* Pers.. El extracto diclorometánico de *Ruta graveolens*, inhibió la germinación de conidios de *B.cinerea* Pers. en un 57.5%. La actividad antifúngica observada se atribuía a metabolitos secundarios como cumarinas, flavonoides y alcaloides que fueron los más abundantes detectados en el extracto.

Ochoa et al., (2012), estudiaron la “Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos (*Shinus molle*, *Annona cherimola*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Nicotiana glauca*) para el control de tres especies de *Fusarium spp*” en el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum* y *F. solani*; evidenciando que el extracto de chirimoya y canela presentaron efectos inhibitorios sobre el crecimiento micelial y en la esporulación del hongo.

En estudios previos, se han reportado la eficacia y especificidad de distintos aceites esenciales sobre el control de hongos fitopatógenos, se indica que el aceite esencial de limón (*Citrus limón*) inhibió el desarrollo de *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium chrysogenum*, también se reportó la efectividad del aceite esencial de corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) en el control del crecimiento micelial y la germinación de esporas de los hongos de genero *Fusarium* (Black Solis et al., 2017).

Investigaciones realizadas demostraron la eficacia de la combinación de la aplicación de quitosano y *Cinnamomun zeylanicum* en aceites esenciales sobre la inhibición de

Botrytis cinerea Pers., el agente causal de moho gris en fresa, en medios de laboratorio y frutas durante el almacenamiento de 7 días a 4°C y por 3 días a 20°C, las aplicaciones de diferentes concentraciones inhibieron el crecimiento del micelio del hongo ensayado. Los resultados indicaron que los tratamientos de prueba redujeron el crecimiento de hongos de una manera dependiente de la concentración, es decir, a medida que la concentración aumenta el crecimiento radial disminuye (Mohammadi, Hashemi y Hosseini, 2015).

Ensayos experimentales determinaron que la cantidad de polifenoles y de terpenos presentes en el extracto de la cáscara de mangostino, tienen un efecto antifúngico sobre *Botrytis cinerea* Pers., con potencial para ser utilizado como bioconservante en especies hortofrutícolas, contribuyendo así a la disminución de pérdidas poscosecha y al impacto ambiental (Diaz, Duarte y Chaparro, 2014).

Estudios realizados con extracto de hoja de vid silvestre, de tres accesiones, P-178, E-200 y TN-4; se evaluaron *in vitro* a 6,8 y 12% de extractos con el fin de medir el efecto inhibitorio en el crecimiento de *Botrytis cinerea* Pers., comparativamente se empleó resveratrol en dosis (60, 90, 120 (µg/ mL)) un tipo de fitoalexina que se produce en varias plantas como respuesta a una lesión o ataque de patógenos; extracto de cítricos al 3, 5 y 8%. Todos los extractos de hoja de vid tuvieron acción inhibitoria; especialmente, P-178 al 12% tuvo 72, 75 y 62% de inhibición de crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial, respectivamente. Esta dosis tuvo 19.9 mg/mL de compuesto fenólicos, resveratrol 1.7mg/mL, ácido gálico 3.8 mg/mL y ácido ferúlico 2.5 mg/mL (Apolonio-Rodríguez, Franco-Mora, Salgado-Siclán y Aquino-Martínez, 2017).

En investigaciones realizadas se evaluó el efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* y *Thymus vulgaris* L. en concentraciones de 128, 256 y 500 mg/l sobre *B. cinerea* Pers. *in vitro* e *in vivo*. Se determinó *In vitro* el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo. En estas condiciones se observó que el aceite esencial de *L. origanoides* presentó el porcentaje de control más alto de un 66.2% sobre *B. cinerea* P., *in vivo* se observó que en bananos inoculados con *B. cinerea* P., después de 120 días los aceites esenciales controlaron eficientemente la incidencia de daño causado por el patógeno estudiado y no se

encontraron diferencias significativas con el control químico utilizando el fungicida Benomil (Andrade, Orozco, Correa y Huertas, 2014).

Silva-Espinoza et al., (2013) demostraron que el aceite de hoja de canela aplicado en frutos provocó una disminución del crecimiento de micelios del hongo *Botrytis cinerea* Pers. en la superficie de los frutos, además, el aceite incrementó el contenido de fenoles y flavonoides y la capacidad antioxidante de dichos frutos. Sin embargo, los niveles de agrado se vieron afectados moderadamente por la aplicación del aceite de canela.

Bravo, López, Sánchez, Bautista y Guillén, (2018), manifiestan que existen varios hongos postcosecha que causan enfermedades ya que reducen en gran medida la vida en el almacenamiento, en un previo estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicótico de películas formularas con quitosano combinadas con cera de abeja, ácido oleico y aceites esenciales de tomillo, canela y clavo fueron evaluadas primeramente como inhibidores del crecimiento micelial *in vitro* de *Rhizopus stolonifer*, *Colletorichum gloesporidoides*, *Alternaria alternata*. Los formulados que mejor respondieron *in vitro* fueron evaluados por inmersión del fruto de papaya, las películas a base de quitosano, cera de abeja y aceites esenciales de canela y clavo al 1% inhibieron completamente el crecimiento micelial de los tres hongos.

Según Barrera y García, (2018), por la importancia de los hongos fitopatógenos y la dificultad para lograr un buen control, debido a su resistencia a los antifúngicos, se han desarrollado nuevas investigaciones para encontrar alternativas basadas en productos naturales. El efecto de los aceites y sus compuestos fue investigado en bioensayos en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, el mejor efecto antifúngico que fue observado durante 8 días con aceite de *Thymus vulgaris*, el cual presento una inhibición de 300 ug/ml, mientras el aceite de *Cinnamomum zeylanicum*, exhibió una inhibición del crecimiento micelial dependió de las diversas dosis incrementadas.

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

2.2.1.1. Aceites esenciales

Según Mendoza, (2017) los aceites son compuestos naturales, volátiles y complejos sintetizados por diversas partes de las plantas, los aceites son obtenidos por presión, fermentación, o destilación por vapor. Los aceites esenciales se han posicionado como alternativa agronómica para sustituir los plaguicidas sintéticos del mercado actual, por poseer propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Además, de esto, pueden sustituir aditivos sintéticos en los alimentos, favoreciendo la estabilidad de éstos

Los aceites son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos y que se producen y almacena en los canales secretores de las plantas. Normalmente son líquidos a temperatura ambiente y por su volatilidad, son extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua (Maule, 2005).

Los aceites esenciales son mensajeros químicos que las plantas utilizan para interactuar con su entorno. Permiten alejar las enfermedades y los parásitos, tienen un papel importante en la reproducción y dispersión de las especies vegetales que permiten atraer a los insectos polinizadores (Luengo, 2004).

- CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Según Maule (2005), los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

- Consistencia

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- ✓ Esencias
- ✓ Bálsamos
- ✓ Resinas

- **Origen.**

De acuerdo con su origen los aceites se clasifican como:

- ✓ Naturales
- ✓ Artificiales
- ✓ Sintéticos

- **Naturaleza química**

El contenido total en aceites esenciales de una planta es en general bajo (inferior al 1%), pero mediante extracción se obtiene en una forma muy concentrada que se emplea en los diversos usos industriales. La mayoría de ellos, son mezclas muy complejas de sustancias químicas.

- **CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Maule (2005), señala como características físicas de los aceites esenciales son las siguientes:

- Son volátiles
- Incoloros o ligeramente amarillos
- Índice de refracción elevado
- Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo

2.2.1.2. CANELA (*Cinnamomun zeylanicum* Blume)

- Generalidades

Planta típica del oriente muy conocida por su empleo como condimento y por sus usos por tener la capacidad antifúngica y antioxidante. El aceite de canela se extrae de la corteza del árbol. El género *Cinnamomum* proviene de cina referente a China y amomos nombre de una planta de la familia del jengibre, con olor similar (Aizaga, 2017).

El aceite esencial de canela, se obtiene de forma natural, actuando como un excelente fungicida en la agricultura ecológica, ya que no deja residuos en los cultivos por ser altamente volátil, Además, por poseer propiedades ricas en fenol produce un efecto toxico en los hongos que atacan al cultivo así logrando combatir la enfermedad e inhibir el desarrollo de hongos y bacterias (Mendoza, 2017).

- Clasificación botánica

Aizaga, (2017) describe la siguiente clasificación taxonómica de la canela:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Laurale
Familia:	Lauraceae
Género:	<i>Cinnamomum</i>
Epíteto específico:	<i>Zeylanicum</i>
N. científico:	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
N. vulgares:	Canelle, Canela

- CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

Según Aizaga. (2017) las siguientes características botánicas de la canela son:

- **Planta**

Árbol, de hasta 15 metros de altura, ramaje tetragono, recubierto de una corteza amarillosa y aromática, de sabor picante y dulce, su tallo es de consistencia leñosa.

- **Hojas**

Hojas ovadas de hasta 18 cm de longitud, haz rojizo cuando son jóvenes, pasando a verde brillante y con envés verde pálido en la madurez.

- **Flores**

Flores de olor dulce en panículas, de color blanco o rojo.

- **Fruto**

Bayas de color azul o negras de 1cm de diámetro, muy picante.

- **ALGUNOS REQUERIMIENTOS**

Aizaga. (2017), señala que la canela presenta como principales requerimientos los siguientes:

- **Suelo**

Los suelos aptos para el desarrollo de la canela son ligeros arenosos, profundos y ricos en materia orgánica.

- **Clima**

La canela es un árbol de clima tropical húmedo, que se encuentra en estado silvestre desde el nivel del mar hasta 1200 metros de altura.

- **Usos y propiedades**

La canela es una planta aromática con un poder antiséptico polivalente, antiinfeccioso, antifúngico y antibacteriano, con un espectro de acción tan poderoso que destruye el 98% de los gérmenes patógenos. Es, además, un tónico muy importante para el sistema nervioso central, estimulante general, sexual y afrodisíaco. El aceite de la corteza de la canela y sus extractos presentan actividades antifúngicas, antibacteriana y antiviral (Calo, Crandall, O'Bryan, y Ricke, 2015).

La corteza de la canela en pedazos o en polvo, es una de las principales especies utilizadas para condimentar diversas preparaciones. En la medicina tradicional se usa como estimulante, aromático, aperitivo, emenagogo, astringente, carminativo, digestivo, para ayudar a la secreción del jugo gástrico (Aizaga, 2017)

METABOLITOS SECUNDARIOS

La canela contiene cinnamaldehído (60 – 75%), benzaldehído y cuminaldehído, fenoles y otros compuestos (4 – 10%) como el eugenol, pineno, cimeno, cariofileno, linalol, farnesol, gamma-terpineol, geraniol, isoegeneol, furfural, alcanfor, alfa-pineno, alfa-terpineno, alfa-ylangeno, beta-pineno camfeno (Aizaga, 2017).

CINAMON®

BiocontrolScience, (2017), caracteriza a CINAMON®, de la siguiente forma:

- **Propiedades**

CINAMON® contiene sustancias activas botánicas de alta calidad, destinadas para atenuar el estrés de los cultivos aplicados con CINAMON®, reaccionan de mejor forma los procesos de recuperación y de productividad, de tal forma que los procesos energéticos expresados por el vegetal afectado se direccionan puntualmente a las funciones fisiológicas involucradas con la calidad de cosecha.

