

CIENTÍFICA

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

INGENIERÍA AGROFORESTAL

**“ELABORACIÓN DE UN BIOFUNGICIDA A PARTIR DE
EXTRACTOS VEGETALES PARA CONTROLAR *Botrytis cinerea*
EN UVA (*Vitis vinifera* L.)”**

Tesis para optar al Título Profesional de:

Ingeniera Agroforestal

Bach. ANDREA ROVELLO YAFAC

LIMA, PERÚ

2018

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar a este momento tan importante en mi vida profesional.

A mi madre que ha sabido formarme con buenos sentimientos y valores, y que me ha acompañado durante todo este trayecto para convertirme en una profesional.

A mi familia, por darme todo su amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a Dios por haber puesto en mi vida a las personas correctas y por darme las herramientas necesarias para poder desarrollar y concluir esta tesis.

Le doy gracias a mi madre Zaida que me ha acompañado en todas las etapas de mi vida y por darme todo su apoyo para seguir adelante.

A Vovo Silvia y Vovo Roberto que desde pequeña me han brindado todo su amor y entusiasmo, incluso en las etapas más difíciles.

A Tati y Basilia, por ser incondicionales, por siempre estar ahí para escucharme y darme una mano cuando más la necesitaba.

A mi asesora y gran maestra Gladys Buitrón que me brindó su tiempo y sus conocimientos necesarios para poder desarrollar la tesis e inspirarme siempre a seguir adelante.

Agradezco la confianza, apoyo y dedicación del profesor Raúl Anguiz, Javier Alvarado y Gladys Lino que me permitieron conocer más sobre los hongos y su manejo.

A Veronica, técnica del laboratorio de microbiología y Elvis del laboratorio de Ingeniería Agroforestal. Muchas gracias por facilitarme todos los materiales y equipos necesarios para desarrollar las pruebas.

Gracias a la Universidad Científica del Sur y a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por todas las facilidades que me otorgaron para la realización de esta tesis.

INDICE

LISTA DE TABLAS.....	4
LISTA DE FIGURAS	7
I. RESUMEN	8
II. ABSTRACT	8
III. INTRODUCCIÓN	9
IV. MARCO TEÓRICO	10
4.1. Generalidades de la uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	10
4.1.1 Clasificación taxonómica de la uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	11
4.1.2 Situación actual de la uva a nivel mundial	11
4.1.3 Importancia de la uva en el Perú	12
4.1.4 Producción nacional de uva	13
4.1.5 Exportaciones de uvas frescas	15
4.1.6 Sistemas de producción de vid a nivel nacional	16
4.2. Características generales de los hongos	18
4.2.1 Características de <i>Botrytis cinerea</i>	19
4.2.2 Daños en el cultivo de la uva por <i>Botrytis cinerea</i>	21
4.3. Generalidades del género <i>Thymus</i>	22
4.4. Importancia de los Aceites esenciales	23
4.4.1 Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	23
4.5. Metabolitos secundarios y su actividad antifúngica	24
4.6. Acción de los aceites esenciales en el control de los hongos.....	25
V. METODOLOGÍA Y MATERIALES	26
5.1 MATERIALES	26
5.2. METODOLOGÍA	26
5.2.1 Ubicación de estudio.....	26
5.2.2 Diseño estadístico.....	27
5.2.3 Ejecución del experimento	29
VI. RESULTADOS.....	31
6.1 Obtención del aceite esencial de tomillo.....	31

6.2 Aislamiento e identificación del patógeno	32
6.3 Resultado Estadístico	33
6.3.1 Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	33
6.2.2 Evaluación <i>in vivo</i>	39
VII. DISCUSIÓN	41
7.1 Proceso de extracción del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	41
7.2 Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i>	42
7.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del aceite esencial de tomillo	42
7.4 Actividad antifúngica <i>in vivo</i> del aceite esencial de tomillo	44
VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
8.1 Conclusiones	45
8.2 Recomendaciones	46
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
X. ANEXOS	57

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1: Composición nutricional de la uva	10
Tabla N° 2: Clasificación de las variedades de uva.....	11
Tabla N° 3: Contribución de la uva a la economía nacional	12
Tabla N° 4: Producción nacional de uva 2014 – 2016.....	13
Tabla N° 5: Producción de uva en las principales regiones.	13
Tabla N° 6: Precio en chacra de uva en las principales regiones de producción (2015 - 2016).....	14
Tabla N° 7: Cantidad cosechada e ingresos generados	17
Tabla N° 8: Clasificación taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i>	19
Tabla N° 9: Clasificación taxonómica de tomillo.....	22
Tabla N° 10: Materiales y equipos.....	26
Tabla N° 11: Nivel de severidad y porcentaje de infección de <i>Botrytis cinerea</i> en uva.	30
Tabla N° 12: Rendimiento del aceite esencial de tomillo.....	31
Tabla N° 13: Características organolépticas del aceite esencial de tomillo.....	31
Tabla N° 14: Condiciones de extracción del aceite esencial	32
Tabla N° 15: Resultados de la prueba Tukey	33
Tabla N° 16: Resultados del área de cultivo y la Inhibición del crecimiento micelial (MGI) de la prueba <i>in vitro</i>	35
Tabla N° 17: Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de tomillo sobre <i>Botrytis cinerea</i> en placas Petri	37
Tabla N° 18: Formulación del biofungicida.....	39
Tabla N° 19: Nivel de severidad y porcentaje de infección de <i>Botrytis cinerea</i> en uva.	39
Tabla N° 20: Resultados del índice de severidad de la prueba <i>in vivo</i>	40
Tabla N° 21: Costos del biofungicida y costo por aplicación en una hectárea de vid	41

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1: Producción y precio en chacra de uva (2015 - 2016).....	15
Figura N° 2: Exportaciones de uva (enero - marzo, 2011 - 2017)	16
Figura N° 3: Ciclo biológico de <i>Botrytis cinerea</i> en uva.....	21
Figura N° 4: Estructura química del Timol.....	24
Figura N° 5: Tratamientos de la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica del aceite esencial de tomillo en medio APD.	28
Figura N° 6: Tratamientos de la evaluación <i>in vivo</i> del biofungicida.....	28
Figura N° 7: Identificación macroscópica de <i>Botrytis cinerea</i>	32
Figura N° 8: Identificación microscópica de <i>Botrytis cinerea</i>	33
Figura N° 9: Gráfico de la concentración del aceite esencial de tomillo	34
Figura N° 10: Efecto de la concentración del aceite esencial de tomillo en el crecimiento del cultivo de <i>Botrytis cinerea</i>	35
Figura N° 11: Gráfico de inhibición del crecimiento micelial (MGI) vs Concentración del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.).	36

I. RESUMEN

La pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* es una de las enfermedades más limitantes en el cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) generando considerables pérdidas económicas y alta contaminación ambiental causada por la aplicación de plaguicidas sintéticos. En la actualidad, se destaca la utilización de medidas alternativas como la aplicación de aceites esenciales para controlar *Botrytis cinerea*.

El presente trabajo consistió en realizar la extracción del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como componente de un biofungicida capaz de disminuir la germinación de *Botrytis cinerea*. Se determinó la sensibilidad *in vitro* del fitopatógeno utilizando la técnica de dilución en agar papa dextrosa (APD), se calculó que la concentración de 500 ppm inhibió el 100% del crecimiento micelial. En la prueba *in vivo* se aplicó el biofungicida cuya formulación contenía el aceite esencial en una concentración de 500 ppm, el tensioactivo y agua destilada estéril y se concluyó que el biofungicida fue capaz de controlar a *Botrytis cinerea* hasta el tercer día de la evaluación.

Palabras claves: *Botrytis cinerea*, biofungicida, *Thymus vulgaris* L., aceite de tomillo

II. ABSTRACT

The gray rot caused by *Botrytis cinerea* is one of the most limiting diseases in the cultivation of vines (*Vitis vinifera*) generating considerable economic losses and high environmental pollution caused by the application of synthetic pesticides. At present, the use of alternative measures such as the application of essential oils to control *Botrytis cinerea*.

In the present research Thyme essential oil (*Thymus vulgaris* L.) was evaluated as a component of a biofungicide capable of decreasing the germination of *Botrytis cinerea*. The *in vitro* sensitivity of the phytopathogen was determined using the dilution technique in potato dextrose agar (APD), it was calculated that the concentration of 500 ppm inhibited 100% of the mycelial growth. In the *in vivo* test, the biofungicide whose formulation contained the essential oil in a concentration of 500 ppm, the surfactant and sterile distilled water was applied and it was concluded that the biofungicide was able to control *Botrytis cinerea* until the third day of the evaluation.

Keywords: *Botrytis cinerea*, biofungicide, *Thymus vulgaris* L., thyme oil.

III. INTRODUCCIÓN

La uva pertenece al género *Vitis*, cuyos miembros se caracterizan por ser arbustos trepadores que se fijan mediante zarcillos. Este género comprende más de 60 especies, de las cuales las más importantes son: *Vitis berlandieri*, *V. rupestris*, *V. riparia*, *V. labrusca* y *V. vinifera*. Las cuatro primeras se conocen como vides americanas y se usan en hibridaciones para producir patrones. La *V. vinifera* se conoce como la europea y agrupa la mayoría de las variedades cultivadas (Morales, 1995).

En el caso de Perú, las exportaciones de uvas (*Vitis vinifera* L.) han venido creciendo durante los últimos años, entre 2011 y 2017 se ha registrado una tasa de crecimiento promedio anual de 17,2% (COMEX, 2017).

Sin embargo, una de las dificultades para desarrollar el cultivo de la uva, son las plagas y enfermedades que pueden llegar a disminuir su calidad y productividad. El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* o también conocido como podredumbre gris, es capaz de afectar tanto a la planta en campo como a los frutos cosechados. Este afecta cualquier tejido de la planta y se presenta inicialmente como una mancha marrón o amarillenta y después de pocos días se cubre de un moho gris (Umaña, 1996).

El control de este patógeno sigue siendo un reto y todavía se basa en múltiples aplicaciones de fungicidas que a su vez conducen al desarrollo de resistencia del patógeno, dejan residuos químicos en la fruta y ocasionan problemas ambientales y de salud pública (Adebayo, Dang, Belanger y Khanizadeh, 2013).

Para reducir estos problemas y con el creciente interés de querer cumplir con las normas de inocuidad alimentaria, existe una tendencia en todo el mundo para explorar nuevas alternativas a los fungicidas sintéticos. Entre los métodos alternativos para el control de *Botrytis cinerea*, está la utilización de aceites esenciales que han sido útiles como fungicidas de amplio espectro (Regnault-Roger, Philogéne, Vicent, 2004).

En función a lo expuesto, la presente tesis busca reducir el uso de agroquímicos que contaminan el medio ambiente y emplear un biofungicida que no genere resistencia por parte del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

El objetivo del presente trabajo de investigación consiste en la elaboración de un biofungicida a partir de extractos vegetales para controlar *Botrytis cinerea* en uva (*Vitis vinifera* L.).

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Generalidades de la uva (*Vitis vinifera* L.)

Vitis vinifera L. es una planta perenne de la familia de las Vitáceas, su fruto es una baya redonda y pequeña que crece en forma de racimos, empezando a producir a partir del tercer año. Es originaria del Cáucaso y Asia occidental y los españoles la introdujeron en América del Norte, donde se extendió por todo el continente.

Requiere de un clima tropical y subtropical, que posean temperaturas entre los 7°C y 24°C con una humedad relativa de 70% a 80%, desarrollándose exitosamente en suelos franco-arcillosos. Se reproduce por vía sexual (semillas) o asexual (estacas, acodos e injertos).

Hoy en día existen unas 3000 variedades, que se pueden clasificar en dos grandes grupos: Uvas de mesa que se consumen frescas o como pasas y uvas viníferas que generalmente contienen menos azúcares que las de mesa.

Por otra parte, su fruto posee propiedades beneficiosas para la salud, como antocianos, flavonoides y taninos, también responsables de su color, aroma y textura (Bertagno, 2011). En la Tabla N°1 se presenta la composición nutricional de la uva por 100 gramos de porción comestible correspondiente al Manual técnico del cultivo de uva de la Secretaría Técnica Cadena Frutícola Huila (2006).

Tabla N° 1: Composición nutricional de la uva por 100 gramos de porción comestible.

Nutrientes	Cantidad	Unidad
Agua	82,4	g
Energía	69	Kcal
Hidratos de carbono	16,1	g
Fibra	0,9	g
Proteínas	0,6	g
Calcio	17	mg
Hierro	0,4	mg
Magnesio	10	mg
Sodio	2	mg
Potasio	250	mg
Fósforo	22	mg

Fuente: Secretaría Técnica Cadena Frutícola Huila (2006).