- **Modo de acción**

Las propiedades fitoterapéuticas de CINAMON[®], se deben a más de diez sustancias activas formuladas en un producto con propiedades únicas, dentro de éstas, no se descuidan las condiciones de alta intensidad productiva del vegetal. Otro de los mecanismos interesantes del producto, es donde las porciones del vegetal tratadas en forma preventiva se tornan insípidas y desagradables.

- **Compatibilidad**

CINAMON[®], es compatible con la mayoría de los herbicidas, e insecticidas, fungicidas, defoliantes, fertilizantes foliares, reguladores de crecimiento, no es fitotóxico. No obstante, se debe tener en cuenta que la mezcla final tenga un pH de 5.5 a 6.8 y manejar un dispersante no iónico. Aplicar a una temperatura menor a 25°C.

- **Presentación**

El CINAMON[®] viene en envases de 250 ml, 500 ml, Litro, Galón de 3.78 L y caneca de 20 litros.

- **Dosis**

El CINAMON[®] altamente recomendado para condiciones de producción agrícola intensiva, épocas de recuperación vegetal, detoxificación agroquímica. Recomendaciones generales: 1.0 – 2.0 ml por litro de Agua. En las aplicaciones de mantenimiento o preventivas de cultivo se recomienda la dosis de 0.5 – 0.8 ml/L. en caso de tener altas incidencias, esta dosificación puede subir. No existen riesgos de fitotoxicidad, si se conducen las aplicaciones bajo normas técnicas establecidas. El elemento orgánico reduce esta posibilidad.

SWITCH (FUNGICIDA TESTIGO)

Syngenta (2017), describe a Switch como sigue:

- **Características**

Fungicida para el control de *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Stemphylium* y *Antracnosis*, Switch se presenta en forma de granulado dispersable en agua.

- **Formulación**

SWITCH se presenta como Ciprodinil 37,5% p/p (375 g/Kg) + Fludioxonil 25% p/p (250 g/Kg), granulado dispersable en agua (WG).

- **Modo de acción**

SWITCH, debido a su composición es un fungicida que presenta dos formas de acción diferentes y complementarias. Actúa en el ciclo de vida de los hongos principalmente durante el proceso de penetración y crecimiento del micelio dentro del tejido de la planta. Ciprodinil muestra una buena y rápida translocación acrópeta dentro de las hojas y frutos, Fludioxonil tiene una translocación limitada y su principal actividad es por contacto.

- **Las recomendaciones de uso de Switch se presenta en la tabla 1.**

Tabla 1. RECOMENDACIONES DE USO DE SWITCH

Cultivo	Ámbito de utilización	Plaga	Tipo de aplicación	Dosis recomendada	Plazo de seguridad
tomate	Aire libre	Botrytis y Esclerotinia	Pulverización normal, n° apl. 2 (10 - 14 días)	60 - 100 g/Hl (Max. 1 kg/ha)	3 días
	Invernadero		Pulverización normal, n° apl. 3 (10 - 14 días)		3 días
Vid de mesa	Aire libre	Botrytis y Aspergillus	Pulverización normal, n° apl. 2 (21 días)	0,6 - 1 kg/ha	7 días

Fuente.- (Syngenta, 2017)

- **Modo de empleo**

Se recomienda aplicar en pulverización normal, de forma preventiva al inicio de la infección, o en las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad. La aplicación se realizará mediante tractor con barra hidráulica, atomizador o mochila hidráulica al aire libre y en invernadero, mediante pulverizador hidroneumático, tipo cañon atomizador desde el exterior, aplicación manual con pistola pulverizadora o mediante sistemas de instalaciones fijas.

Se deberá respetar los siguientes volúmenes de caldo:

- ✓ Berenjena, Pimiento: 800 – 1500 l/ha
- ✓ Cebolla, Cebolleta, Lechugas y Hierbas aromáticas: 300 – 1000 l/ha
- ✓ Vid: 400 – 1000 l/ha
- ✓ Tomate: 500 – 1500 l/ha
- ✓ Fresal: 500 – 1000 l/ha al aire libre y de 500 – 2000 l/ha en invernadero
- ✓ Leguminosas: 400 – 800 l/ha
- ✓ Frambuesa, Mora y Tabaco de 500 – 1000 l/ha
- ✓ Frutales de hueso: 1000 – 1500 l/ha

- **Riesgos toxicológicos y ambientales**

- ✓ Pueden provocar una reacción alérgica en la piel.
- ✓ Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos duraderos

2.2.2. VARIABLE DEPENDIENTE

2.2.2.1. Moho gris, pudrición gris (*Botrytis cinerea* Pers.)

Es una enfermedad que ataca la flor, cuando lo hace, esta presenta manchas de color café, las cuales casi a menudo son invisibles. Una vez que la flor se somete a cambios de temperatura, la enfermedad se desarrolla aceleradamente, los pétalos se pudren y luego toman un color grisáceo. También puede atacar la madera en el nivel del tallo o corte (Vasquez, 2017).

Este mismo autor señala que el patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado infectando diferentes partes de la planta. Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas que tiene en cultivos de importancia tales como vid, ornamentales y otras.

GENERALIDADES

Gómez Alvarez (2012), describe a la “podredumbre gris” o “moho gris” como una enfermedad producida por un hongo necrotrofico que afecta a 200 especies vegetales, cuyo agente es *Botrytis cinerea* Pers.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Gómez Alvarez (2012), describe la siguiente clasificación taxonómica:

Reino:	Fungi
División:	Amastigomycota
Clase:	Deuteromycetes
Orden:	Moniliales
Familia:	Moniliales
Género:	<i>Botrytis</i>
Epíteto específico:	<i>Cinerea</i>
Nombre Científico:	<i>Botrytis cinerea</i>
N. vulgares:	Moho gris, Podredumbre gris.

MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE *Botrytis cinerea*

Gómez Alvarez (2012), señala que la morfología y la función de las partes del hongo le permiten infectar a su hospedero; el micelio está conformado por un conjunto de filamentos tabicados, se multiplican por división citoplasmática, el micelio envejecido, forma diversas estructuras tales como los macroconidióforos, microconidióforos y esclerocios para una debida supervivencia en condiciones desfavorables.

Las principales estructuras de dispersión y resistencia del hongo son denominadas conidios, las clamidosporas son células de aspecto hialino de alta variabilidad, son estructuras de resistencia bajo condiciones críticas, en condiciones de humedad y sin nutrientes, las estructuras germinan dando lugar a microconidios, los esclerocios son considerados las estructuras de mayor importancia involucradas en la reproducción y supervivencia del hongo (Gómez Alvarez, 2012).

CICLO DE INFECCIÓN

El ciclo de infección que sigue *B. cinerea*. como la describe Gómez Alvarez (2012) es el siguiente:

- **Adhesión y germinación**

La adhesión de las estructuras de propagación como los conidios, se lleva a cabo por dos fases, en la primera el conidio se hidrata para establecer interacciones hidrofóbicas y permitir su germinación, la segunda fase se presenta cuando el conidio ha germinado y se forma una matriz compuesta de lípidos, polisacáridos y melanina con estos componentes el hongo puede adherirse a la superficie del hospedero.

- **Penetración**

Botrytis cinerea Pers. es capaz de producir sustancias que tienen la capacidad de descomponer el material vegetal para facilitar la penetración, la cutinasa es la enzima

que destruye la cutina, lo cual es la primera barrera de protección que contiene la planta, otra enzima que degrada la pectina de la pared celular y las lipasas es dominada pectinasa.

- **Muerte del tejido vegetal**

La eliminación del calcio de la pectina provoca que esta absorba agua y se hinche, causando una deformación, otra forma de ocasionar la muerte celular del tejido está mediada por la producción de especies reactivas de oxígeno.

- **Fase de latencia**

Durante esta fase la planta presenta mecanismo de defensa, por lo que el hongo permanece en estado de latencia.

- **Colonización y maceración**

Cuando las condiciones son favorables para el hongo, la infección se establece, segregando una serie de enzimas degradativas, obteniendo nutrientes para su crecimiento a partir del tejido vegetal.

- **Esporulación y dispersión**

La putrefacción en el tejido vegetal se presenta una vez establecida la infección, las condiciones permiten la formación de conidios y conidióforos sobre la superficie del cultivo, ya que el hongo a esporulado, las dispersiones de los conidios inician nuevamente infectando diferentes superficies vegetales.

2.2.3. UNIDAD DE ANÁLISIS

La muestra estudiada fue aislada del banco de hongos de los laboratorios BIONIKA, por lo cual luego de la desinfección del material se cultivó en placas PDA, se colocaron en una incubadora con temperatura de 23°C con 75% de humedad por lapsos de 7 a 15 días, lo cual las placas fueron cubiertas con papel aluminio, se realizaron diez purificaciones, las siembras se realizaron en propagación *in vitro* e *in vivo*

2.2.3.1. PROPAGACIÓN *IN VITRO*

Es una técnica muy utilizada, lo cual permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos de forma rápida (Segretín, 2006). El cultivo *in vitro* permite el crecimiento y desarrollo en recipientes que lo separan del ambiente exterior y lo mantienen en condiciones controladas y asépticas (Navarro, 2013).

2.2.3.2. PROPAGACIÓN *IN VIVO*

En la propagación *in vivo* esta ocurre cuando se establece una determinada planta madre, del cual se extraerán fragmentos para obtener explantos, en los cuales pueden ser yemas, trozos de hoja, porciones de raíces o semillas o tiene lugar dentro de un organismo vivo en condiciones naturales o condiciones de laboratorio, esto permite establecer el cultivo en condiciones de asepsia, para obtener explantos con un grado de desarrollo adecuado, las plantas seleccionadas deben permanecer en refrigeración para poder realizar cortes de cualquier parte de la planta y poderlas utilizarlas en condiciones de laboratorio (Navarro, 2013).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

El aceite de canela tiene efecto fúngico sobre *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro* e *in vivo*.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del aceite de canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume) sobre *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro* e *in vivo*.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la dosis de aceite de canela necesaria para el control de *Botrytis cinérea* Pers. *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar el efecto inhibitorio y mecanismos de acción, por métodos cito histoquímicos de canela sobre *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro* e *in vivo*

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO (ENSAYO)

El experimento se realizó en los laboratorios BIONIKA Cia. Ltda. Siendo su Director el Dr. Carlos Falconi.

Ubicación: Quito

Altura: 2834 msnm

Coordenadas: 0°05'54''S

78°28'06''W

4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

Como la investigación se realizó en condiciones de laboratorio *in vitro* como *in vivo*; las condiciones ambientales de temperatura y humedad fueron controladas a 23±2°C con 75% de humedad, estos valores permitieron controlar posibles infecciones, así como el efecto de factores externos.

4.3. EQUIPOS Y MATERIALES

Los principales materiales utilizados en el ensayo fueron.

- Asas
- Atomizador
- Cajas Petri
- Cámara de atmosferas modificadas
- Cámara de neubauer
- Cápsulas de porcelana
- Detergente
- Fundas plásticas
- Guantes quirúrgicos
- Marcadores de punta fina indelebles
- Pissetas
- Porta y cubre objetos
- Mascarillas
- Microscopio
- Estereoscopio
- Material vegetal
- Micropipeta

- Producto Comercial
 - Papel parafilm
 - Papel toalla
 - Tubos de ensayo
 - Vasos de precipitación
- Canela (*Cinnamomum zeylanicum*)
- Botones de rosa
- Papel aluminio
- **Reactivos**
 - PDA (Potato Dextrose Agar)
 - Reactivos cito histoquimicos
 - Agua destilada
 - Solución Buffer
 - Alcohol industrial 95%
 - Tween 80

4.4.FACTORES EN ESTUDIO

4.4.1. Dosis de aplicación

El producto comercial CINAMON[®] se preparó en diluciones de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.3, 1.4 ml L⁻¹. La concentración del fitopatógeno fue de log 6, tanto en los ensayos en *in vivo* como en *in vitro*, además se aplicó un testigo absoluto (sin aplicación de aceite de canela) T₀ y de un testigo positivo T₍₁₎, que fue la aplicación de un funguicida comercial (Ciprodinil+Fludioxonil)

4.5.TRATAMIENTOS

4.5.1. Tratamientos *in vitro*.

Los tratamientos *in vitro* se señalan en la tabla 2, los cuales se aplicaron en placas de vidrio en atmosferas modificadas.

Tabla 2.- TRATAMIENTOS *IN VITRO*

No.	Símbolo	Descripción
1	D1	0.2 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
2	D2	0.3 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
3	D3	0.4 ml x L ⁻¹ CINAMON [®]
4	D4	0.5 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
5	D5	0.6 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
6	D6	0.7 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
7	D7	0.8 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
8	D8	0.9 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
9	D9	1.0 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
10	D10	1.2 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
11	D11	1.3 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
12	D12	1.4 ml x L ⁻¹ de CINAMON [®]
13	T ₀ (Testigo)	Sin aplicación del aceite
14	T ₁ (Testigo)	Aplicación Ciprodinil+Fludioxonil

4.5.2. Tratamientos *in vivo*.

Los tratamientos *in vivo* se presentan en la tabla 3 los cuales se aplicaron en pétalos de rosa en cámaras de ambiente modificado.

Tabla 3.- TRATAMIENTOS *IN VIVO*

No.	Símbolo	Descripción
1	D1	0.2 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
2	D2	0.3 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
3	D3	0.4 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
4	D4	0.5 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
5	D5	0.6 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
6	D6	0.7 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
7	D7	0.8 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
8	D8	0.9 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
9	D9	1.0 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
10	D10	1.2 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
11	D11	1.3 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
12	D12	1.4 ml x L ⁻¹ de CINAMON®
13	T ₀ (Testigo)	Sin aplicación del aceite
14	T ₁ (Testigo)	Aplicación Ciprodinil+Fludioxonil

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tanto *in vitro* como *in vivo*, se aplicó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con 4 repeticiones, se efectuaron análisis de varianza y pruebas significativas Tukey al 5%, para los tratamientos que demostraron significación estadística.

4.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO

4.7.1. Dilución del producto.

En la presente investigación el producto comercial CINAMON[®] se utilizó por sus características propias de un aceite, con este propósito se preparó diluciones de 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 700 µl, 800 µl, 900 µl, 1000 µl, 1200 µl, 1300 µl, 1400 µl en 500cc de agua, cada dilución contenía 10 µl de tween 80 por cada 100 cc de agua, 50 µl de alcohol industrial por cada 500 cc de agua, 70 µl de 7action el cual ayuda conservando las cualidades de la dilución, para la dilución del fungicida se utilizó 500 µl en 500 cc de agua, según recomendaciones del laboratorio Bionika (2017).

- Aislamiento de *Botrytis cinerea* Pers.

Para el aislamiento de *B. cinerea*, se aplicó la metodología desarrollada en el laboratorio Bionika (2017), y que es la siguiente:

• Extracción

Del banco de hongos de los laboratorios BiocontrolScience y BIONIKA se determinó las rosas para lo cual se extrajo *B. cinerea* Pers. de botones contaminados de rosas (*Rosa sp*), se colocaron en cámaras de ambiente modificado por 7 días para su debido crecimiento y así tener la siembra en PDA.

• Identificación del hongo

Se lo realizó con microscopia de manera visual, utilizando y aplicando la información de los “Principales géneros de hongos fitopatógenos” de Falconi (2013).

• Purificación de *B. cinerea* Pers.

Se prepararon placas de petri con medio PDA (Agar - papa - dextrosa) realizando diez inoculaciones en tiempos diferentes hasta obtener la purificación de *B. cinerea*

Pers. La purificación de *B. cinerea* Pers., se lo realizó en los laboratorios BIONIKA Cia. Ltda, aplicando su propia metodología.

4.8. VARIABLES RESPUESTA

4.8.1. IN VITRO

DETERMINACIÓN DEL EFECTO EN LA GERMINACIÓN EN EL INOCULO DEL FITOPATÓGENO (EFIP).

En la primera fase del proyecto investigativo, en los laboratorios “Bionika” se determinó la respuesta de germinación de conidias de *Botrytis cinerea* Pers., para lo cual sobre un portaobjetos se colocaron tres gotas 10 µl (microlitros) del fitopatógeno purificado, sobre cada una de estas se depositaron 10 µl (microlitros) de aceite de canela “CINAMON®”. Los portaobjetos así preparados se ubicaron en cámaras de atmosfera controlada, para procurar la temperatura y humedad adecuada. El proceso de evaluación se inició luego de 12 horas de inoculación, la toma de datos se efectuó cada 2 horas; se midió el número de conidias germinadas y que presentaron el tubo germinativo dos veces mayor al diámetro de las conidias, los resultados se promediaron a un solo valor, para los cálculos correspondientes se aplicó la fórmula propuesta por Cañedo y Ames, (2004) modificada por Falconí (2017):

$$\% GC = \left(\frac{\text{Numero de conidios germinadas}}{\text{número total de conidios}} \right) * 100$$

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DEL TUBO GERMINATIVO (VCTG)

Se incubó el inculo bajo condiciones controladas; 23±2 °C y 90 % de humedad. Se determinó el crecimiento del tubo germinativo a intervalos de 4 horas, previo a la inoculación de 24 horas y se aplicó la fórmula propuesta por (Arango Bedoya, Hurtado Benavides, Pantoja Daza, y Santacruz Chazatar, 2014) modificada por Falconi (2017):

$$\text{VCTG (mm/d)} = \left(\frac{\text{Crecimiento tubo germinativo (mm)}}{\text{horas de incubacion}} \right)$$

4.8.2. IN VIVO

- DETERMINACIÓN DE MODOS DE ACCIÓN POR MEDIO DE CITO HISTOQUÍMICA-

Tanto en los test *in vitro* como en *in vivo* se determinó organográficamente los potenciales sitios de acción, afectados por el efecto de los ingredientes activos del CINAMON®.

4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Se efectuó el análisis de variancia (ADEVA), de acuerdo con el diseño experimental planteado. Se realizó las pruebas de significación de Tukey al 5%, para diferenciar entre las diversas dosis del aceite de canela, se utilizó el programa INFOSTAT (2018).

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. *IN VITRO*

5.1.1. Germinación de conidias (GC) de *Botrytis cinerea* Pers. Purificadas, *In vitro* bajo condiciones de laboratorio

La germinación del inóculo se midió en cinco tiempos diferentes, iniciando a las 12 horas luego de la inoculación con diferencia de dos horas hasta llegar a la hora 20. El análisis de varianza de la lectura a las 08h00, demostró significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°1). La prueba de Tukey (Tabla N°4) distribuyó a los tratamientos en 4 rangos de significación, en el primer rango se ubicaron los testigos, es decir “sin aceite de canela” (T0), y el de “Ciprodinil+Fludioxonil” (T1), con 2,75 y 0 % conidias germinadas respectivamente, seguidos de los tratamientos con aceite de canela en dosis de 1.3 y 1.4 mL x L⁻¹ con valores de 18,5 y 17,08 % de conidias germinadas en su orden, ubicándose en el segundo rango; el tercer rango lo ocuparon los tratamientos con dosis de 1.0 y 1.2 mLxL⁻¹ de aceite de canela con 25,17 y 23 % conidias germinadas. Finalmente encontramos en el cuarto rango ocho tratamientos con aceite de canela cuyas dosis varían entre 0,2 y 0,9 ml x L⁻¹, en los cuales el porcentaje de conidias germinadas que matemáticamente son diferentes pero que desde el punto de vista estadístico no presentaron diferencias significativas, estos valores oscilaron entre 30,16 y 33,08 %, demostrando que las distintas dosis de canela aplicadas en este caso produjeron el mismo efecto en cuanto al porcentaje de conidias germinadas.

A partir de las 14 horas luego de la inoculación, cuyos datos fueron tomadas a las 10h00 de la mañana el análisis de varianza reportó significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°2) y al ser procesados, la prueba de Tukey (Tabla N°4) presentó 9 rangos de significación estadística, ubicándose en el primer lugar el tratamiento con “Ciprodinil + Fludioxonil”, que no registró porcentajes de germinación de las conidias. Los tratamientos sometidos a diferentes concentraciones de canela, así como el de sin aceite de canela, registraron valores de 17,00 hasta 40,67% conidias germinadas. El tratamiento con canela “CINAMON®” en

concentración de 1.4 ml x L⁻¹ registró el mejor comportamiento, pues el porcentaje de germinación de conidias fue el de menor valor (14,83%).

El análisis de varianza cuyos datos fueron tomados a las 12h00, reportó significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°3). La prueba de Tukey (Tabla N°4) a las 16h00 luego de la inoculación, demostró que el tratamiento con “Ciprodinil + Fludioxonil”, sigue manteniendo un comportamiento similar al registrado en las anteriores evaluaciones, ubicándose en el primer rango debido a que no registró ningún valor en la germinación del inóculo. El tratamiento con concentración de 1.4 ml x L⁻¹ de canela “CINAMON®”, es el que presentó menor porcentaje de germinación del inóculo con 14,58%; los restantes tratamientos registraron valores que oscilaron entre 14,58% hasta 48,42% de germinación del inóculo y un 100% de germinación con el tratamiento sin aceite de canela.

A las 18h00 de la inoculación el análisis de varianza, registró significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°4) la prueba de Tukey (Tabla N°4) mostró, que el tratamiento con “Ciprodinil + Fludioxonil”, mantuvo una similitud con las evaluaciones anteriores ya que no registró ningún valor respecto a la germinación del inóculo, razón por lo cual se ubicó en el primer rango; el tratamiento con una concentración de 1.4 ml x L⁻¹ de canela “CINAMON®”, estableció un valor de germinación de conidias del 14,16%, los tratamientos restantes demostraron valores diversos entre 18,50 hasta el 58,80% de inóculo germinado, el testigo sin aplicación de aceite de canela demostró un 100 % de germinación del inóculo.