4.1.1 Clasificación taxonómica de la uva (*Vitis vinifera* L.)

La vid es una planta Angiosperma, de la clase de las Dicotiledóneas, subclase con flores más simples (Choripetalae), pero en el grupo dotado de cáliz y corola (Dyalypetalae). Pertenece al orden Rhamnales, que son plantas leñosas de vida larga. Por ello, tiene un largo periodo juvenil (3-5 años), durante el cual no produce frutos (Bertagno, 2011).

En la Tabla N° 2 se demuestra la clasificación taxonómica de la uva y la procedencia de cada una de sus especies.

Tabla N° 2: Clasificación de las variedades de uva más cultivadas en la actualidad.

Taxonomía	Especies	Procedencias
División: Espermátófitas Subdivisión: Angiospermas Clase: Dicotiledóneas Orden: Rhamnales Familia: Vitaceae Género: <i>Vitis</i>		
Subgénero: Euvitis (30 especies)	<i>Vitis vinifera</i> L. <i>V. silvestris</i> <i>V. riparia</i> <i>V. labrusca</i> <i>V. rupestris</i> <i>V. berladieri</i>	Europeo-asiática Europeo-asiática Americana Americana Americana Americana
Subgénero: Muscadine (3 especies)	<i>Vitis rotundifolia</i>	Americana-México

Fuente: Salazar & Melgarejo (2005).

4.1.2 Situación actual de la uva a nivel mundial

El consumo de uvas frescas en el 2013 fue de 24,1 millones de toneladas, siendo China el mayor consumidor con un volumen de consumo superior a 5 millones de toneladas seguido de India y Estados Unidos, con un consumo de 2,09 millones y 1,21 millones de toneladas, respectivamente. En Latino América, Brasil es un consumidor importante, con un consumo alrededor de 832 mil toneladas. Se estima que las variedades de uvas sin semillas serán las más demandadas por los consumidores tradicionales, como Europa y Estados Unidos, sin embargo, los mercados asiáticos seguirán su preferencia por las uvas con semillas como la Red Globe (GDB Network, 2015).

Por otro lado, la producción mundial de uvas se ha incrementado durante la última década, llegando a producir 74,5 millones de toneladas en el 2014 (MINAGRI, 2017). Ello gracias a los mayores rendimientos de la producción, las condiciones climáticas particularmente favorables en algunos países y las mejoras continuas en las técnicas para el cultivo de uvas (GDB Network, 2015).

Con respecto al cultivo de uvas orgánicas, estas representaron 315,9 mil hectáreas a nivel mundial en el 2014. Siendo Europa el principal productor con 266,2 mil ha, Asia 18 mil ha, Norte América 16 mil ha, Latino América 11,5 mil ha y África con 1,3 mil ha. Los países con la superficie más grande de uvas orgánicas son España, Italia y Francia, cada uno con más de 60 mil ha de uvas orgánicas (IFOAM, 2016).

4.1.3 Importancia de la uva en el Perú

El cultivo de uva en el país constituye una de las actividades frutícolas de mayor importancia por su extensión y por su valor económico tanto para el mercado nacional e internacional.

En el 2016, la producción de uva representó el 5,50% del PBI del sector agrícola, constituyéndose en el quinto producto más importante de la agricultura nacional (Minagri, 2017). En la Tabla N° 3 se observa que en dicho año el aporte de la producción de uva al PBI nacional fue de 0,17% (BCRP, 2018).

Tabla N° 3: Contribución de la uva a la economía nacional

Año	Producción de uva (millones de toneladas)	Aporte de la uva al PBI agrícola	Aporte de la uva al PBI nacional
2015	598	4,85%	0,15%
2016	690	5,50%	0,17%

Fuente: BCRP (2018).

Por otro lado, las exportaciones de uva crecieron en la última década a una tasa anual de 30,6% en masa neta y 31,6% en valor FOB. En términos absolutos pasaron de 25,9 mil toneladas en el 2007 a 285,6 mil toneladas en el 2016; es decir, se multiplicaron por 10 (MINAGRI, 2017). Este crecimiento se debe a la expansión en los mercados de exportación más importantes, como China y la Unión Europea, por otro lado, las tendencias apuntan al crecimiento de la demanda de uvas sin semilla (Agrimundo, 2016).

En el Perú la uva se produce todo el año, ventaja que le permite abastecer la demanda a nivel mundial en el periodo de baja producción por parte de los

principales países importadores y consumidores de uva, en particular durante el periodo diciembre – marzo, época en la cual los principales mercados mundiales carecen de este producto (IFOAM, 2016).

4.1.4 Producción nacional de uva

La producción nacional de uva del año 2016 fue de 564,1 mil toneladas, superior en 15% en comparación al año anterior, esto se debe a la mayor producción obtenida en Piura, Arequipa y La Libertad (MINAGRI, 2016).

En la Tabla N° 4 se detalla la producción de la uva de 2014 a 2016 y su variación porcentual por cada año.

Tabla N° 4: Producción nacional de uva 2014 – 2016.

Producto	Producción (miles de toneladas)			Variación porcentual (%)	
	2014	2015	2016	2015/2014	2016/2015
Uvas	507,1	597,9	689,8	17,9	15,4

Fuente: MINAGRI (2016).

En la Tabla N° 5 se detalla la producción de uva en las principales zonas productoras de Perú y en la Tabla N° 6 se muestra el precio en chacra durante los años 2015 y 2016.

Tabla N° 5: Producción de uva en las principales regiones de producción (2015 - 2016).

Región	Producción 2015 (Miles de toneladas)	Producción 2016 (Miles de toneladas)
Ancash	3,1	2,9
Arequipa	12,7	25,3
Cajamarca	1,3	1,6
Ica	119,3	224,7
La Libertad	31,8	49,4
Lambayeque	0,8	21,4
Lima	75,7	72,8
Lima Metropolitana	0,5	0,4
Moquegua	5,2	6,6
Piura	30,1	278,4
Tacna	7,0	4,9

Fuente: MINAGRI (2015).

Tabla N° 6: Precio en chacra de uva en las principales regiones de producción (2015 - 2016).

Región	Precio en chacra 2015 (Nuevos Soles/Tonelada)	Precio en chacra 2016 (Nuevos Soles/Tonelada)
Ancash	2 019	2 079
Arequipa	3 500	3 192
Cajamarca	1 182	1 077
Ica	2 500	2 565
La Libertad	1 668	1 626
Lambayeque	-	2 981
Lima	-	1 438
Lima Metropolitana	-	1 713
Moquegua	2 500	2 041
Piura	3 000	2 575
San Martín	3 479	2 884
Tacna	-	2 250
Tumbes	-	2 000
Promedio nacional	2 738	2 406

Fuente: MINAGRI (2016).

En la Figura N° 1 se observa la variación de la producción (miles de toneladas) y el precio (Nuevos soles/kg) de uva del año 2015 y 2016.

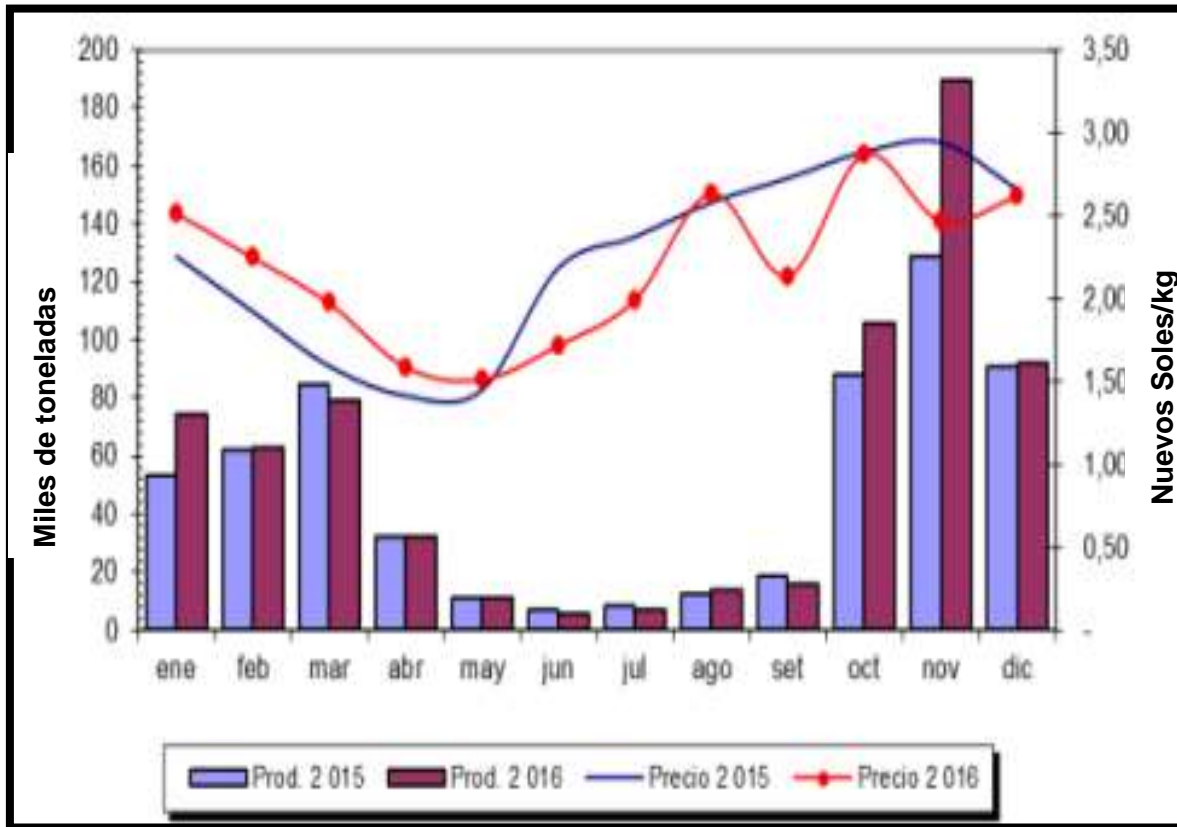


Figura N° 1: Producción y precio en chacra de uva (2015 - 2016).

Fuente: MINAGRI (2016).

4.1.5 Exportaciones de uvas frescas

En el 2016, el Perú logró posicionarse como sexto proveedor de uvas frescas a nivel global. Entre enero y marzo del 2016, los envíos de uvas totalizaron unos US\$ 242 millones, hacia el mes de marzo del 2016 los principales destinos de uvas fueron EE.UU., con una exportación de US\$ 90,4 millones, un 68,2% más que en el mismo periodo del año anterior, Hong Kong con una exportación de (US\$ 42,3 millones; +1,1%), Países Bajos (US\$ 27,2 millones; +38,7%) y China (US\$ 21,4 millones; -34,1%), los que juntos representaron el 75% del mercado.

Entre 2011 y 2017 se ha registrado una tasa de crecimiento promedio anual de 17,2%. En la Figura N° 2 se muestra la variación en millones de dólares de las exportaciones de uva de enero a marzo de los años 2011 a 2017 (COMEX, 2017).

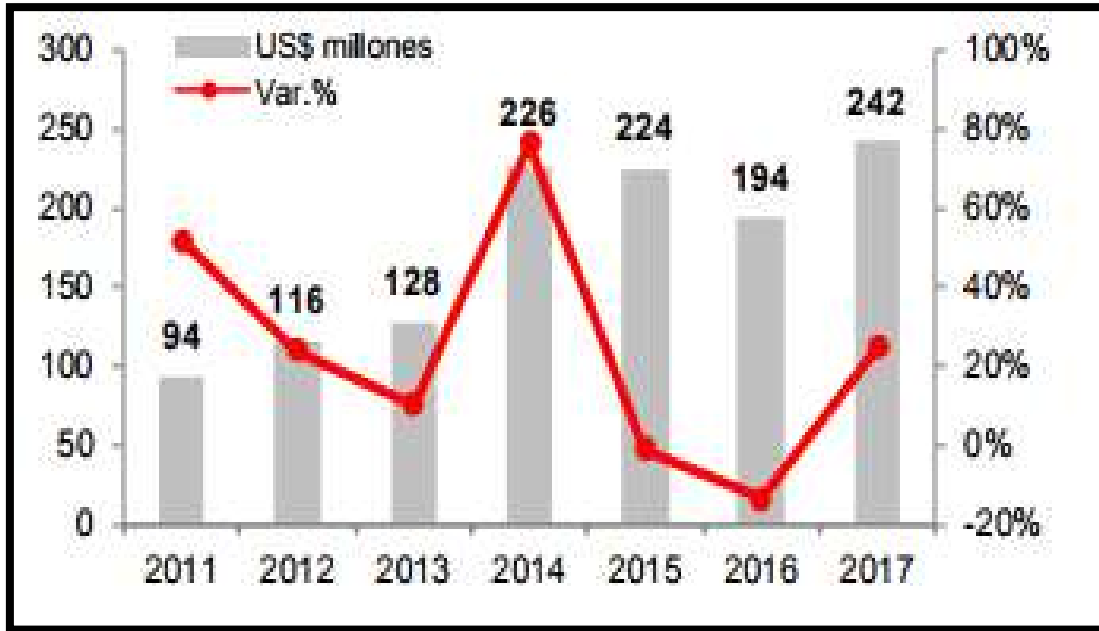


Figura N° 2: Exportaciones de uva (enero - marzo, 2011 - 2017)

Fuente: COMEX (2017).