20 horas después de la inoculación, el análisis de varianza registró significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°5), la prueba de Tukey (Tabla N°4) puso en evidencia de que el tratamiento a base de “Ciprodinil + Fludioxonil”, sigue manteniendo comportamientos similares respecto de impedir la germinación del inóculo, dado que registró un valor del 0% lo que permitió ubicarse en el primer rango; el tratamiento con una dosis de 1.4 mL x L⁻¹ de canela “CINAMON”, experimentó un valor del 13,25% de germinación de conidias, los tratamientos restantes presentaron diversos valores que oscilaron desde el 18,50 hasta el 92,66% de germinación del inóculo, y un 100% de germinación del inóculo que se produjo con el tratamiento sin aplicación de aceite de canela.

Tabla 4.- Prueba de Tukey para la variable porcentaje de germinación en el inoculo del fitopatógeno *Botrytis cinerea* Pers. purificación, In vitro.

TRATAMIENTOS	# CONIDIAS 12H	# CONIDIAS 14H	# CONIDIAS 16H	# CONIDIAS 18H	# CONIDIAS 20H
T1	30,16 D	36,33 G	43,50 F G	55,91 H I	92,66 I
T2	32,33 D	37,50 G H	44,83 G H	53,75 G H	80,91 H
T3	33,08 D	40,67 I	48,08 H	58,25 I	69,91 G
T4	31,66 D	39,50 H I	48,42 H	58,50 I	72,42 G
T5	33,08 D	35,92 F G	43,17 F G	52,42 F G	72,92 G
T6	33, 08 D	31,00 E	40,92 F	50,42 F	62,91 F
T7	33,08 D	35,17 F G	35,17 E	35,33 E	35,17 E
T8	33,08 D	33,08 E F	33,08 E	25,17 D	25,17 D
T9	25,17 C	25,17 D	25,17 D	23,00 D	23,00 C D
T10	23,00 C	23,00 D	23,00 D	23,00 D	23,00 C D
T11	18,50 B	18,50 C	18,50 C	18,50 C	18,50 C
T12	17,08 B	14,83 B	14,58 B	14,16 B	13,25 B
T13	2,75 A	17,00 B C	100,00 I	100,00 I	100,00 J
T14	0,00 A	0,00 A	0,00 A	0,00 A	0,00 A
E.E	0,75	0,58	0,74	0,64	1,01
C.V	6,06	4,19	3,99	3,16	4,09
P.VALOR	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Estos resultados demuestran que la purificación de *Botrytis cinerea* Pers. demostró ser susceptible a la solución de canela en diferentes dosis, situación que también Silva-Espinoza et al., (2013) demostraron, que el aceite de hoja de canela aplicados en frutos provocó una disminución del crecimiento de micelios del hongo *Botrytis cinerea* Pers. en la superficie de los frutos, además, el aceite incrementó el contenido de fenoles y flavonoides y la capacidad antioxidante de dichos frutos. Igualmente Ochoa et al., (2012), evidenciaron que el extracto de chirimoya y canela producen efectos inhibitorios sobre el crecimiento micelial y en la esporulación del hongo.

5.1.2. Germinación de conidias (GC) de *Botrytis cinerea* Pers. Sin Purificar, *In vitro* bajo condiciones de laboratorio

La germinación del inóculo de *Botrytis cinerea* Pers, sin purificación se lo midió igualmente en cinco tiempos diferentes, iniciando a las 12 horas luego de la inoculación, con una frecuencia de dos horas hasta llegar a la hora 20, el análisis de varianza, reportó significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°6) la prueba de Tukey 12h00 después de la inoculación (Tabla N°5) distribuyó los tratamientos en 11 rangos de significación, en el primer rango se ubicó el testigo químico con aplicación de “Ciprodinil+Fludioxonil” con una germinación del 0,33% de conidias, en el rango dos el testigo Sin aplicación de aceite de canela 23,33% conidias germinadas, en el rango tres se encontró el tratamiento con aceite de canela en una dosis de 1.4 ml x L⁻¹ con 44,75% de conidias germinadas, las dosis de 1.3 ml x L⁻¹ hasta 0.2 ml x L⁻¹ , registraron valores que oscilaron entre 54,00 hasta el 100 % de conidias germinadas.

A partir de las 14 horas de la inoculación, el análisis de varianza registró significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°7), la prueba de Tukey (Tabla N°5) distribuyó los tratamientos en 10 rangos de significación diferentes, el testigo químico en el primer rango mostró 0,33% de conidias, poniendo en evidencia el efecto del “Ciprodinil + Fludioxonil”; el testigo sin aceite de canela ocupó el segundo rango con 41,08% de conidias germinadas, en el tercer rango se encontró al tratamiento con las dosis de 1.4 ml x L⁻¹ con 43,50% de conidias germinadas. Los restantes tratamientos con dosis de 1.3 ml x L⁻¹ hasta 0.2 ml x L⁻¹ registraron valores entre 57,41 y 100% de conidias germinadas.

Tabla 5.- Prueba de Tukey para la variable porcentaje de germinación en el inoculo del fitopatógeno *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificación, *In vitro*.

TRATAMIENTOS	# CONIDIAS 12H	# CONIDIAS 14H	# CONIDIAS 16H	# CONIDIAS 18H	# CONIDIAS 20H
T1	100,00 K	100,00 J	100,00 G	100,00 F	100,00 F
T2	100,00 K	100,00 J	100,00 G	100,00 F	100,00 F
T3	100,00 K	100,00 J	100,00 G	100,00 F	100,00 F
T4	96,00 J	98,00 I	100,00 G	100,00 F	100,00 F
T5	84,33 I	93,08 H	100,00 G	100,00 F	100,00 F
T6	80,00 H	84,33 G	93,08 F	100,00 F	100,00 F
T7	83,00 I	74,08 F	74,33 E	74,58 E	74,33 E
T8	73,58 G	73,66 F	73,66 E	73,66 E	73,66 E
T9	64,83 F	65,33 E	65,41 D	65,41 D	65,41 D
T10	58,17 E	58,50 D	58,50 C	58,58 C	58,58 C
T11	54,00 D	57,41 D	57,41 C	57,41 C	57,41 C
T12	44,75 C	43,50 C	43,50 B	43,50 B	43,50 B
T13	23,33 B	41,08 B	100,00 G	100,00 F	100,00 F
T14	0,33 A	0,33 A	0,00 A	0,00 A	0,00 A
E.E	0,33	0,28	0,30	0,24	0,27
C.V	0,95	0,80	0,79	0,63	0,70
P.VALOR	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

A las 16 horas de la inoculación el análisis de varianza reportó significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°8), la prueba de Tukey (Tabla N°5) demostró que el testigo químico a base de “Ciprodinil + Fludioxonil” se presentó en el primer rango con 0% de conidias germinadas, el rango dos ocupó el tratamiento con aceite de canela en dosis de 1.4 ml x L⁻¹ con 43,50% de conidias germinadas, en el tercer rango las dosis de 1.3 ml x L⁻¹ y 1.2 ml x L⁻¹ con 57,41 y 58,50% de conidias germinadas respectivamente, valores de 57,41 hasta el 100% de conidias germinadas se establecieron con los tratamientos con dosis de 1.0 ml x L⁻¹ hasta 0.2 ml x L⁻¹ de aceite de canela..

A las 18 horas de la inoculación, el análisis de varianza, demostró significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°9), según la prueba de Tukey (Tabla N°5) el testigo químico “Ciprodinil + Fludioxonil” se encontró en el primer rango con 0% de conidias germinadas, la dosis 1.4 ml x L⁻¹ de aceite de canela con 43,50% de conidias germinadas se ubicó en el segundo rango, las dosis de 1.3 ml x L⁻¹ hasta 0.2 ml x L⁻¹, registraron porcentajes de germinación de conidias que oscilan entre, 57,41 y 73,66%. El testigo sin aceite de canela presentó el 100% de conidias germinadas.

A las 20 horas luego de la inoculación, al realizar el análisis de varianza, se comprobó la existencia de significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°10), la prueba de Tukey (Tabla N°5) registró 6 rangos de significación, el primer rango se encontró al tratamiento testigo con compuesto químico Ciprodinil + Fludioxonil sin germinación alguna, en el rango dos la dosis 1.4 ml x L⁻¹ mostro el 43,50 % de conidias germinadas, con las dosis de 1.3 ml x L⁻¹ hasta 0.2 ml x L⁻¹ de aceite de canela se registraron valores variables entre 58,58 a 74,33% de germinación de conidias. Igual que en el caso anterior el tratamiento sin aceite de canela registró el 100% de germinación de conidias.

Estos resultados demostraron que el aceite de canela en *Botrytis cinerea* Pers. sin tener purificación alguna se inhibió en un 43,50% de la germinación de conidios aspecto que Jiménez y Mosquera (2014), demostraron que el extracto diclorometánico de *Ruta graveolens*, inhibió la germinación de conidios de *B.cinerea* Pers. en un 57.5%. Igualmente Black Solís et al., (2017) también reportó que el

aceite de la corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), fue efectivo para el control del crecimiento micelial y la germinación de esporas de los hongos.

5.2.1 Velocidad de crecimiento del tubo germinativo (VCTG), para *Botrytis cinerea* Pers. Purificada.

La primera lectura sobre la velocidad de crecimiento del tubo germinativo del hongo *Botrytis cinerea* Pers., se efectuó 24 horas luego de la inoculación, el análisis de varianza reportó significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°11) al respecto la prueba de Tukey (Tabla N°6), distribuyó los tratamientos en cuatro rango de significación ubicándose en el primer rango los tratamientos T14 (Ciprodinil + Fludioxonil) y T3 ($0.4 \text{ ml} \times \text{L}^{-1}$) con valores de 0,71 y 0,96 mm/d, en el rango dos se ubicaron la mayoría de tratamientos con valores que varían entre 1,03 y 1,25 mm/d, en el tercer rango seis tratamientos registraron valores de 1,14 y 1,25 mm/d, esto nos demostró que el uso del fungicida “Ciprodinil + Fludioxonil”, es el mejor tratamiento pues registra el valor más bajo en el crecimiento del tubo germinativo, el uso de aceite de canela, resulto como el mejor tratamiento con una dosis de $1.4 \text{ ml} \times \text{L}^{-1}$ con un crecimiento igual a 0,96 mm/d. El tratamiento con menor efecto en el crecimiento del hongo fue el T13 (sin aceite) con la mayor velocidad de crecimiento (1,81 mm/d).

28 horas después de la inoculación, la virulencia se mantuvo como la registrada a las 24 horas; el análisis de varianza, registró significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°12), la prueba de Tukey (Tabla N°6), igualmente demostró cuatro rangos de significación, en el primer rango se manifestó el tratamiento con el fungicida “Ciprodinil + Fludioxonil”, el cual produjo un efecto positivo en inhibir el crecimiento del tubo germinativo con 0,71 mm/d, en este mismo rango se encontró el tratamiento T8 ($0.9 \text{ ml} \times \text{L}^{-1}$), con un crecimiento de 0,95 mm/d siendo este el mejor tratamiento con aceite de canela; el tratamiento que registró la mayor velocidad de crecimiento fue el tratamiento T13, es decir aquel que no se utilizó aceite de canela, con el mayor valor (1,51 mm/d).