La Red Globe es una de las variedades de mayor exportación, sin embargo, también se ha incrementado la exportación de las variedades Seedless, Sugaone, Crimson, Flame, entre otras (Servicios al Exportador, 2017).

4.1.6 Sistemas de producción de vid a nivel nacional

4.1.6.1 Sistema de producción en la pequeña agricultura

En la agricultura peruana predomina el minifundio, según un estudio del Centro Peruano de Estudios Sociales (CEPES, 2002), indicaba que el 92% de las unidades agropecuarias de la costa tenía menos de diez hectáreas. Para el caso de la vid, señalan la existencia de 22 mil familias productoras en las regiones de Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna, que manejan un total de 811 mil hectáreas. Esto significa que el promedio de tenencia es apenas de 0,36 hectáreas por familia.

Para la mayoría de los pequeños agricultores, el cultivo de vid sigue siendo un cultivo complementario, formando parte de sistemas de producción caracterizados por la diversificación. Esto resulta como una estrategia de supervivencia, frente a la incertidumbre y el riesgo que implica el trabajo en el sector agrario. A diferencia de las grandes plantaciones, los pequeños viñedos, en valles como Cháparra y Caravelí, son parte de agroecosistemas desarrollados durante siglos de aislamiento, por ejemplo, poseen mezclas de variedades como la “negra criolla” y

“moscatel” que están adaptadas a las condiciones locales y, además, constituyen un capital genético que es necesario aprovechar (Arata, 2015).

Es importante mencionar que el procesamiento de la uva ha permitido incrementar las ganancias monetarias de los productores. A su vez, actividades como la poda, la cosecha y las pisas son de alta demanda de mano de obra y permiten generar empleo temporal rural. Arata y Toro (2005) señalan que, para el caso de Caravelí, aproximadamente el 60% de sus ingresos son reinvertidos en adquisiciones de insumos diversos y pago de jornales agrícolas.

Un potencial que tienen los pequeños viticultores es el uso restringido de insumos químicos, que los podría favorecer para incorporarse en la industria vinculada a la producción orgánica (Arata, 2015).

4.1.6.2 Sistema de producción en la mediana agricultura

El desarrollo del cultivo de vid a mediana escala, ha sido desarrollado principalmente por productores asociados, que existen a nivel provincial y regional, principalmente en Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna. Estas asociaciones cumplen funciones de carácter gremial, organizan capacitaciones especializadas y eventos de intercambio, entre los que destacan los congresos nacionales del pisco, que se realizan anualmente (Arata, 2015).

Por ejemplo, la Asociación de Vitivinicultores de Moquegua (Avimo), está conformada por 30 agricultores provenientes de los distritos de Moquegua y Samegua, estos poseen 45 hectáreas destinadas a este cultivo. En el 2016, la Asociación exportó 60 toneladas de uva Red Globe a Bolivia, los productores recibieron S/4 por kilo, mientras que el precio que recibieron en el mercado mayorista de Lima fue de S/ 3.17 el kilo. En la Tabla N° 7 se muestra la superficie cosechada y el ingreso anual que obtuvo dicha Asociación en el 2016 (Gestión, 2016)

Tabla N° 7: Cantidad cosechada e ingresos generados por AVIMO

Nombre de la Asociación	Superficie Cosechada (ton)	Cantidad exportada (%)	Cantidad mercado local (%)	Ingreso Total (S/.)	Ingreso anual por productor (S/.)
Avimo	550	10,9	89,1	1793300	59776,6

Fuente: Elaboración propia.

Así mismo, desde el 2014, la Asociación de Moquegua recibe asesoría de Sierra Exportadora en los procesos de cosecha, post cosecha y comercialización, siguiendo las exigencias de las Buenas Prácticas Agrícolas.

Por otro lado, en el 2016, la Asociación de Productores Agropecuarios Vitivinícolas “San Gabriel de Cascas”, región La Libertad, han implementado su primer packing de uva de mesa, con capacidad para procesar dos toneladas diarias. Esta producción, sumada a la asistencia técnica y a la certificación del packing otorgada por Senasa, permitirá a los productores de Cascas ampliar su mercado (Sierra Exportadora, 2016).

4.1.7.2 Sistema de producción en la gran agricultura

El sistema de producción en la gran agricultura de la costa está constituido por 160 mil hectáreas dedicadas a la agroexportación. Para el caso de la vid, la producción se realiza en sistemas de monocultivo y en alta densidad. A diferencia de la pequeña agricultura, este sistema a gran escala se caracteriza por emplear más fertilizantes, plaguicidas y herbicidas, adicionando el uso de maquinarias y equipos.

En Piura, con la inversión en tierra que antes no había sido trabajada, resultó ser de alto rendimiento, hasta 29,4 ton/ha (Minagri, 2011) debido a factores favorables como el clima y la implementación de riego tecnificado.

Las agroexportadoras de uva se encargan de la producción, el acopio y la exportación, es decir, gestionan toda la cadena de valor de la uva. Sin embargo, algunas empresas como Agroexportadora Cachiche o Lamas Import/Export realizan solo el acopio de las uvas para su exportación, comprando el producto a pequeños productores (CNC, 2013).

Los fundos agrícolas de uva también producen paltas y cítricos, como es el caso de El Pedregal S.A. Mientras que el Complejo Agroindustrial Beta produce uvas, paltas, espárragos, tangelos y mandarinas (Gamarra, 2017)

4.2. Características generales de los hongos

Los hongos son un grupo muy amplio y diverso que incluye levaduras, mohos y hongos carnosos. Son heterótrofos y necesitan compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono. La mayoría viven como saprófitos en el suelo y agua, donde descomponen principalmente materia vegetal. Son organismos eucarióticos que se reproducen por medio de esporas y que no pueden realizar la fotosíntesis ya que están desprovistos de clorofila.

Los hongos se han considerado destructivos y beneficiosos para la agricultura. Por una parte, son los descomponedores primarios de materiales orgánicos, contribuyendo de forma significativa a la descomposición de la materia orgánica y

al reciclado de nutrientes, pero por otro lado son responsables de los daños que afectan a las cosechas a través de las enfermedades que provocan en plantas. Sólo los hongos fitopatógenos provocan una pérdida de cerca del 20% de los principales alimentos y cultivos de mayor importancia económica (Agrios, 2004).

4.2.1 Características de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers., es un hongo necrotrófico, agente causal de la podredumbre gris. Es capaz de afectar a más de 200 especies vegetales. Se desarrolla bajo condiciones de elevada humedad relativa y temperaturas de 0°C a 25°C. En la Tabla N° 8 se describe la clasificación taxonómica de *B. cinerea* (Fiallos, 2012).

Tabla N° 8: Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea*.

Reino	Fungi
División	Amastigomycota
Subdivisión	Deuteromycota
Clase	Deuteromycetes
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.

Fuente: (Fiallos, 2012).

4.2.1.1 Morfología y función de las estructuras de *Botrytis cinerea*

El micelio se encuentra formado por un conjunto de hifas, los cuales se multiplican de forma vegetativa mediante división citoplasmática. Se considera una estructura de resistencia y tienen la capacidad de vivir por largo tiempo en bulbos, semillas y partes vegetativa de las plantas.

A partir del micelio, generalmente envejecido, se forman diversas estructuras tales como los macroconidióforos, microconidióforos y esclerocios cuya función es la propagación y supervivencia ante condiciones desfavorables (Espinosa, 2006) Los conidios son las principales estructuras de dispersión y de resistencia del hongo, se consideran de corta duración en el campo y su supervivencia está determinada por la temperatura, humedad, actividad microbiana y la exposición a la luz. Las clamidosporas son células de aspecto hialino de alta variabilidad de forma y tamaño. Se consideran estructuras de resistencias bajo condiciones críticas (Holz, Coertze & Williamson, 2007).

Los esclerocios son considerados las estructuras de mayor importancia involucradas en la supervivencia y reproducción del hongo. Pueden sobrevivir

bajo condiciones ambientales adversas y producir estructuras llamadas apotecios, las cuales tienen una considerable capacidad de producción de conidios. La formación de estas estructuras está influenciada por varios factores como la temperatura, la luz, el pH y la composición del tejido sobre el cual se desarrollan. (Holz, 2007).

4.2.1.2 Ciclo de infección de *Botrytis cinerea*

- **Adhesión y germinación**

La adhesión de las estructuras de propagación como los conidios, se lleva a cabo en dos fases. En la primera el conidio se hidrata para establecer interacciones hidrofóbicas y permitir su germinación mediada por diversos factores como la disponibilidad de agua y una humedad relativa alta (>93%), la dureza e hidrofobicidad de la superficie, la fuente de carbono, los nutrientes y la producción de etileno por parte de la planta. La segunda etapa se presenta cuando el conidio ha germinado y se forma una matriz compuesta de lípidos, polisacáridos y melanina que le permite al hongo adherirse a la superficie del huésped (Espinosa, 2006).

- **Penetración**

La infección puede iniciar a partir de tejidos dañados o que han sido infectados previamente por algún otro patógeno, mediante la penetración directa e incluso por aberturas naturales como las estomas. Sin embargo, *B. cinerea* es capaz de producir sustancias que tienen la capacidad de degradar el material vegetal y facilitar la penetración. Estas son enzimas como la cutinasa la que destruye la cutina, la primera barrera de protección de la planta. La pectinasa y las lipasas, enzimas que hidrolizan ésteres de ácidos insaturados de cadena larga que forman parte de la cutícula y la cera presente en este tejido (Espinosa, 2006).

- **Muerte del tejido vegetal**

Cuando el hongo penetra el tejido vegetal, da origen a una lesión primaria que facilita la invasión del tejido por la difusión de compuestos con actividad fitotóxica relacionados con las manchas necróticas. El ácido oxálico al estar presente dentro de la planta forma cristales de oxalato cálcico el cual actúa como quelante de iones de calcio y cobre. 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 (Espinosa, 2006).

- **Fase de latencia**

Durante esta fase, las condiciones son desfavorables para el hongo, ya que se presentan los mecanismos de defensa de la planta, por lo que el hongo permanece en un estado de latencia. Este periodo se describe en un gran número de frutos, aunque se presenta con mayor frecuencia en fresa, frambuesa y uva (Espinosa, 2006).

En la Figura N°3 se observa el desarrollo de *Botrytis cinerea* desde la generación de conidios hasta la hibernación de esclerocios.

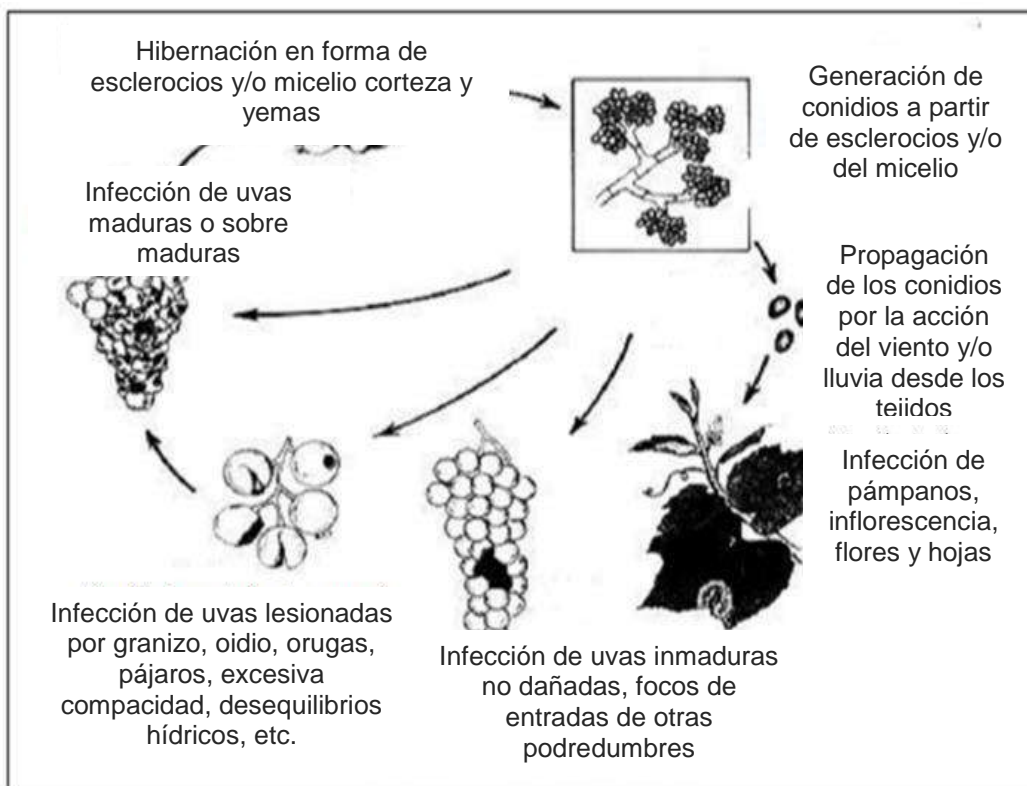


Figura N° 3: Ciclo biológico de *Botrytis cinerea* en uva.