Tabla 6: *In vitro*: Velocidad de crecimiento del tubo germinativo (VCTG) *Botrytis cinerea* Pers. Purificación.

Tratamientos	# Tubo	# Tubo	# Tubo
	germinativo 24h	germinativo 28h	germinativo 32h
T1	1,14 B C	1,26 B C D	1,61 B C D
T2	1,04 B	1,07 A B C	1,82 D
T3	0,96 A B	1,27 B C D	1,75 C D
T4	1,38 C	1,17 B C D	1,56 B C D
T5	1,07 B	1,18 B C D	1,49 B C D
T6	1,03 B	1,34 C D	1,34 A B C D
T7	1,18 B C	1,12 B C D	1,11 A B C
T8	1,05 B	0,95 A B C	0,98 A B
T9	1,13 B C	0,89 A B	1,17 A B C D
T10	1,25 B C	1,04 A B C	1,03 A B
T11	1,17 B C	1,08 A B C	1,17 A B C D
T12	1,16 B C	1,14 B C D	1,26 A B C D
T13	1,81 D	1,51 D	1,63 B C D
T14	0,71 A	0,71 A	0,71 A
E.E	0,01	0,02	0,07
C.V	10,43	13,48	20,18
P.vALOR	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

A las 32 horas de la inoculación el análisis de varianza reportó significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°13), la prueba de Tukey (Tabla N°6) demostró que el efecto de los tratamientos presentó valores similares, por esta razón se observaron varios tratamientos ocupando hasta tres rangos de significación; el efecto del tratamiento con fungicida “Ciprodinil + Fludioxonil” (T14), como en los casos anteriores presentó el menor valor de crecimiento (0,71 mm/d), el uso de aceite de canela fue más eficiente en concentraciones de (0.9 ml x L⁻¹) y (1.2 ml x L⁻¹) con valores de 0,98 y 1,03 mm/d, el tratamiento (T13) sin aplicación de aceite de canela registró la mayor velocidad de crecimiento (1,63 mm/d), seguido del tratamiento con dosis de (0.2 ml x L⁻¹), el cual evidenció un valor de 1,61 mm/d.

5.2.2 Velocidad de crecimiento del tubo germinativo (VCTG), para *Botrytis cinerea* Pers. Sin Purificar.

Respecto a la velocidad de crecimiento con *Botrytis cinerea* Pers. sin purificación, el análisis de varianza, reportó significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°14) al realizar la prueba de Tukey (Tabla N°7), evidenció 7 rango de significación; en el primer rango se ubicaron los tratamientos T14 (Ciprodinil + Fludioxonil), T6 (0.7 ml x L⁻¹) y T4 (0.5 ml x L⁻¹) con valores de 0,71, 0,85 y 0,96 mm/d respectivamente; estos resultados demostraron, que el mejor tratamiento con aceite de canela es la dosis de 0.7 ml x L⁻¹, en el último rango se ubicaron varios tratamientos entre ellos el T13 (Sin aplicación de aceite) y T11 (1.3 ml x L⁻¹) con los mayores valores de velocidad de crecimiento (1,61 y 1,72 mm/d), los cuales demostraron poco o ningún efecto del aceite de canela sobre *Botrytis cinerea* Pers.

A las 28 horas, el análisis de varianza registró significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo N°15), la prueba de Tukey (Tabla N°7) puso de manifiesto cuatro rangos de significación con tendencias similares a los registrados a las 24 horas, el tratamiento que presento el menor valor de crecimiento del tubo germinativo (0,71mm/d) es el tratamiento testigo con fungicida. Las diferentes dosis de aceite de canela ejercen un efecto limitado con valores que oscilan entre 1,17 y 1,66 mm/d; de ellos el mejor tratamiento es el T4 (0.5 ml x L⁻¹) que se ubicó en el segundo rango. El tratamiento sin ningún efecto sobre el crecimiento del tubo germinativo resultó el T13 (sin aplicación de aceite de canela) con el mayor valor (1,59 mm/d).

A las 32 horas el análisis de varianza registró significación estadística al 1% para los tratamientos (Anexo 16), según la prueba de Tukey (Tabla 7) el efecto de los tratamientos fue más evidente, ya que se registraron tres rangos de significación claramente definidas, en el primer rango se registró al T14 con el fungicida “Ciprodinil + Fludioxonil” con un valor de 0,71 mm/d. En el segundo rango se encontraron 8 tratamientos con valores entre 1,12 y 1,30 mm/d, en este caso los tratamientos con limitado efecto sobre el crecimiento del tubo germinativo fueron el T9 (1.0 ml x L⁻¹) y T10 (1.2 ml x L⁻¹) con valores de 1,54 y 1,51 mm/d respectivamente.

Tabla 7: *In vitro*: Velocidad de crecimiento del tubo germinativo (VCTG) *Botrytis cinerea* Pers. Sin Purificación.

Tratamientos	# Tubo	# Tubo	# Tubo
	germinativo 24h	germinativo 28h	germinativo 32h
T1	1,22 C D E F	1,30 B C	1,24 B C
T2	1,30 D E F G	1,31 B C	1,26 B C
T3	1,17 C D E	1,31 B C	1,25 B C
T4	0,96 A B C	1,17 B	1,12 B
T5	1,05 B C D	1,18 B	1,13 B
T6	0,85 A B	1,41 B C D	1,35 B C
T7	1,46 E F G H	1,38 B C D	1,38 B C
T8	1,49 F G H	1,39 B C D	1,38 B C
T9	1,50 F G H	1,27 B	1,54 C
T10	1,59 G H	1,45 B C D	1,51 C
T11	1,72 H	1,66 D	1,30 B C
T12	1,48 F G H	1,45 B C D	1,46 C
T13	1,61 H	1,59 C D	1,48 C
T14	0,71 A	0,71 A	0,71 A
E.E	0,01	0,02	0,02
C.V	8,69	9,54	9,70
P.vALOR	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

5.3. Citohistoquímica *In vitro*.

Los resultados del test *In vitro* de *Botrytis cinerea* Pers. sometidos a purificación se analizaron organográficamente, identificando los potenciales sitios de acción, afectados por los ingredientes activos “benzaldehído y cuminaldehído” del aceite de canela CINAMON[®]. Al respecto es importante señalar que los tratamientos de 0.2 ml x L⁻¹ hasta 0.8 ml x L⁻¹, no evidenciaron ningún cambio en la estructura del tubo germinativo. Los cambios se observaron a partir de la dosis 0.9 ml x L⁻¹ hasta 1.4 ml x L⁻¹, cuyos resultados son analizados a continuación.

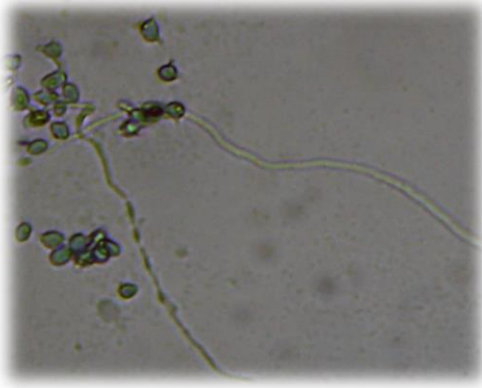


Fig. 1. Efectos de la dosis 0.9 ml x L⁻¹ en el tubo

Con las dosis 0.9 ml x L⁻¹ se observó calcinación, desprendimiento del tubo germinativo, así como efectos relacionados con mutaciones (Enrollamiento del tubo), como se observa en la Figura 1, aspectos que también son señalados por Black Solis, et al, (2017), Al realizar trabajos investigativos sobre la Caracterización química, variabilidad composicional y modelamiento matemático del efecto de aceites esenciales en *Alternaria alternata*.

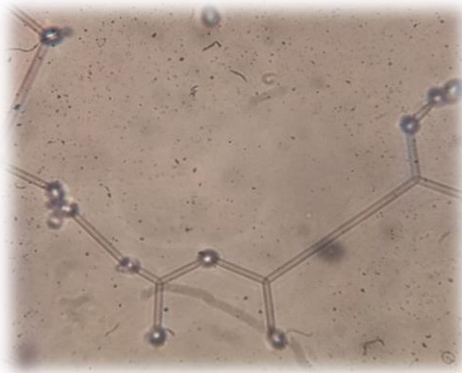


Fig. 2. Efectos de la dosis 1.4 ml x L⁻¹ en el tubo germinativo. Fase A

En la figura 2 (Fase A) se observa el efecto producido por la acción de la dosis 1.4 ml x L⁻¹, la cual provoca la unión de lípidos y polisacáridos, reacciones que también son reportadas por Gómez Alvarez, (2012) en trabajos realizados con el Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa. Quien señala que esta reacción induce la reducción de la Cutinasa considerada como el mecanismo de defensa en las plantas.

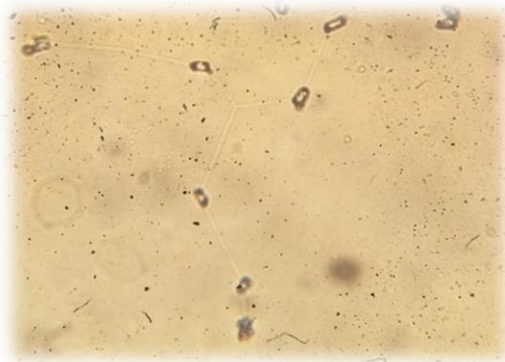


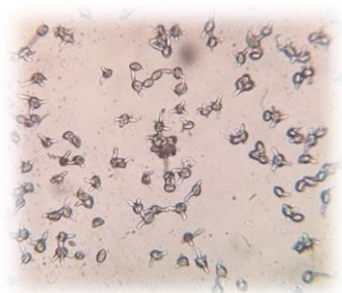
Fig. 2. Efectos de la dosis 1.4 ml x L⁻¹ en el tubo germinativo. Fase B

Con las dosis 1.4 ml x L⁻¹ los efectos de los ingredientes activos del CINAMON[®] son letales, pues se observa claramente la inactividad del microorganismo. Por la destrucción de la pared celular como se observa en la figura 2 (Fase B). Resultados similares se registró en la investigación realizada por Barrera y García, (2018) Quien además señala el aceite de *Cinnamomum zeylanicum*, exhibió una inhibición del crecimiento micelial dependió de las diversas dosis incrementadas.

5.3.4. IN VIVO.

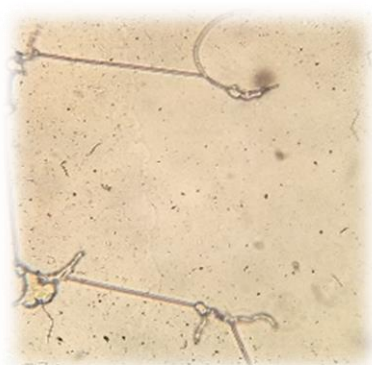
Determinación de modos de acción por medio de cito histoquímica.

Los resultados del test *in vivo*, igualmente se analizaron organográficamente los potenciales sitios de acción, y su efecto por los ingredientes activos del aceite de canela CINAMON[®]. En este caso los efectos se evidenciaron a partir de la dosis 1.0 ml x L⁻¹ hasta 1.4 ml x L⁻¹, cuyos resultados se describen a continuación.



En la figura 3 se observa la hidratación de las estructuras de propagación como son los conidios; Proceso que permiten establecer interacciones hidrofóbicas que en una segunda fase coadyuvan a su germinación, Como lo manifiesta Gómez Alvarez, (2012)

Fig. 3. Botrytis cinerea Pers. hidratación de conidios. (Lagos, 2018)



La segunda fase (**Fig. 4**) se observó la germinación del conidio y se forma una matriz compuesta de lípidos, polisacáridos y melanina, materiales que permiten a que el hongo pueda adherirse a la superficie del hospedero, como lo señala Gómez Alvarez, (2012)

Fig. 4. Botrytis cinerea Pers. matriz compuesta. (Lagos 2018)



Fig. 5. Botrytis cinerea Pers. (Lagos, 2018)

En estas circunstancias *Botrytis cinerea* Pers. es capaz de producir sustancias que tienden a descomponer el material vegetal para facilitar la penetración gracias a la acción de la Cutinasa, enzima que destruye la cutina, lo cual es la primera barrera de protección que dispone la planta, otras enzimas que actuando son la pectinasa y las lipasas en la pared celular, como lo describe Gómez Alvarez, (2012)

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFIA Y ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

La germinación del inóculo más bajo se registró con los tratamientos con aceite de canela en dosis de 1.3 y 1.4 mL x L⁻¹ con valores de 18,5 y 17,08 % de conidios germinadas en su orden, con dosis inferior entre 0,2 y 0,9 ml x L⁻¹, el porcentaje de conidios fueron los más altos entre 30,16 y 33,08 %,,. En el transcurso de las evaluaciones que ocurrieron cada dos horas, se observó que el porcentaje de germinación varió, a las 20 horas luego de la inoculación con dosis de 1.4 mL x L⁻¹, el valor fue de 13,25; en tanto que con dosis bajas el porcentaje de germinación de los conidios llegó sobre el 90%. Estos resultados demostraron que *Botrytis cinerea* Pers. Purificado es susceptible a la solución de canela en determinadas dosis. La germinación del inóculo de *Botrytis cinerea* Pers, sin purificación siguió tendencias similares; el tratamiento con aceite de canela en dosis de 1.4 ml x L⁻¹ fue la que experimentó menor porcentaje de germinación de los conidios con 44,75%, con dosis de 0.2 ml x L⁻¹, registraron valores iguales al 54,00. A las 20 horas de la inoculación los valores de inhibición en la germinación de conidios fueron de 43,5% y 78,33 % respectivamente.

La velocidad de crecimiento del tubo germinativo del hongo *Botrytis cinerea* Pers., purificado, se efectuó 24 horas luego de la inoculación, comprobándose que el aceite de canela actuó como el mejor tratamiento con dosis de 1.4 ml x L⁻¹ con un crecimiento igual a 0,96 mm/d; a las 32 horas con este mismo tratamiento la velocidad de germinación fue de 0.71 mm/d. Al analizar la velocidad de crecimiento del tubo germinativo del hongo *Botrytis cinerea* Pers., sin purificar se evidenció tendencias similares. En este caso los tratamientos con limitado efecto sobre el crecimiento del tubo germinativo fueron el T9 (1.0 ml x L⁻¹) y T10 (1.2 ml x L⁻¹) con valores de 1,54 y 1,51 mm/d respectivamente.

Los resultados del test *In vitro* de *Botrytis cinerea* Pers., sometidos a purificación fueron analizados organográficamente, identificando que el aceite de canela (CINAMON), en dosis de 0.2 ml x L⁻¹ hasta 0.8 ml x L⁻¹, no evidenciaron ningún

cambio en la estructura del tubo germinativo. Los cambios se observaron a partir de la dosis $0.9 \text{ ml} \times \text{L}^{-1}$ hasta $1.4 \text{ ml} \times \text{L}^{-1}$, se observó calcinación, desprendimiento del tubo germinativo, así como efectos que pueden estar relacionados con mutaciones (Enrollamiento del tubo), además de la reducción de la Cutinasa considerada como el mecanismo de defensa en las plantas, destrucción de la pared celular y consecuentemente reducción de la actividad microbiana. *In vivo* los resultados evidenciaron tendencias similares a partir de la dosis $1.0 \text{ ml} \times \text{L}^{-1}$ hasta $1.4 \text{ ml} \times \text{L}^{-1}$.

En todas las variables evaluadas el testigo químico con el fungicida “Ciprodinil + Fludioxonil”, presentó los mejores resultados, a diferencia del testigo “sin aceite de canela” que registró los resultados significativamente más negativos.

6.2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aizaga, S. J. (2017). *Efecto antifúngico del Aceite Esencial de Canela (Cinnamomum zeylanicum) al 25%,50%,75% y 100% sobre Candida albicans ATCC® 10231™*. Quito.

Andrade, L. A. T., Orozco, M. S. S., Correa, C. R. B., y Huertas, C. D. (2014). Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa. *Acta Agronomica*, 64(1), 93–99. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n1.35773>

Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M., y Aquino-Martínez, J. (2017). In vitro inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp .) leaves. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35, 170–185. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1611-1>

Arango Bedoya, O., Hurtado Benavides, A. M., Pantoja Daza, D., y Santacruz Chazatar, L. (2014). Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia organoides* H.B.K sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. *Acta Agronomica*, 64(2). <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.42964>

- Barrera, L., y García, L. (2018). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *UDO Agrícola*, 8(1995), 33–41.
- Bautista Silva, J. P., Barbosa Barbosa, H. de J., 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(2), 13. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55826>
- BiocontrolScience. (2017). ACARICIDA BOTANICO CONCENTRACION Metabolitos Botano Acaricidas de Canela (MBAc) 800 gramos / L.
- Black Solis, J., Ventura Aguilar, R. I., Barrera Necha, L. L., y Bautista Baños, S. (2017). Caracterización química, variabilidad composicional y modelamiento matemático del efecto de aceites esenciales en *Alternaria alternata*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(2), 204–226. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1612-5>
- Bravo, N., Hernández López, M., Guillén Sánchez, J., Bautista Baños, S., y Guillén Sánchez, D. (2018). Evaluation of biodegradable films for postharvest control of fungi in papaya. *Cultivos Tropicales*, 39(1), 52–60. Retrieved from <http://ediciones.inca.edu.cu>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., y Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Cañedo, V., y Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Cip. <https://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org
- Díaz, A., Duarte, D. ;, y Chaparro, P. (2014). Evaluación de la actividad fungistática del extracto de la cáscara del mangostino (*Garcinia mangostana* L.) en *Botrytis cinerea* para la biopreservación de la coliflor. *Alimentos Hoy*, 23(33), 59–80.

- Echegoyen, Y., y Nerín, C. (2015). Performance of an active paper based on cinnamon essential oil in mushrooms quality. *Food Chemistry*, 170(August), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.032>
- Espinoza, I., Rene, M. (2016). Efecto comparativo de aceite esencial y extracto acuoso de hojas de *Schinus molle* L. “molle” sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*. In *Facultad de ciencias biológicas* (p. 750).
- Gatto, M., Ippolito, A., Sergio, L., y Di Venere, D. (2016). Extracts from wild edible herbs for controlling postharvest rots of fruit and vegetables. *Acta Horticulturae*, 1144, 349–354. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.51>
- Gómez Alvarez, T. (2012). *BIOCONTROL DE Botrytis cinerea A PARTIR DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE FRESA*. Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán.
- González, J., Leon, J., Molina, V., y Vera, M. (2018). Desarrollo De Sistemia Al Hongo Botritis Cinerea En El Cultivo De Rosas (*Rosa Sp*) Mediante La Aplicación De Cuatro Niveles De Potasio En La Zona De Cayambe Provincia De Pichincha. *AGRO-UTB*, 3–10.
- Heard, S., Brown, N. A., y Hammond-Kosack, K. (2015). An interspecies comparative analysis of the predicted secretomes of the necrotrophic plant pathogens *sclerotinia sclerotiorum* and *botrytis Cinerea*. *PLoS ONE*, 10(6), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130534>
- Iza, C., y Lincango, L. (2018). Pruebas de sensibilidad de tres fungicidas monogénicos para el moho gris (*Botrytis sp.*) en el cultivo de rosa (*Rosa sp.*) Trabajo. Ecuador.
- Jiménez, E. V, y Mosquera, O. M. (2014). Actividad antifúngica In vitro de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* (Moho gris). *Salud Soc Uptc. Universidad Tecnológica de Pereira (Pereira – Colombia).*, 1, 16–21.

- López, L., Castaño, H., y Mejia, C. (2013). Efecto Antimicrobiano Del Aceite Esencial. *Actualidades Biológicas*, 35(98), 77–83.
- Luengo, P. (2004). Los aceites esenciales. *ÁMBITO FARMACÉUTICO Fitoterapia*, 23(7), 88–91.
- Maule, M. J. (2005). Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. *Proteome*, 14, 56–65.
- Mendoza, R. (2017). *EFFECTO BIOFUNGICIDA DE ACEITES ESENCIALES EN EL CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA (MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS) EN EL CULTIVO DE BANANO*. Machala.
- Mohammadi, A., Hashemi, M., y 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. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1871-7>
- Navarro, L. (2013). Practicas de biotecnología vegetal.
- Ochoa Fuentes, Y. M., Cerna Chávez, E., Landeros Flores, J. L., Hernández Camacho, S., y Delgado Ortiz, J. C. (2012). Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de fusarium spp. *Phyton*, 81(01), 69–73.
- Reyes, F., Palou, E., y López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 68–78.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K. C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmais, B., ... Tudzynski, B. (2015). The VELVET Complex in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on Differentiation, Secondary Metabolism, and Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(6), 659–674.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0411-R>

- Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo Argentino Para La Información y El Desarrollo de La Biotecnología.*, 2, 5,8.
- Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramírez, L. A., González-Aguilar, G. A., Olivas, I., y Ayala-Zavala, J. F. (2013). Protección antifúngica y enriquecimiento antioxidante de fresa con aceite esencial de hoja de canela. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 217–224.
- Syngenta. (2017). Ficha técnica Switch.
- Valenzuela, N. L., Marcelo, F., Viveros, L., Javier, G., Rodríguez, A., y Petra, A. H. (2016). Essential oil of *Cinnamomum zeylanicum*: control alternative for *Penicillium expansum* on pear in postharvest. *Revista Mexican de Ciencias Agrícolas*, 7, 1017–1028.
- Van Kan, J. A. L., Shaw, M. W., y Grant-Downton, R. T. (2014). Botrytis species: Relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Molecular Plant Pathology*, 15(9), 957–961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12148>
- Vasquez, A. (2017). *Evaluación de embolsado de flor en estado de garbanzo a cinco variedades de rosa (Rosa spp) en la finca santana, en el municipio de Facatativa, Cundinamarca*. Universidad de Cundinamarca F.C.Agr.
- Wenyong, S., Yu, Z., Weichao, R., y Changjun, C. (2015). Physiological and biochemical characteristics of laboratory induced mutants of *Botrytis cinerea* with resistance to fluazinam. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 117, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.10.003>
- Xing, F., Hua, H., Selvaraj, J. N., Yuan, Y., Zhao, Y., Zhou, L., y Liu, Y. (2014). Degradation of fumonisin B1 by cinnamon essential oil. *Food Control*, 38(1), 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.045>