Fuente: Laboratorio e Investigación Enológica de Castilla (2002).

4.2.2 Daños en el cultivo de la uva por *Botrytis cinerea*

B. cinerea es una enfermedad que produce síntomas y daños en la uva. Los síntomas comienzan cuando la uva presenta más del 8% de azúcar y de compuestos orgánicos en su composición, con condiciones ambientales que favorezcan el desarrollo del patógeno (Latorre Lillo, & Rioja, 2002).

Los periodos críticos de infección son durante la brotación, floración y precosecha. En el caso de la floración el patógeno se encuentra inactivo en el interior de la baya, esperando la disminución de los compuestos antifúngicos, para desarrollarse (Esterio, Auger, Ramos & Araneda, 2010).

Posterior a la floración los hongos que han permanecido en restos florales infectados están listo para atacar cuando la baya alcance su mayor desarrollo. Los daños provocados por *Botrytis* en la uva se manifiestan con presencia de pudriciones, canchales y necrosamiento de las partes florales, brotes y bayas. (Pérez, 2004).

4.2.2.1 Pérdidas económicas por *Botrytis cinerea* a nivel mundial

La presencia del moho gris (*B. cinerea*) en la uva es responsable de una pérdida anual de aproximadamente el 20% de su producción, y los costos para su control han sido de 780 millones de dólares en el 2002 (Genoscope, 2008). Las mayores pérdidas han sido en variedades con bayas muy agrupadas e híbridas francesas (Ellis, Doohan, Bordelon, Welty, Williams & Funt, 2004).

Tratamientos fungicidas contra *B. cinerea* costó unos 540 millones de euros en 2001, lo que representa el 10% del mercado de fungicidas en el mundo. Por otra parte, la magnitud de los tratamientos fungicidas contra este hongo ha provocado la aparición de cepas resistentes, lo que exige el desarrollo de nuevas moléculas (Leroux et al., 2002). El daño causado tiene un impacto económico desastroso en numerosos cultivos, en particular los viñedos en Francia.

4.3. Generalidades del género *Thymus*

El género *Thymus* contiene alrededor de 200 especies de hierbas perennes aromáticas y sub-arbustos de hasta 40 cm de alto, pertenecientes a la familia de las Lamiaceae. Se encuentra ampliamente distribuida en el sur de Italia, entre los 0 y 600 m.s.n.m. (Ebrahimi, Hadian, Mirjalili, Sonboli & Yousefzadi, 2010)

Son plantas perennes, erectas y generalmente aromáticas. Posee hojas enteras, planas, ovadas y lanceoladas, sus flores son hermafroditas o femeninas, aromáticas, de color blanco a violeta, entre 5 y 8 mm de longitud (Ebrahimi et al., 2010).

En la Tabla N° 9 se describe la clasificación taxonómica de tomillo (Tropicos, 2018).

Tabla N° 9: Clasificación taxonómica de tomillo.

Reino:	Plantae
Clase:	Magnoliopsida

Subclase:	Asteridae
Orden:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Género:	<i>Thymus</i>
Especie:	<i>Thymus vulgaris</i> L.

Fuente: Trópicos (2018).

4.4. Importancia de los Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos naturales complejos volátiles, sintetizados por las plantas aromáticas. Estos líquidos aromáticos se obtienen de diferentes órganos de la planta como flores, raíces, hojas, tallos, frutos, semillas, etc. Pueden ser obtenidos por presión, fermentación, o extracción, pero el método más común para la producción comercial es la destilación por vapor (Burt, 2004).

Se caracterizan por un olor fuerte y son sintetizados por las plantas aromáticas como metabolitos secundarios. En la naturaleza juegan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también frente a herbívoros mediante la reducción de su apetito por tales plantas (Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008).

4.4.1 Aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.)

El aceite esencial de tomillo, *Thymus vulgaris*, presenta como componente mayoritario el timol y en algunas variedades su composición puede alcanzar valores hasta del 80% (Dawidowicz, Rado & Wianowska, 2009).

Se comprueba además la presencia de carvacrol, gamma-terpineno y p-cimeno (precursor del timol). Tanto los aceites esenciales obtenidos de las especies de *Thymus*, como el timol, han sido reconocidos por su actividad antibacteriana y antifúngica, razón por la cual se emplean industrialmente en la preparación de desinfectantes de uso humano, enjuagues bucales y otros agentes antimicrobianos utilizados a nivel doméstico (Klein, Rüben & Upmann, 2013).

En la Figura N° 4 se muestra la estructura química del Timol (2-isopropil-5-metilfenol).

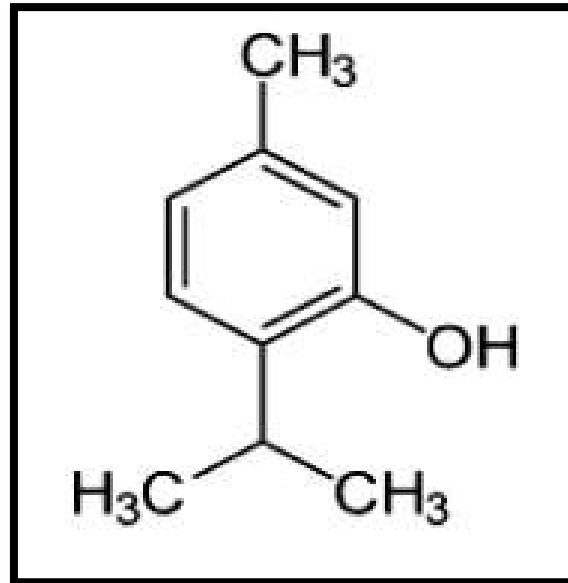


Figura N° 4: Estructura química del Timol

Fuente: Muñoz et al. (2012).

4.5. Metabolitos secundarios y su actividad antifúngica

Las plantas están compuestas de un gran número de metabolitos secundarios, algunos autores mencionan que pueden llegar a existir más de 100000 metabolitos secundarios involucrados en la defensa de todas las especies de plantas y de los cuales solo se conoce el 10% (Mazid, Khan & Mohammad. 2011).

De estas, se han encontrado que metabolitos de origen fenólico presentan actividad antimicrobiana hacia hongos, bacterias y virus, por ejemplo: el timol y algunos taninos del tomillo (*Thymus vulgaris*), cumarinas de comino (*Carum carvi*), taninos de canela (*Cinnamomum verum*).

Una gran variedad de compuestos terpenoides también presentan actividad hacia patógenos como: aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*) y la capsaicina del chile (*Capsicum annum*) presentan actividad sobre bacterias. Algunos aceites esenciales del laurel (*Laurus nobilis*) presentan actividad sobre bacterias y hongos.

4.6. Acción de los aceites esenciales en el control de los hongos fitopatógenos

Los aceites esenciales siempre han sido de gran interés debido a su potencial para inhibir el crecimiento de patógenos. Los efectos antimicrobianos y antifúngicos del orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus sp.*) se han atribuido a sus aceites esenciales que contienen los terpenos carvacrol [2-metil-5-(1-metiletil) fenol] y timol [5-metil-2-(1-metiletil) -fenol] (Martínez, 2012).

El efecto antifúngico del timol se debe a su capacidad para causar daño a la membrana celular al inducir la peroxidación lipídica y a la inhibición de la biosíntesis del ergosterol (Gao et al., 2016). Investigaciones han demostrado que entre los 22 monoterpenoides que se producen de forma natural, el timol y carvacrol son los más efectivos para inhibir la germinación de esporas y el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Monilia fructicola* (Rong & Ting, 2000).

Otras investigaciones han comprobado que el timol es capaz de dañar la membrana celular de *F. graminearum*, causado por la alteración de la biosíntesis de ergosterol. Así mismo, el timol a una concentración de 25 – 100 µg/mL puede destruir la membrana celular en diferentes tipos de microorganismos. Las especies de oxígeno reactivo (ROS) originadas a partir de la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática, son uno de los principales factores que inducen la peroxidación lipídica de la membrana celular eucariótica bajo diversos estímulos ambientales. En un estudio reciente han demostrado que la acción fungicida del timol contra las esporas de *Aspergillus flavus* están estrechamente relacionada con la sobre generación de ROS provenientes de la NADPH oxidasa. Además, el timol modula la actividad fagocítica de los macrófagos mejorando la generación de ROS dependiente de NADPH oxidasa (Gao et al., 2016).

V. MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES

En la Tabla N° 10 se muestra los materiales y equipos utilizados.

Tabla N° 10: Materiales y equipos

Material vegetal	Cantidad
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	8,5 kg
Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	1 kg

Laboratorio	Cantidad
Placas Petri de 10 cm	40
Tubos de ensayo	10
Erlenmeyer de 1000 mL	10
Vasos precipitados 500 mL	6
Pipetas	10
Probetas 500 mL	6
Jeringas estériles	20
Portaobjetos	10
Portaobjetos excavados	10
Cubreobjetos	10
Agua destilada	5 L
Guantes de nitrilo	4

Materiales complementarios	Cantidad
Lápiz marcador permanente	1
Cinta adhesiva plástica	1
Sacabocado de 6 mm	1
Frascos de vidrio	10

Equipos	Cantidad
Autoclave Marca: Quimis	1
Estufa de cultivo Marca: Binder	1
Cámara de Neubauer	1
Refrigerador Marca: Samsung	1
Agitador magnético	1
Balanza analítica Marca: Pettler P 5000	1
Microscopio óptico Marca: Zeiss	1
Plancha calefactora Marca: Thermo Scientific	1

Reactivos	Cantidad
Papa Agar Dextrosa (APD)	4 L
Agar Sabouraud	2 L
Azul de tripan	20 mL
Azul de lactofenol	5 mL
Tween 20	10 mL
Glicerina	10 mL

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Agroforestal, en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur y en el Laboratorio de Farmacognoscia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

5.2.2 Diseño estadístico

Se realizó el análisis estadístico mediante ANOVA para determinar si existen diferencias entre los tratamientos ($P < 0.05$).

Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey HSD ($P < 0.05$) para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa SPSS Statistics 20.

Prueba *in vitro*: Los resultados fueron analizados a través del diseño completamente al azar con 6 tratamientos y 6 repeticiones.

Fuente de Verificación	Grado de Libertad
Tratamiento	5
EE	30
TOTAL	35

Modelo aditivo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde;

Y_{ij} = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

μ = Media general del experimento

t_i = Efecto del tratamiento i

ε_{ij} = Error aleatorio asociado a la respuesta Y_{ij}

5.2.2.1 Tratamientos en estudio:

Prueba *in vitro*: Se utilizaron diferentes concentraciones de aceite esencial de tomillo y un control absoluto que solo incluye APD como se observa en la Figura N° 5.

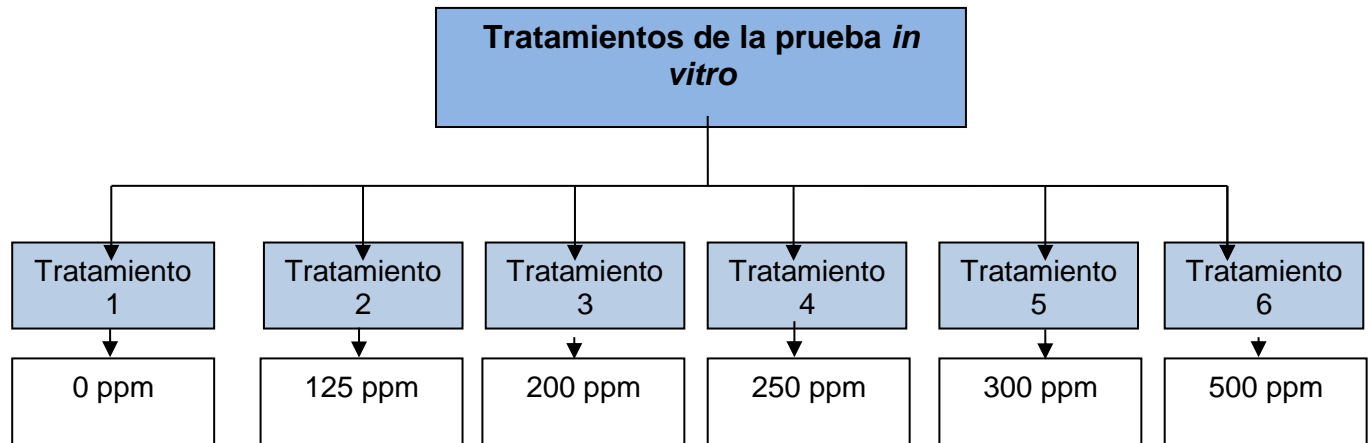


Figura N° 5: Tratamientos de la evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica del aceite esencial de tomillo en medio APD.

Fuente: Propia.

Prueba *in vivo*: Se tomó una muestra (biofungicida + hongo), control positivo (sin biofungicida + hongo) y control negativo (sin biofungicida y sin hongo) como se observa en la Figura N° 6.

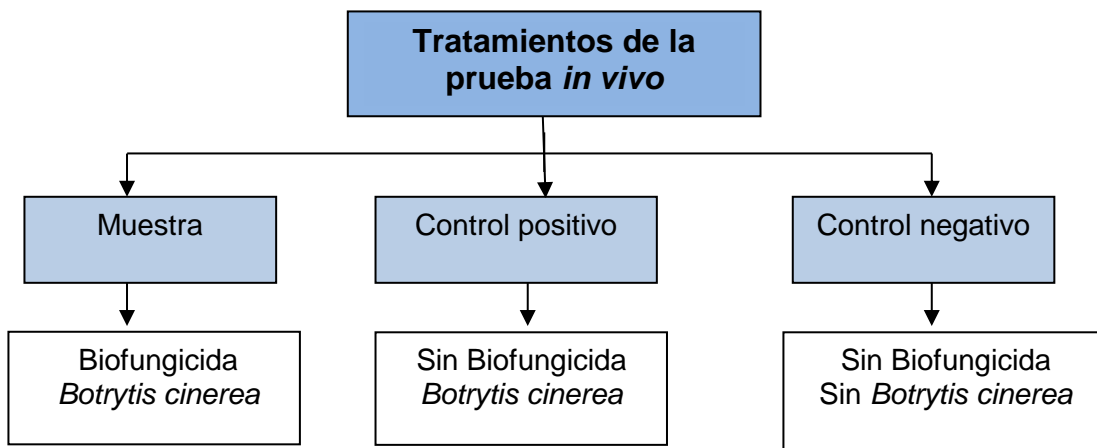


Figura N° 6: Tratamientos de la evaluación *in vivo* del biofungicida

Fuente: Propia.

5.2.3 Ejecución del experimento

5.2.3.1 Obtención del aceite esencial del tomillo (*Thymus vulgaris* L.)

El material vegetal empleado en esta investigación fueron hojas y tallos de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), obtenido de una huerta orgánica ubicada en Manchay Bajo, distrito de Pachacamac. En el Anexo 1, se detalla la ubicación de la zona de recolección.

Previo a la extracción del aceite, se desinfectó con hipoclorito de sodio al 5% y se secó a temperatura ambiente durante cinco días. Posteriormente se cortó con una tijera los tallos de tomillo para facilitar su extracción. En el Anexo 2 se detalla la obtención del aceite esencial de tomillo mediante un diagrama de flujo y en el Anexo 3 se muestra imágenes del proceso de extracción del aceite esencial de tomillo.

El aceite esencial fue extraído mediante la técnica de arrastre de vapor en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. Se determinó el rendimiento con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso del aceite esencial (kg)}}{\text{Peso del tomillo fresco (kg)}} * 100$$

5.2.3.2 Aislamiento de *Botrytis cinerea* a partir de material vegetal

La cepa del hongo *Botrytis cinerea* fue aislado de cultivos enfermos de vid (*Vitis vinifera*) en el Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Posteriormente las cepas se conservaron en Agar Papa Dextrosa (APD) y se incubaron a 18°C (Plascencia et al., 2012).

Una vez desarrollado el micelio, se tomaron muestras realizando improntas con cinta adhesiva en un portaobjetos, y sobre esta se colocó una gota de azul de tripan. Las preparaciones fueron observadas en el microscopio con la finalidad de confirmar la presencia de *B. cinerea* (Anexo 4), para la identificación correcta del microorganismo se utilizó las claves taxonómicas especializadas de hongos (Arias & Jerez., 2008).

Posteriormente se tomaron esporas de hongo y se inocularon nuevamente en placas Petri hasta obtener un cultivo puro de *B. cinerea* (Castaño et al., 1998).

5.2.3.3 Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de tomillo *in vitro*

Se echaron las diferentes concentraciones del aceite esencial de tomillo (125 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 500 ppm) en placas Petri y como control absoluto se usó el medio de cultivo (APD) sin aceite esencial. Después de dos horas en reposo se colocaron los discos de 0,5 cm de diámetro del micelio del hongo en el centro de cada placa Petri (Guédez et al., 2014). En el Anexo 5 se muestra el Diagrama de flujo de la prueba *in vitro*.

La inhibición del crecimiento micelial (MGI) se calculó al día 7 utilizando la siguiente fórmula (Albuquerque et al., 2006).

$$MGI = [(DC - DO) / DC] \times 100$$

Dónde:

MGI: Inhibición del crecimiento micelial

DC: media del diámetro de las colonias en placas no tratadas con aceite

DO: media del diámetro de las colonias en placas tratadas con aceite esencial

5.2.3.4 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales *in vivo*

Se realizó un experimento con racimos de uva por unidad experimental, las cuales se colocaron en un recipiente cubierto de papel absorbente previamente estéril, a los frutos se les realizó una herida previa de 1 cm² en el centro del fruto con un bisturí estéril y se incorporó la concentración más adecuada del biofungicida a base del aceite esencial de tomillo, se dejó actuar durante 10 minutos en los frutos. Después se echó una suspensión de esporas a una concentración de 2.0X10⁵ esporas mL⁻¹. Un grupo de frutos únicamente inoculados con el patógeno fue usado como control positivo. Todos los frutos se incubaron a 25°C. A las 24 horas se inició la evaluación del índice de severidad usando una escala de severidad 5 niveles (Alvarado, 2011) En el Anexo 6 se detalla mediante un diagrama de flujo.

Siguiendo el modelo propuesto por Alvarado (2011) se obtuvo la Tabla N° 11 cuya escala presenta los valores correspondientes al porcentaje de infección.

Tabla N° 11: Nivel de severidad y porcentaje de infección de *Botrytis cinerea* en uva.

Nivel de severidad	Porcentaje de infección (%)
1	0
2	5 - 15
3	20 - 40

4	50 - 70
5	80 - 100

Fuente: Propia.

La evaluación se realizó diariamente durante siete días. Para el índice de severidad se utilizó la fórmula descrita por Pérez et al. (1995):

$$\text{Índice de Severidad} = [X_i (1) + X_i (2) + X_i (3) + X_i (4) + X_i (5)] / N$$

Dónde: X_i = número de frutos; (1, 2, 3, 4, 5) = niveles de severidad; N = número total de frutos.

VI. RESULTADOS

6.1 Obtención del aceite esencial de tomillo

El rendimiento del aceite esencial de tomillo por el método de arrastre de vapor se señala en la Tabla N° 12, donde el peso de tomillo seco utilizado fue de 3 kg y el peso final del aceite final fue de 0,0255 kg, teniendo como rendimiento un 0,3%. Mientras que el volumen final del aceite fue de 40 mL.

Tabla N° 12: Rendimiento del aceite esencial de tomillo.

Peso tomillo fresco (kg)	Peso tomillo seco (kg)	Volumen final aceite (mL)	Peso final aceite (kg)	Rendimiento (%)
8,5	3 kg	40	0,0255	0,3

En la Tabla N° 13 se describe las principales características organolépticas como el color, olor y sabor del aceite esencial de tomillo y en la Tabla N° 14 se menciona el tiempo y la temperatura de la extracción del aceite mediante la técnica de arrastre por vapor.

Tabla N° 13: Características organolépticas del aceite esencial de tomillo.

Aspecto general	Color	Olor	Sabor	Densidad relativa (g/mL)
Líquido fluido, levemente turbio	Amarillo levemente oscuro	Aromático e irritante	Picante y levemente irritante	0,6375

Tabla N° 14: Condiciones de extracción del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) mediante la técnica de arrastre por vapor.

Tiempo (Horas)		Temperatura (°C)
Pre destilado	Destilado	
2	3	110

6.2 Aislamiento e identificación del patógeno

En los aislamientos obtenidos de las muestras de las uvas enfermas se pudo observar el micelio con apariencia de una masa algodonosa con una coloración blanquecina que se tornaba de una tonalidad más oscura hacia los extremos. En la Figura N°7 y en la Figura N° 8 se puede observar la estructura macroscópica y microscópica de *Botrytis cinerea*, respectivamente.



Figura N° 7: Identificación macroscópica de *Botrytis cinerea*.

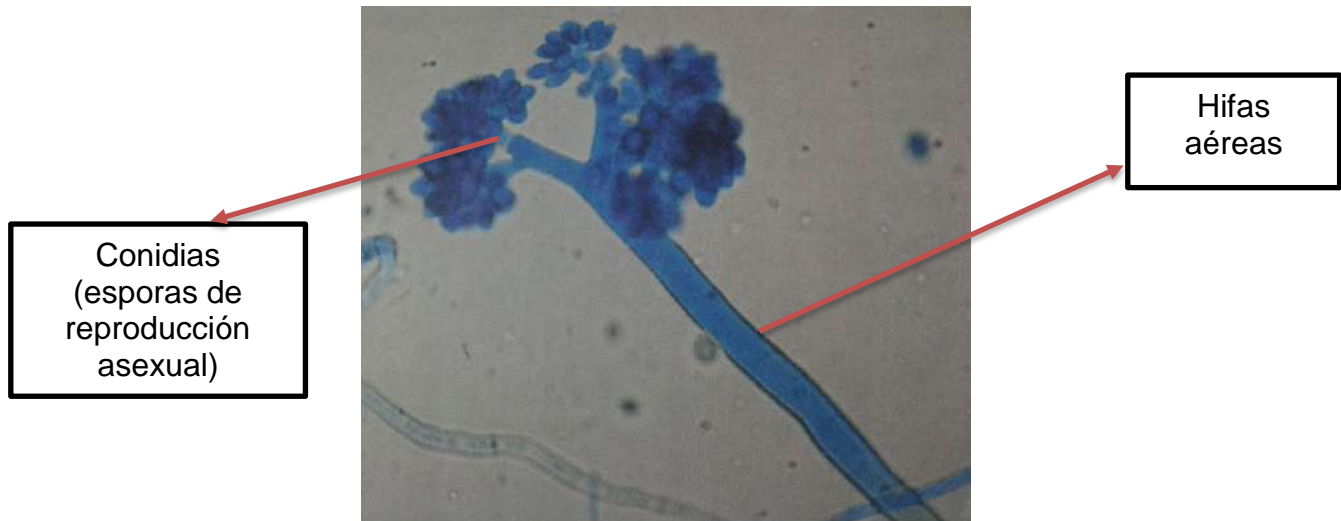


Figura N° 8: Identificación microscópica de *Botrytis cinerea*.

6.3 Resultado Estadístico

6.3.1 Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de tomillo sobre *Botrytis cinerea* al día siete

Como parte del análisis estadístico se realizó el análisis ANOVA para determinar si existe diferencia significativa entre las concentraciones a las cuales el aceite esencial presentó actividad antifúngica. En el Anexo 10 se observa que existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones ($P < 0.05$). Y en la Tabla N° 15 se muestra los resultados de la prueba Tukey, que nos permite ver las diferencias estadísticas entre tratamientos.