6.3. ANEXOS

6.3.1. Análisis de varianza *B. cinerea* Pers Purificado.

Anexo. 1. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. purificado. 08H00

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	2,83	3	0,94	0,42 N.S.
Tratamientos	6716,92	13	516,69	230,04 **
Error Exp.	78,60	39	2,25	
Total	6807,34	55		
C.V.	6,06			
N.S.	No Significativo			
**	Significativo al 1%			

Anexo. 2. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. purificado. 10H00

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	7,43	3	2,48	1,84 N.S.
Tratamientos	7205,70	13	554,28	411,76 **
Error Exp.	52,50	39	1,35	
Total	7265,64	55		
C.V.	4,19			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

**Anexo. 3. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. purificado.
12H00**

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	12,38	3	4,13	1,89 N.S.
Tratamientos	27791,31	13	2137,79	981,68 **
Error Exp.	84,93	39	2,18	
Total	27888,61	55		
C.V.	3,99			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

**Anexo. 4. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. purificado.
14H00**

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	36,37	3	12,12	7,36 **
Tratamientos	34099,61	13	2623,05	1592,98 **
Error Exp.	64,22	39	1,65	
Total	34200,20	55		
C.V.	3,16			
**	Significativo al 1%			

**Anexo. 5. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. purificado.
16H00**

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	51,81	3	17,27	4,26 *
Tratamientos	55989,15	13	4306,86	1062,08 **
Error Exp.	158,15	39	4,06	
Total	56199,11	55		
C.V.	4,09			
*	Significativo al 5%			
**	Significativo al 1%			

6.3.2. Análisis de varianza *B. cinerea* Pers sin purificar.

Anexo. 6. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificar. 08H00

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	1,06	3	0,35	0,84 N.S.
Tratamientos	47732,36	13	1,72	8689,75 **
Error Exp.	16,48	39	0,42	
Total	47749,91	55		
C.V.	0,95			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

Anexo. 7. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificar. 10H00

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,43	3	0,14	0,45 N.S.
Tratamientos	43804,89	13	3369,61	10635,15 **
Error Exp.	12,36	39	0,32	
Total	43817,68	55		
C.V.	0,80			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

**Anexo.8. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificar.
12h00**

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,20	3	0,07	0,18 N.S.
Tratamientos	45408,92	13	3492,99	9543,48 **
Error Exp.	14,27	39	0,37	
Total	45423,39	55		
C.V.	0,79			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

**Anexo. 9. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificar.
14h00**

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,55	3	0,18	0,77 N.S.
Tratamientos	46508,89	13	3577,61	15109,33 **
Error Exp.	9,23	39	0,24	
Total	46518,67	55		
C.V.	0,63			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

**Anexo. 10. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificar.
16h00**

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,34	3	0,11	0,39 N.S.
Tratamientos	46513,27	13	3577,94	12290,19 **
Error Exp.	11,35	39	0,29	
Total	46524,96	55		
C.V.	0,70			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

6.3.3. Análisis de varianza crecimiento tubo germinativo *Botrytis cinerea* Pers. Purificado.

Anexo. 11. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. purificado. 08H00

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,02	3	0,01	0,51 N.S.
Tratamientos	3,09	13	0,024	16,64 **
Error Exp.	0,56	39	0,01	
Total	3,76	55		
C.V.	10,43			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

Anexo. 12. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. purificado 12h00

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,15	3	0,05	2,13 N.S.
Tratamientos	2,04	13	0,16	6,84 **
Error Exp.	0,89	39	0,02	
Total	3,08	55		
C.V.	13,48			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

Anexo. 13. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. purificado 16h00

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,26	3	0,09	1,21 N.S.
Tratamientos	5,45	13	0,42	5,83 **
Error Exp.	2,80	39	0,07	
Total	8,51	55		
C.V.	20,18			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

**6.3.4. Análisis de varianza crecimiento tubo germinativo *Botrytis cinerea* Pers.
Sin purificar.**

**Anexo. 14. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificar
08h00**

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,07	3	0,02	1,76 N.S.
Tratamientos	4,98	13	0,38	30,30 **
Error Exp.	0,49	39	0,01	
Total	5,54	55		
C.V.	8,69			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

**Anexo. 15. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificar
12h00**

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,03	3	0,01	0,64 N.S.
Tratamientos	2,62	13	0,20	12,59 **
Error Exp.	0,62	39	0,02	
Total	3,27	55		
C.V.	9,54			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

**Anexo. 16. Análisis de Varianza lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificar
16h00**

F de V.	S.C	gl	CM	F
Bloques	0,02	3	0,01	0,50 N.S.
Tratamientos	2,36	13	0,18	11,57 **
Error Exp.	0,61	39	0,02	
Total	3,00	55		
C.V.	9,70			
N.S.	No significativo			
**	Significativo al 1%			

6.3.5. Datos de campo, lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Purificado.

Anexo. 17. Lecturas a las 08H00

08H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	30	29,33	30,66	30,66
T2	31,33	32,66	32,66	32,66
T3	32,33	32,33	33,33	34,33
T4	31,66	31,66	31,66	31,66
T5	32,33	32,33	33,33	34,33
T6	32,33	32,33	33,33	34,33
T7	32,33	32,33	33,33	34,33
T8	32,33	32,33	33,33	34,33
T9	27,33	24	25	24,33
T10	25,33	21,33	23	22,33
T11	21,33	16	18,33	18,33
T12	17,33	22,33	14,33	14,33
T13	2	2,33	3	3,66
T14	0	0	0	0

Anexo. 18. Lecturas a las 10H00

10H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	35,66	35,66	36,66	37,33
T2	37,66	37,33	37,33	37,66
T3	40	41	40	41,66
T4	39,33	38,33	40,33	40
T5	35	35,33	36,33	37
T6	30,66	31	31	31,33
T7	35	35,33	35,33	35
T8	32,33	32,33	33,33	34,33
T9	27,33	24	25	24,33
T10	25,33	21,33	23	22,33
T11	21,33	16	18,33	18,33
T12	17,33	13,33	14,33	14,33
T13	14,66	18,33	16,66	18,33
T14	0	0	0	0

Anexo. 19. Lecturas a las 12H00

12H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	41,66	44,33	42	46
T2	45	44,33	44	46
T3	47,66	48,33	46,33	50
T4	49	47,66	49	48
T5	40	42,33	45,33	45
T6	43,33	41	39	40,33
T7	35	35,33	35,33	35
T8	32,33	32,33	33,33	34,33
T9	27,33	24	25	24,33
T10	25,33	21,33	23	22,33
T11	21,33	16	18,33	18,33
T12	17,33	12,33	14,33	14,33
T13	100	100	100	100
T14	0	0	0	0

Anexo. 20. Lecturas a las 14H00

14H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	57,33	54,66	56	55,66
T2	54	53	53,33	54,66
T3	58	57,33	56,33	61,33
T4	61,33	58	57	57,66
T5	51	52	52,33	54,33
T6	54	50,33	49,33	48
T7	35,66	35,33	35,33	35
T8	27,33	24	25	24,33
T9	25,33	21,33	23	22,33
T10	25,33	21,33	23	22,33
T11	21,33	16	18,33	18,33
T12	15,66	12,33	14,33	14,33
T13	100	100	100	100
T14	0	0	0	0

Anexo. 21. Lecturas a las 16H00

16H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	95,33	94,33	92,66	88,33
T2	85,66	81	80,33	76,66
T3	69,33	67,33	68,66	74,33
T4	79	71	71	68,66
T5	73	72	72,33	74,33
T6	64	63,66	62,66	61,33
T7	35	35,33	35,33	35
T8	27,33	24	25	24,33
T9	25,33	21,33	23	22,33
T10	25,33	21,33	23	22,33
T11	21,33	16	18,33	18,33
T12	12	12,33	14,33	14,33
T13	100	100	100	100
T14	0	0	0	0

6.3.6. Datos de campo, lectura de *Botrytis cinerea* Pers. Sin purificación.

Anexo. 22. Lecturas a las 08H00

08H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	100	100	100	100
T2	100	100	100	100
T3	100	100	100	100
T4	96	96	96	96
T5	84,33	84,33	84,33	84,33
T6	80	80	80	80
T7	82,66	84	83	82,33
T8	73	72,66	72,66	76
T9	65	65	65	64,33
T10	58,33	58,33	58	58
T11	54	54	54	54
T12	44	44	44	47
T13	23,33	22,66	24	23,33
T14	0,33	0,33	0,33	0,33

Anexo. 23. Lecturas a las 10H00

10H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	100	100	100	100
T2	100	100	100	100
T3	100	100	100	100
T4	98	98	98	98
T5	91,66	93,33	93,66	93,66
T6	84,33	84,33	84,33	84,33
T7	74,66	74,66	74	73
T8	73,33	72,66	72,66	76
T9	65,33	65,33	65,33	65,33
T10	58,66	58,66	58,33	58,33
T11	57,33	57,33	57,33	57,66
T12	43,66	43,33	43,66	43,33
T13	40,66	41	41,33	41,33
T14	0,33	0,33	0,33	0,33

Anexo. 24. Lecturas a las 12H00

12H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	100	100	100	100
T2	100	100	100	100
T3	100	100	100	100
T4	100	100	100	100
T5	100	100	100	100
T6	91,66	93,33	93,66	93,66
T7	75,66	74,66	74	73
T8	73,33	72,66	72,66	76
T9	65,33	65,33	65,66	65,33
T10	58,66	58,66	58,33	58,33
T11	57,33	57,33	57,33	57,66
T12	43,66	43,33	43,66	43,33
T13	100	100	100	100
T14	0	0	0	0

Anexo. 25. Lecturas a las 14H00

14H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	100	100	100	100
T2	100	100	100	100
T3	100	100	100	100
T4	100	100	100	100
T5	100	100	100	100
T6	100	100	100	100
T7	75,66	74,66	74	74
T8	73,33	72,66	72,66	76
T9	65,33	65,33	65,66	65,33
T10	58,66	58,66	58,33	58,66
T11	57,33	57,33	57,33	57,66
T12	43,66	43,33	43,66	43,33
T13	100	100	100	100
T14	0	0	0	0

Anexo. 26. Lecturas a las 16H00

16H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	100	100	100	100
T2	100	100	100	100
T3	100	100	100	100
T4	100	100	100	100
T5	100	100	100	100
T6	100	100	100	100
T7	75,66	74,66	74	73
T8	73,33	72,66	72,66	76
T9	65,33	65,33	65,66	65,33
T10	58,66	58,66	58,33	58,66
T11	57,33	57,33	57,33	57,66
T12	43,66	43,33	43,66	43,33
T13	100	100	100	100
T14	0	0	0	0