Tabla N° 15: Resultados de la prueba Tukey

HSD Tukey^a

Concentración aceite esencial (ppm)	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
.0	6	.0000				
125.0	6		15.0168			
200.0	6			43.5690		
250.0	6				53.9394	
300.0	6				61.8121	
500.0	6					100.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.148	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

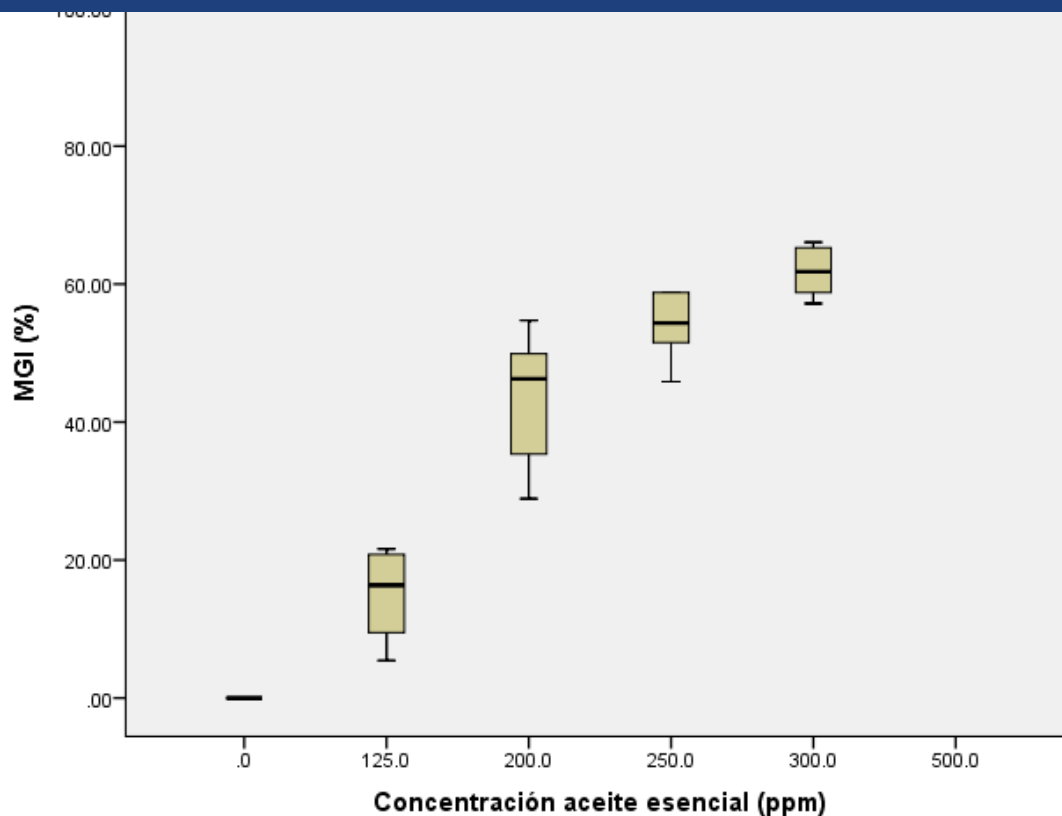


Figura N° 9: Gráfico de la concentración del aceite esencial de tomillo y la Inhibición del crecimiento micelial (MGI)

En el Anexo 11 observamos el grupo formado por la concentración 250 ppm y 300 ppm, el P-valor (Sig.) es de 0.148, por lo tanto, deducimos que no hay diferencias significativas entre las dos concentraciones o que ambos grupos son homogéneos. Para las otras concentraciones si existen diferencias significativas.

En la Tabla N° 16 se observa que existen seis grupos diferenciados (a diferentes concentraciones), indicándose la media del área de cultivo de cada grupo. De esta forma, los resultados apuntan a que los cultivos de *Botrytis cinerea* que se cultivan con una concentración de aceite esencial (500 ppm) (T6) tienen un menor crecimiento por una reducción en el área de cultivo (0 cm²), y a concentraciones menores el área de cultivo aumenta. Así para 300 ppm (T5), 250 ppm (T4), 200 ppm (T3), 125 ppm (T2) y el control (0 ppm) (T1), se obtienen 4,43 cm²; 6,44 cm²; 9,81 cm²; 21,83 cm² y 30,16 cm², respectivamente.

Este resultado muestra que, a mayor concentración de aceite esencial, la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* es mayor, observándose una disminución del área de cultivo.

Tabla N° 16: Resultados del área de cultivo y la Inhibición del crecimiento micelial (MGI) de la prueba *in vitro*.

Tratamiento (T)	Concentración aceite (ppm)	Diámetro promedio (cm)	Área (cm ²)	*MGI (%)
1	Control (0)	6,19	30,16	0
2	125	5,3	21,83	12,97
3	200	3,5	9,1	42,21
4	250	2,9	6,44	52,83
5	300	2,4	4,43	60,9
6	500	0	0	100

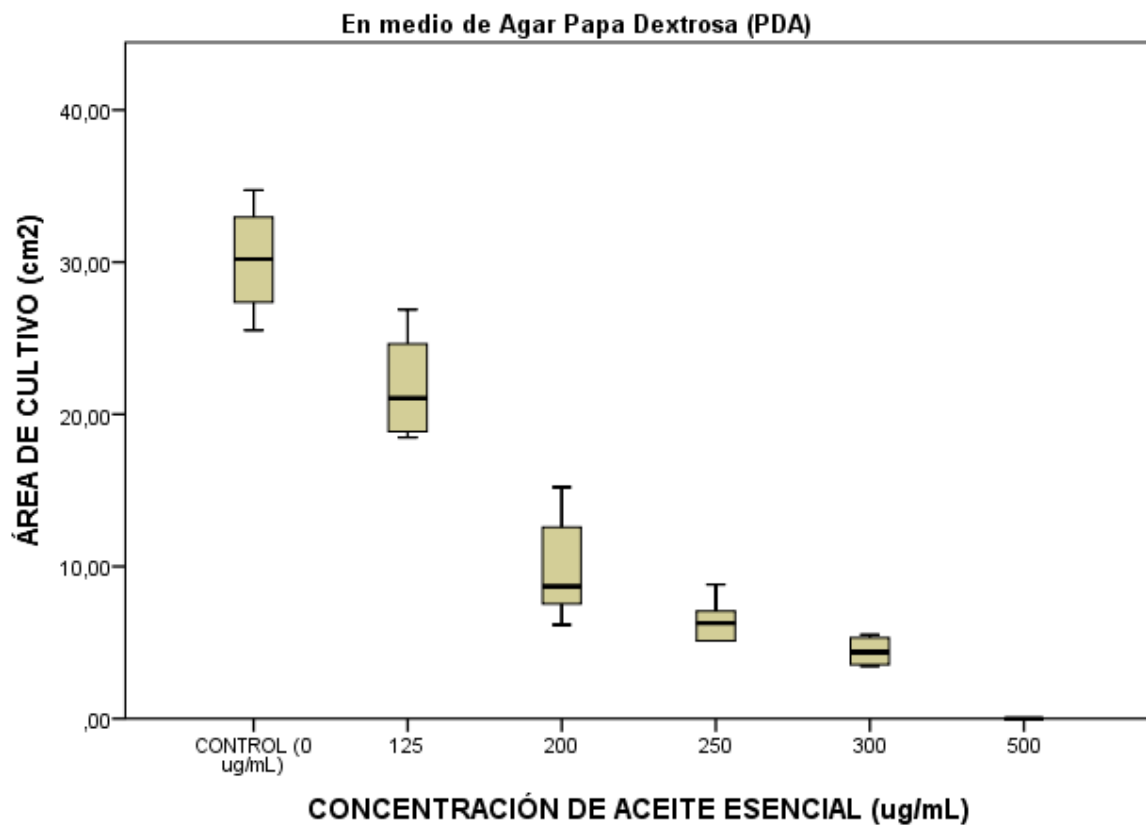


Figura N° 10: Efecto de la concentración del aceite esencial de tomillo en el crecimiento del cultivo de *Botrytis cinerea*

Así mismo, en la Figura N° 11 se observa que la inhibición del crecimiento micelial (MGI) aumenta cuando la concentración del aceite esencial es mayor, con un coeficiente de correlación (R^2) de 97,81%.

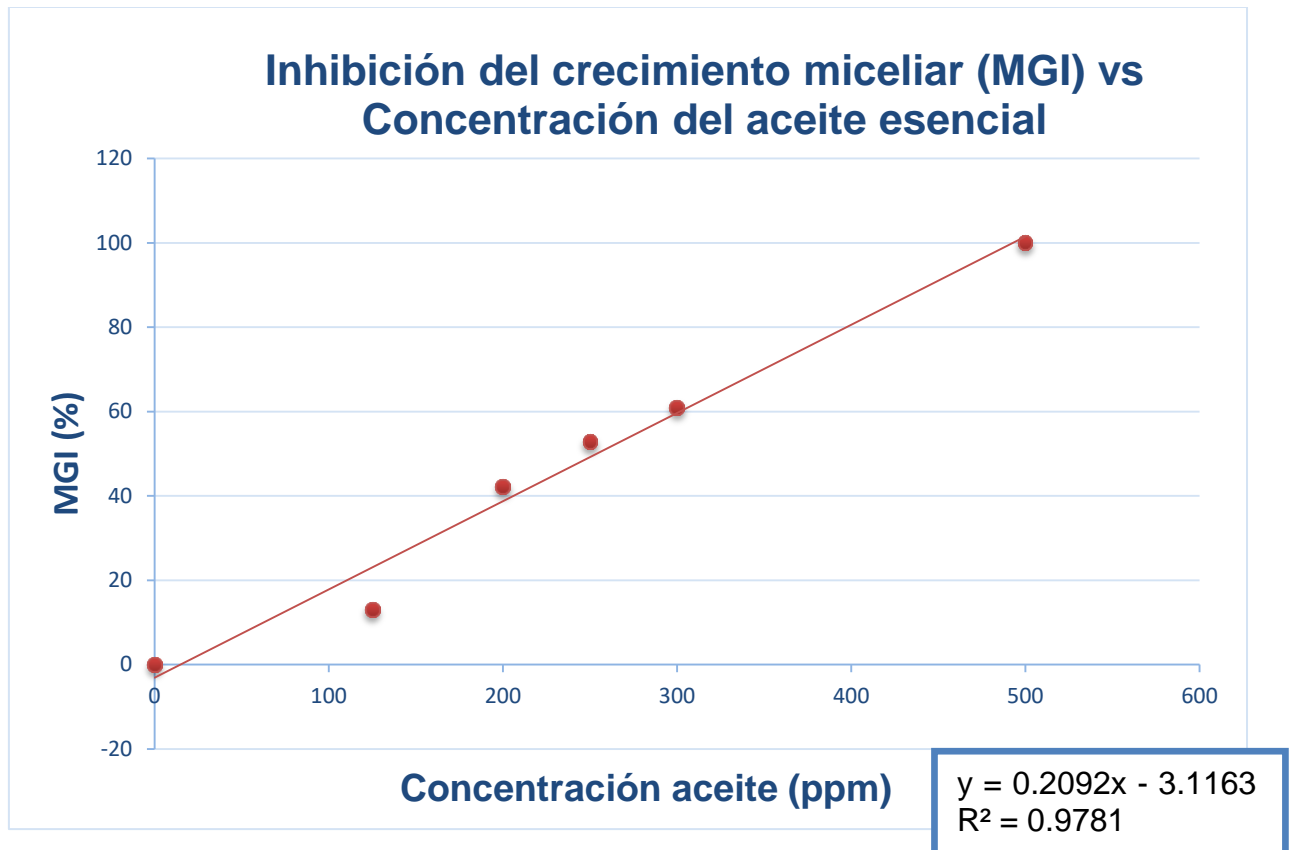






Figura N° 11: Gráfico de inhibición del crecimiento micelial (MGI) vs Concentración del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

Fuente: Propia.

En la Tabla N° 17 se muestran los resultados de la prueba *in vitro*, en donde se observa el efecto que tuvo las diferentes concentraciones del aceite esencial de tomillo sobre el desarrollo de *Botrytis cinerea*.

Tabla N° 17: Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de tomillo sobre *Botrytis cinerea* en placas Petri

Control absoluto	Tratamientos (T _n)
<p>T1: Control absoluto</p> 	<p>T2: 125 ppm</p> 
<p>T1: Control absoluto</p> 	<p>T3: 200 ppm</p> 

T1: Control absoluto



T4: 250 ppm



T1: Control absoluto



T5: 300 ppm



T1: Control absoluto



T6: 500 ppm





6.2.2 Evaluación *in vivo*




Para la evaluación *in vivo* se realizó previamente la formulación del biofungicida con la concentración del aceite que tuvo mayor actividad antifúngica en la prueba *in vitro* (500 ppm). Así mismo se utilizaron otros aditivos para que pueda aplicarse directamente a los racimos de uva (*Vitis vinifera* L.). En la Tabla N° 18 se detalla la formulación del biofungicida y en la Tabla N° 19 se observa los resultados que tuvo el biofungicida sobre la uva infectada con *Botrytis cinerea* durante siete días.

Tabla N° 18: Formulación del biofungicida.

Ingrediente	%
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	3
Tween 20	3
Agua destilada estéril	94
TOTAL	100

Tabla N° 19: Nivel de severidad y porcentaje de infección de *Botrytis cinerea* en uva.

Nivel de severidad	Porcentaje de infección (%)	Imagen
1	0	
2	5 - 15	

3	20 - 40	
4	50 - 70	
5	80 - 100	

En la Tabla N° 20 se observa los resultados para la prueba *in vivo*, utilizando la fórmula de índice de severidad durante siete días. Para el caso de la muestra (aceite esencial + hongo) hubo un control hasta el día tres.

Tabla N° 20: Resultados del índice de severidad de la prueba *in vivo*.

Día	Control positivo	Control negativo	Muestra
1	1,08	1,00	1,00
2	1,13	1,00	1,00
3	1,29	1,25	1,11
4	1,42	1,38	1,30
5	1,54	1,38	1,56
6	1,63	1,50	1,63
7	1,79	1,63	2,41

Por otro lado, se determinaron los costos para controlar *Botrytis cinerea* en una hectárea de vid y se obtuvo que el costo por aplicación es de S/. 337,8. Sin embargo, si la aplicación es anual, se tiene un costo total de S/. 1351.00, asumiendo que la aplicación es de cuatro veces al año. El resumen de los costos se observa en la Tabla N° 21 y los costos de producción y el costo anual para el control de *Botrytis cinerea* se detallan en el Anexo 7 y Anexo 8.

Tabla N° 21: Costos del biofungicida y costo por aplicación en una hectárea de vid

	Costo total (S/.)
Insumos	9635
Actividades	600
Costo total Biofungicida (S/.)	10235
Costo por litro (S/./L)	102,35
Costo por aplicación (S/./ha)	337,8

Fuente: Propia.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Proceso de extracción del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*)

La extracción del aceite esencial de tomillo fue realizada por el sistema de arrastre de vapor, que es un proceso adecuado para obtener aceites esenciales de planta aromáticas (Bandoni, Retta, Lira & Van Baren. 2009).

El tiempo de la destilación para la obtención del aceite esencial de tomillo fue de tres horas, tiempo sugerido tomando en cuenta los criterios de rendimiento y costos (Durling et al., 2007).

La planta de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) utilizada para obtener el aceite esencial fue recolectada de un campo de cultivo ubicado en Manchay Bajo, distrito de Pachacamac, con una altitud aproximada de 153 m.s.n.m. y con una temperatura promedio de 28°C en el día 26 de marzo del 2017, la cosecha fue el mismo día y el tomillo se encontraba en prefloración. Según Figueiredo et al. (2008) existen varios factores que pueden afectar la acumulación de los aceites volátiles en las plantas aromáticas. Como por ejemplo el manejo agronómico, las condiciones ambientales, la época de cosecha y la edad de la planta. Para este caso, la baja altitud y una alta temperatura son uno de los factores que pueden haber causado el bajo rendimiento del aceite esencial de tomillo (0,3%), ya que otra investigación

realizada en Rionegro, Antioquía, Colombia, con una mayor altitud promedio (2080 m.s.n.m.) y una temperatura promedio (18,5°C) tuvo un mayor rendimiento (0,6%) (Morales, 2015). Es importante mencionar que el proceso de extracción y el tiempo de secado fueron iguales a la presente investigación.

Por otro lado, Mohamad et al (2012) reportaron un rendimiento entre 0,91% a 1,43% de la especie *Thymus kotschyanus* realizada por el mismo método. Esto también se puede deber a que el rendimiento también varía entre las especies del género *Thymus*.

En el ámbito comercial la mayoría del aceite esencial es extraído de *Thymus zygis*, en donde los rendimientos de aceite varían entre 0,5 – 1,5% (Espitia, 2004).

7.2 Aislamiento de *Botrytis cinerea*

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento de *B. cinerea* fue el APD, debido a que investigaciones realizadas por Ponce, García, Lozoya y Herrera (2002) confirman que el medio de cultivo donde mejor creció *B. cinerea* fue el APD. La temperatura de incubación utilizada fue óptima (18° C), esto coincide con una investigación realizada por Latorre y Rioja (2002), en donde concluyen que la germinación de conidias de *B. cinerea* depende significativamente de la temperatura, y que la máxima germinación ocurre a 20° C, mientras que disminuye significativamente a los 30°C.

Por otro lado, para inhibir el crecimiento bacteriano se utilizó el ácido tartárico estéril al 10%. Sin embargo, otras investigaciones también recomiendan utilizar ácido láctico al 25% para evitar el desarrollo de bacterias (Cañedo y Ames, 2004).

Se confirmó la presencia de *Botrytis cinerea* por sus características macroscópicas y microscópicas, según Arias y Jerez (2008) las colonias de *B. cinerea* son blancas y algodonosas, que luego se tornan de color gris a pardo, distribuidos irregularmente. Así mismo, se verificó en el microscopio su morfología que se caracteriza por sus conidias y conidióforos que presentan ramificaciones alternas y rectas.

7.3 Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de tomillo sobre *Botrytis cinerea*

Los resultados obtenidos en la prueba *in vitro*, demuestran que la concentración de 500 ppm (T6) inhibió por completo el crecimiento del micelial de *B. cinerea*.

Diversas investigaciones han demostrado que los compuestos presentes en las plantas ejercen un control sobre los hongos fitopatógenos. Por ejemplo, Alvarez, (2012) demostró que los extracto etanólicos de fresa a la concentración de 125 ppm mostró una inhibición de 73,8%, este resultado podría ser atribuido a la presencia de flavonoides.

De la misma manera Lizcano (2007) evaluó el control *in vitro* de *B. cinerea* con tomillo (*Thymus vulgaris*) a concentraciones de 150, 250 y 500 ppm, siendo el tratamiento de 500 ppm el de mejor resultado, sin embargo, en la prueba de invernadero se observó que el extracto de tomillo tiene un mejor resultado en prevención de enfermedades que en la curación de estas.

Wilson, Solar, Ghaouth y Wisniewski (1997) evaluaron 49 aceites esenciales y encontraron que la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) mostró la mayor actividad antifúngica contra *B. cinerea*. La actividad antifúngica en estos trabajos estuvo fuertemente asociada con fenoles monoterpénicos, especialmente el timol, carvacrol y eugenol. Además, los aceites esenciales como el aldehído cinámico de la canela, el mentol de la hierbabuena y el eugenol del clavo presentan actividad antifúngica.

Así mismo, se ha demostrado que aceites esenciales de limón una concentración de 17 ppm inhibió el crecimiento del micelio y la germinación de esporas de *B. cinerea* en la poscosecha (Vitoratos, Bilalis, Karkanis y Efthimiadou, 2013).

Mientras que aceites esenciales de orégano (*Origanum compactum* Benth) y tomillo (*Thymus glandulosus* Lag. ex H. del Villar) a una concentración de 100 ppm inhibieron completamente el crecimiento de *B. cinerea*. Mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas se evidenció que los principales componentes activos de esos aceites fueron carvacrol y timol, respectivamente. Otra planta de interés fue la menta (*Mentha pulegium* L.), que causó inhibición moderada en el crecimiento del fitopatógeno (Bouchra et al., 2003).

Para el caso del aceite esencial de tomillo, Walter (2001) concluyó que el aceite esencial de esta planta inhibió al 100 % el crecimiento micelial de *B. cinerea* a una concentración de 3300 ppm.

Por otro lado, hay investigaciones que demuestran que se puede inhibir el crecimiento de *B. cinerea* con una concentración menor a 500 ppm. Daferera, Ziogas y Polissiou (2003) reportaron que una concentración de 150 ppm de aceite esencial de tomillo puede llegar a inhibir totalmente el crecimiento micelial de *B. cinerea*, Mientras que Bhaskara, Angers, Gosselin, Arul (1998) demostraron que una concentración de 200 ppm de dos tipos clonales de tomillo (*Thymus vulgaris*) pueden inhibir el crecimiento micelial a un 90,5% y 63,5%, respectivamente.

Herrera (2015) utilizó aceites esenciales de orégano 1% y 10%; aceite esencial de tomillo 0,1% y 10%; y quitosano 0,1% y 10%. En este experimento *in vitro* se

destaca que los dos aceites esenciales a ambas concentraciones inhibieron completamente el crecimiento de *B. cinerea* y el quitosano presentó una inhibición completa al 10%.

Sin embargo, para tener datos más precisos sobre la relación que existe entre inhibición del crecimiento micelial y la concentración del aceite, se debe conocer la cantidad de los metabolitos secundarios con actividad antifúngica como el timol y carvacrol presentes en el tomillo. Según Camele, Altieri, De Martino, De Feo, Mancini & Rana (2012) una concentración de 250 ppm de carvacrol puede inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

Las concentraciones a las cuales se produjo la inhibición son altas (500 ppm) con respecto a otros estudios hechos con diferentes tipos de plantas; sin embargo, se debe tener en cuenta que el aceite esencial utilizado contiene otros metabolitos o impurezas sin actividad antifúngica.

7.4 Actividad antifúngica *in vivo* del aceite esencial de tomillo sobre *Botrytis cinerea*

El tratamiento del biofungicida en el ensayo *in vivo* mostró actividad antifúngica durante los tres primeros días comparado con el control, inhibiendo el crecimiento del hongo en las bayas de uvas inoculadas. Además, se puede notar que no hay un mismo efecto de lo aplicado en un bioensayo que lo aplicado *in vivo*.

A partir del día tres, el biofungicida ya no tuvo efecto sobre la inhibición de *B. cinerea*, esto se puede deber a que uno de sus ingredientes es aceite esencial y, por lo tanto, se volatiliza fácilmente (Reddy, Gupta, Ray & Rodriguez, 1997). Por tanto, se debería considerar otras técnicas de formulación para reducir la volatilidad y prolongar la actividad de este producto natural, así como para mejorar la cobertura.

Herrera (2015) demostró que, en bioensayos de pétalos de rosas, con los tratamientos utilizados (Aloe vera 25% más aceite esencial de orégano al 1%), (aceite esencial de tomillo al 0,1%), y (quitosano al 0,1%), no inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* ya que todos los tratamientos fueron similares al testigo.

Taborda (2013) determinó *in vivo* el porcentaje de control de la incidencia del daño de *Botrytis cinerea* (por escala valor de incidencia de 0 a 7 según características específicas de deterioro de los frutos) sobre fresas inoculadas, después de 120 horas de seguimiento, se observó que los aceites esenciales de orégano (*Lippia origanoides*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) a una concentración de 500 ppm controló eficientemente la incidencia del daño causado, ya que no se observaron diferencias significativas con el tratamiento testigo (fungicida de síntesis química Benomil).

Dell et al., (1998) afirma sobre la actividad fungicida del aceite de tomillo y reporta que las infecciones fueron controladas exitosamente con aceite de tomillo. Sin embargo, el control de la pudrición del racimo usando aceite de tomillo fue menos concluyente y las evaluaciones de campo serían necesarias.

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 Conclusiones

- El rendimiento del aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris* L.) recolectado de la zona de Manchay Bajo mediante la técnica de arrastre por vapor fue de 0,3%.
- En la prueba *in vitro* la concentración más alta de aceite esencial de tomillo (500 ppm) fue la que tuvo mayor control sobre *B. cinerea*, ya que inhibió por completo su crecimiento. Mientras que la concentración de (125 ppm) fue la que tuvo menor control sobre *B. cinerea*.
- En la prueba *in vivo* se determinó que el tratamiento del biofungicida con la concentración (500 ppm) disminuyó la germinación del fitopatógeno en relación al control negativo y control positivo hasta el día tres.