6.3.7. Datos de campo, lecturas de velocidad de crecimiento del tubo germinativo. Purificación.

Anexo. 27. Lecturas a las 08H00

08H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	1,15	1,15	1,27	0,97
T2	1,09	1,06	0,99	1,01
T3	0,88	1,07	0,99	0,91
T4	1,41	1,41	1,10	1,58
T5	1,11	0,95	1,06	1,17
T6	0,97	1,02	1,12	0,99
T7	1,36	1,00	1,29	1,05
T8	0,98	1,12	1,14	0,97
T9	1,11	1,17	1,08	1,14
T10	1,28	1,28	1,27	1,15
T11	1,07	1,33	1,19	1,07
T12	1,11	1,15	1,26	1,10
T13	2,13	1,62	1,71	1,79
T14	0,71	0,71	0,71	0,71

Anexo. 28. Lecturas a las 12H00

12H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	1,19	1,25	1,47	1,11
T2	0,99	1,06	1,17	1,07
T3	1,48	1,03	1,23	1,34
T4	1,00	1,07	1,24	1,37
T5	1,26	1,17	1,14	1,14
T6	1,19	1,28	1,40	1,48
T7	1,11	1,07	1,24	1,05
T8	0,88	1,03	1,07	0,82
T9	0,90	0,93	0,92	0,80
T10	0,88	0,98	1,16	1,14
T11	1,10	1,11	1,03	1,09
T12	0,97	1,22	1,23	1,14
T13	1,10	1,99	1,73	1,23
T14	0,71	0,71	0,71	0,71

Anexo. 29. Lecturas a las 16H00

16H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	1,89	1,44	1,52	1,59
T2	2,58	1,87	1,63	1,18
T3	2,29	1,22	1,42	2,05
T4	1,53	1,45	1,56	1,70
T5	1,26	1,45	1,56	1,70
T6	1,13	1,10	1,78	1,35
T7	1,20	1,06	1,24	0,92
T8	0,94	1,02	1,03	0,93
T9	1,02	1,18	1,19	1,27
T10	0,94	0,96	1,22	0,99
T11	1,11	1,24	1,22	1,12
T12	1,22	1,15	1,55	1,10
T13	1,83	1,22	1,42	2,05
T14	0,71	0,71	0,71	0,71

6.3.8. Datos de campo, lecturas de velocidad de crecimiento tubo germinativo.

Sin purificación.

Anexo. 30. Lecturas a las 08H00

08H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	1,22	1,22	1,22	1,22
T2	1,24	1,32	1,32	1,32
T3	1,39	0,81	1,24	1,24
T4	1,17	0,89	0,89	0,89
T5	1,11	0,97	1,03	1,10
T6	1,01	0,77	0,80	0,80
T7	1,31	1,57	1,54	1,42
T8	1,49	1,50	1,56	1,39
T9	1,72	1,56	1,32	1,41
T10	1,54	1,52	1,77	1,51
T11	1,81	1,68	1,85	1,55
T12	1,47	1,54	1,47	1,43
T13	1,59	1,62	1,62	1,62
T14	0,71	0,71	0,71	0,71

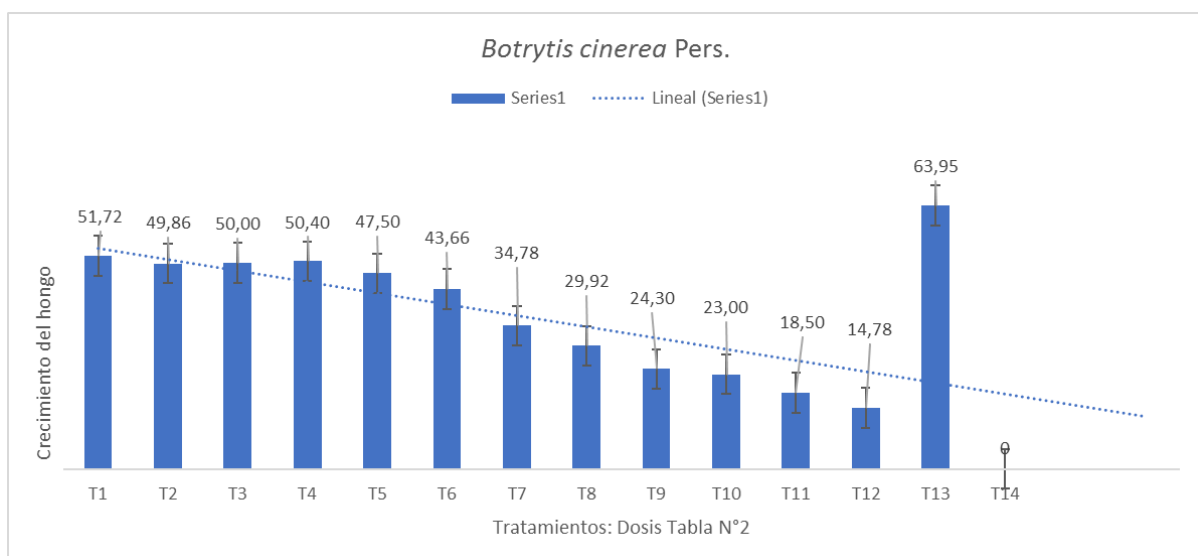
Anexo. 31. Lecturas a las 12H00

12H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	1,30	1,30	1,30	1,30
T2	1,23	1,34	1,34	1,34
T3	1,08	1,50	1,32	1,32
T4	1,00	1,07	1,37	1,22
T5	1,26	1,11	1,20	1,14
T6	1,20	1,28	1,71	1,46
T7	1,48	1,32	1,36	1,36
T8	1,50	1,24	1,33	1,50
T9	1,24	1,32	1,19	1,33
T10	1,33	1,64	1,49	1,32
T11	1,55	1,75	1,46	1,86
T12	1,60	1,30	1,54	1,36
T13	1,59	1,59	1,59	1,59
T14	0,71	0,71	0,71	0,71

Anexo. 32. Lecturas a las 16H00

16H00				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV
T1	1,24	1,24	1,24	1,24
T2	1,18	1,28	1,28	1,28
T3	1,04	1,43	1,26	1,26
T4	0,97	1,03	1,31	1,17
T5	1,20	1,06	1,15	1,10
T6	1,15	1,22	1,62	1,39
T7	1,44	1,46	1,25	1,36
T8	1,26	1,52	1,42	1,33
T9	1,48	1,53	1,44	1,71
T10	1,70	1,57	1,52	1,23
T11	1,22	1,17	1,28	1,53
T12	1,49	1,59	1,33	1,43
T13	1,52	1,48	1,48	1,45
T14	0,71	0,71	0,71	0,71

Anexo. 33. Porcentaje de crecimiento del hongo bajo el efecto del aceite de canela.



CAPÍTULO VII

PROPUESTA

7.1. TÍTULO

UTILIZACIÓN DE ACEITE DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) PARA EL MANEJO DE *Botrytis cinerea Pers* EN CULTIVOS COMERCIALES

7.2. DATOS INFORMATIVOS

La propuesta está enfocada en el uso de aceite de canela a partir de la dosis de 1.4 ml x L⁻¹ en los cultivos comerciales del Ecuador, con el asesoramiento de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato y los laboratorios Bionika.

7.3. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

Debido a las amenazas fitosanitarias que tienen los cultivos comerciales (Flores, hortalizas y frutos) por el hongo *Botrytis cinerea* el cual provoca que las flores no se abran, se optó por una alternativa de investigación diferente lo cual es el uso de aceite de canela con diversas dosis dando como mejor resultado la dosis de 1.4 ml x L⁻¹ tanto en *in vitro* como para *in vivo*, en lo consiguiente se deberá emplear en campo abierto o invernaderos partiendo desde la dosis 1.4 ml x L⁻¹ mediante pulverización; lo cual dio como efecto la calcinación del tubo germinativo del hongo y así se evitó su proliferación y consecuentemente aumentó en este caso la protección de rosas, dado su mejor estado sanitario.

7.4. JUSTIFICACIÓN

En los sistemas productivos de flores, hortalizas y frutos se están buscando nuevas estrategias de control biológico a través de diferentes tipos de microorganismos para reducir el riesgo de resistencia del patógeno, debido al mal uso de agroquímicos y su mal asesoramiento ya que el control de esta enfermedad depende principalmente de las aplicaciones frecuentes de fungicidas, la evolución de *Botrytis cinerea* ha creado

resistencia a diferentes clases de fungicidas, en consecuencia los productores están buscando nuevas alternativas de control a menor costo y a mayor rentabilidad, además buscando evitar la contaminación ambiental y de los alimentos en procura de la salud de los seres humanos..

7.5. OBJETIVOS

Aplicar aceite de canela a partir de dosis de $1.4 \text{ ml} \times \text{L}^{-1}$ para el manejo de *Botrytis cinerea* Pers en cultivos comerciales de flores, hortalizas y frutos.

7.6. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

La investigación “EFECTO DEL ACEITE DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) EN *Botrytis cinerea* Pers. *IN VITRO* e *IN VIVO*” demostró resultados positivos en el manejo de *Botrytis cinerea* Pers. en rosa, bajo la metodología utilizada es factible la aplicación de la tecnología desarrollada en flores, frutas y hortalizas. El aceite de canela CINAMON se comercializa frecuentemente y la tecnología de aplicación no es complejo.

7.7. FUNDAMENTACIÓN

La eficacia y especificidad de distintos aceites sobre el control de hongos fitopatógenos, es evidente, al respecto se enfatiza que el aceite de limón y canela inhiben el desarrollo de *Botrytis cinerea* Pers, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus parasiticus*, siendo de vital importancia potenciar el uso de aceites para desarrollar una agricultura limpia, ya que los mismos al ser usados no dejan residuos tóxicos.

7.8. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

- a) Producción del biofungicida
 - Colocar 3cc de alcohol industrial a temperatura de 25°C . en un litro de agua con 200 microlitros de tween 80 o jabón y 200 microlitros de 7 action, después agregar el aceite de canela, en dosis de $1.4 \text{ ml} \times \text{L}^{-1}$ en los cultivos.

- Para preparar una bomba de 20 litros se recomienda: 10 cc de alcohol industrial, 40 gotas de tween 80 y 40 gotas de 7action, después agregar 28 ml x L⁻¹, homogenizar bien la solución para su debida pulverización.
- Para uso comercial preparar la cantidad necesaria utilizando los valores correspondientes.
- Aplicar en los cultivos por pulverización con bomba manual.

7.9. ADMINISTRACIÓN

Se trabajará con floricultores, horticultores y fruticultores, juntamente con la Facultad de Ciencias Agropecuarias (Unidad de Vinculación con la comunidad) y la asesoría técnica de los laboratorios BIONIKA, BiocontrolScience.

7.10. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Se socializará La tecnología para su aplicación mediante charlas explicativas sobre los beneficios y el uso del producto del aceite de canela. Luego de un año se evaluará el nivel de aplicación de la tecnología mediante visitas a floricultores, horticultores y fruticultores.