8.2 Recomendaciones

- Evaluar otros parámetros en el proceso de extracción que puedan influir en el rendimiento del aceite esencial, como, técnica de extracción, tiempo de destilación, tamaño de la materia prima y comparar los resultados de rendimiento con los resultados de esta investigación.
- Se debe controlar otros factores como el manejo precosecha (riego, fertilización, pH del suelo) y pos cosecha de la materia prima, los cuales son determinantes en el porcentaje de rendimiento de aceites esenciales.
- Si se realiza una extracción del aceite esencial a mayor escala, se podrá obtener mayores rendimientos y por tanto se reducirán los costos de producción.
- Evaluar otras plantas aromáticas con propiedades antifúngicas y que contengan un mayor rendimiento en la extracción del aceite esencial.
- Utilizar más concentraciones para probar la concentración mínima inhibitoria.
- Para determinar la eficiencia del biofungicida de tomillo, los resultados obtenidos en esta investigación podrían ser aplicados a un cultivo experimental.
- Para conocer con mayor proporción las propiedades antifúngicas del timol y carvacrol, es necesario llevar el aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*) a un análisis cromatográfico.
- Para próximos estudios se recomienda utilizar concentraciones más altas de aceite de tomillo en la prueba *in vivo* y hacer aplicaciones más continuas.
- Utilizar otras cepas de *Botrytis cinerea* para observar otros tipos de comportamientos ante los biofungicidas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adebayo, O., Dang, T., Belanger, A., & Khanizadeh, S. (2013). Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Science*, 2(1), 217–226.
2. Agrimundo. (2016, marzo 22). Situación actual del mercado mundial de la uva de mesa. *Agrimundo*, p. 1-4.
3. Agrios, G.N. (1995). Fitopatología/Plant Pathology. New York: *Academic Press*.
4. Agrios, G. N. (2004). Plant pathology. Elsevier Academic Press.
5. Albuquerque, C.C.; Camara, T.R.; Wiladino, R.D.R.; Ulises, C. (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 527-535.
6. Almanza, P.J. (2011). Determinación del crecimiento y desarrollo del fruto de vid (*Vitis vinifera* L) bajo condiciones de clima frío tropical (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia.
7. Al-Reza, S.M, Rahman, A., Ahmed, Y., & Kang, SC. (2010). Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pestic Biochem Physiol*, 96, 86-92.
8. Altieri, M. (2001). Biotecnología agrícola: Mitos, riesgos ambientales y alternativas. *Ecología Política*, 1-41.
9. Alvarado, A.M., Barrera, L., Hernández, L. & Velázquez, G. (2011). Antifungal activity of chitosan and essential oils on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill causal agent of soft rot of tomato. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13: 127-134.
10. Alvarez-Gomez, T. B. (2012). Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. Michoacán, México.
11. Arata, A. & Toro O. (2005). Rumbo a la competitividad: aprendizajes de la promoción de la agroindustria rural en la provincia de Caravelí. Lima: desco.

12. Arata, A. (2014). Cautivos en su mercado. Pequeños productores de pisco y vino. Disponible en <http://www.descosur.org.pe/wp-content/uploads/2014/12/PeruHoy2007BCaraveli.pdf>

13. Arias, J. & Jerez, A. (2008). Elaboración de un Atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la Sabana de Bogotá. (Tesis de pregrado). *Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.*

14. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). *Biological effects of essential oils—a review. Food and chemical toxicology, 46(2), 446-475.*

15. Banco Central de Reserva del Perú. (2018). *Gerencia Central de Estudios Económicos. Recuperado de <https://estadisticas.bcrp.gob.pe/estadisticas/series/cuadros/memoria>*

16. Bandoni, A. L., Retta, D., Lira, P. M. D. L. E. O., & van Baren, C. M. (2009). *¿Son realmente útiles los aceites esenciales? Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas, 8(5), 317–322.*

17. Bautista, S., García, E., Barrera, L.L., Reyes, R., & Wilson, C.L. (2003) Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology, 29, 81-92.*

18. Bernal, A., Zamora, J., Virgen, G. & Nuño, R. (2005). Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus spp.* sobre hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología, 23(002), 140-146.*

19. Bertagno, B. C. (2011). Análisis económico financiero de una plantación de vides de pequeña escala, 4-36. Recuperado de http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/4927/bertagno-analisis-economico-financiero-plantacion-vides-pequena-escala.pdf

20. Bhaskara, M., Angers, P., Gosselin, A., Arul, J. (1998). Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry. Vol. 47, No 8, 1515-1520.*

21. Boiteux, J., Hapon, M., Fernández, M., Lucero, G., & Pizzuolo, P. (2014). Efecto del extracto acuoso de chañar (*Geoffroea decorticans* Burkat) sobre *Botrytis cinerea*, como posible alternativa para su control durante poscosecha de uva de mesa. *Rev. Fca Uncuyo*, 47(1).
22. Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L.M.I., & Hmamouchi M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers. *Ethnopharmacology*, 89,165-169.
23. Built, J & Dubos, B. (1988). Botrytis bunch and blight. In: "Compendium of grape diseases" (eds. Pearson, R.C. and Goheen, A.C.) APS Press. *The American Phytopathological Society*, 13-15.
24. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
25. Camele, L; Altieri, L; De Martino, L; De Feo, V; Mancini, E; Rana, GL (2012). *In vitro* control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oils components. *Int J Mol Sci* 13:2290-2300.
26. Cañedo, V & Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos; Centro Internacional de la papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.
27. Castaño-Zapata, J. (1998). Prácticas de laboratorio de fitopatología. Práctica (20). Segunda edición. Universidad de Caldas. Facultad de ciencias agropecuarias. Departamento de Fitotecnia. Escuela Agrícola Panamericana. Departamento de Protección Vegetal. p 103.
28. Cepes 2002 «Rentabilidad de la agricultura de la costa peruana y las inversiones para el mejoramiento del riego». Documento electrónico.
29. Chase, A.R. (1987). Compendium or ornamental foliage plant diseases. APS Press. USA. 169 pp.
30. Chilosi, G.; Caruso, C.; Caporale, C.; Leonardi, L.; Bertini, L.; Buzi, A.; Novile, M.; Magro, P.; Buonocore, V. (2000). Antifungal activity of a bowman birk-type trypsin inhibitor from wheat kernel. *Journal Phitopathology*. 148: 477- 481.

31. Choque, F. 2005 Caracterización ampelográfica de cultivares de vid (*Vitis* sp) en Caravelí. Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
32. CNC. (2013). Elaboración de un mapeo de clústers en el Perú. Lima, Perú: Consejo Nacional de la Competitividad.
33. COMEX. (2017). Semanario Comercio exterior, 1 - 8. Recuperado de <http://www.comexperu.org.pe/media/files/semanario/semanario%20comexperu%20892.pdf>
34. Cortés, P., Vilegas, G., Aguilar, M.P., Paz, M., Maruris, C., Juárez, P. (2008). Síntomas ocasionados por plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 46(2), 145-152.
35. Crisosto, C. H., Garner, D., & Crisosto, G. (2003). Developing Optimum Controlled Atmosphere Conditions for "Red globe" Table Grapes. *Acta Horticulturae*, 600, 803-808.
36. Dawidowicz, A. L., Rado, E., & Wianowska, D. (2009). Static and dynamic superheated water extraction of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Journal of separation science*, 32(17), 3034-3042.
37. Daferera, D.J, Ziogas, B.N., & Polissiou, G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*.
38. De corato, U.; Maccioni, O.; Trupo, m & D. Sanzo. (2010). Use of essential oil of *laurus nobilis* obtained by means of supercritical carbon dioxide technique against post-harvest fungi. *Crop protection*, 29: 142-147.
39. Dell K; Gubler, W; Krueger, R; Sanger, M & L. Bettig. (1998). The efficacy of JMS stylet-oil on grape powdery mildew and botrytis bunch rot and effects on fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(1), 11-16.
40. Dirección General de Competitividad Agraria. (2010). *Resumen ejecutivo de uva*. Lima: agroaldia. Recuperado de

http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/uva/resumen_ejecutivo_uva.pdf.

41. Dorantes, L., Colmenero, R., Hernández, H., Mota, L., Jaramillo, M.E., Fernández, E., & C, S. (2000). Inhibition of growth of some food borne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *Int. J. Food Microbiology*, 57, 125–128.

42. Dubey, N.K.(Ed.). (2011). Natural products in plant pest management. UK: CAB.

43. Ellis, M., Doohan, D., Bordelon, B., Welty, C., Williams, R., & Funt, R. (2004). Midwest Small Fruit Pest Management Handbook. *The Ohio State University Extension*, 133-134.

44. Ebrahimi, S. N., Hadian, J., Mirjalili, M. H., Sonboli, A., & Yousefzadi, M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*, 110(4), 927-931.

45. Espinosa, M. (2006). Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Tesis Doctoral). Universidad de Cadíz. Andalucía, España.

46. Espitia, C. 2004. Aceites de Hierbas Aromáticas culinarias, extracción y composición. Proyecto de Hierbas Aromáticas. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

47. Esterio, M.; Auger, J.; Ramos, C. & Araneda, M.J. (2010). *Botrytis* en uva de mesa de exportación: PCR en Tiempo Real una innovadora herramienta tecnológica para la detección oportuna de resistencia a fungicidas. *Fedefruta*, 129:24-35. Recuperado de http://www.fedefruta.cl/newsletter/123/docs/Marcela_Esterio_Botrytis.pdf

48. Fiallos, H. (2012). Inhibición de *Botrytis cinerea* en rosas a base de extractos alcohólicos y acuosos de hierba mora *Solanum nigrum* (Tesis pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.

49. Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile

- components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213–226.
50. Gamarra, D. (2017). Factores que impulsaron el incremento de las exportaciones de uvas frescas de Piura a Estados Unidos en el periodo 2011-2015. (Tesis de pregrado). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC). Lima, Perú.
 51. Gao, T.; Zhou, H.; Zhou, W.; Llangbin, H.; Jtan, C. & Zhiqi, S. (2016). The fungicidal Activity of Thymol against *Fusarium graminearum* via Inducing Lipid Peroxidation and Disrupting Ergosterol Biosynthesis. *Molecules*, 21, 770; doi: 10.3390.
 52. GDB Network. (2015). Mercado mundial de la uva. Oferta, demanda y proyecciones. [Abstract]. *Prospectiva 2020*, 4, 18.
 53. Gebel, M., y Magurno, F. (2014). Assessment of the antifungal potential of the essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* causative agent of postharvest grey mold on strawberry fruits. *Columella - Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. Vol. 1, No. 2, 17-23.
 54. Genoscope. (2008). Sequencing projects of *Botrytis cinerea*. Estimated losses for vineyards in France amount to 15-40% of the harvest, depending on climatic conditions. Francia. Recuperado de <http://genoscope.cns.fr>
 55. Gestión. (2016). Pequeños productores de Moquegua conquistan Bolivia con sus envíos de uva Red Globe. Recuperado de: <https://gestion.pe/economia/empresas/pequenos-productores-moquegua-conquistan-bolivia-envios-uva-red-globe-109841>
 56. Guédez, C. (2014). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 34:81-85
 57. Herrera, J. (2015). Evaluación de recubrimientos y fungicidas naturales para el control postcosecha de *Botrytis cinerea* en rosas (*Rosa sp*) variedad Vendela (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.
 58. Holz, G; Coertze, S., & Williamson, B. (2007). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. *Springer*, 9-27.
 59. IFOAM. (2016). *The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2016*. Recuperado de <https://shop.fibl.org/fileadmin/documents/shop/1698-organic-world-2016.pdf>

60. Klein, G., Rüben, C., & Upmann, M. (2013). Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Current microbiology*, 67(2), 200- 208.
61. Laboratorio e Investigación Enológica de Castilla (2002). Factores de calidad del vino. *Revista de enología científica y profesional*.
62. Latorre, B. (1997) Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fomentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection*, 16, n.3, 209–214.
63. Latorre, B.; Lillo, C. & Rioja, M. (2002). Efecto de la temperatura en el desarrollo de la enfermedad *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. *Ciencias e Investigación Agrícola*, 29 (3), 145- 151.
64. Latorre, B. & Rioja, M. (2002). Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. *Ciencias e Investigación Agraria*, 29 (2), 67- 72.
65. Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Alberini, C., & Lanen, C. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 58, 876–888.
66. Lizcano-Gonzales, M.C. (2007). Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium Oxysporum* y *Sclerotinia sclerotorum* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, Colombia.
67. Manici, L., Lazzeri, L., & Palmieri, S. (1997). *In vitro* fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzymederiver products toward plant pathogenic fungi. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2768-2773.
68. Martínez, J. (2012). Natural Fungicides Obtained from Plants. Universidad Politécnica de Cartagena, Colombia.

69. Mazid, M., Khan, T., & Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Journal Biology and Medicine*, 3(2), 232-249.
70. Minagri - Ministerio de Agricultura y Riego. (2011). Resumen Ejecutivo de la Uva. Lima, Perú: Ministerio de Agricultura y Riego.
71. MINAGRI - Ministerio de Agricultura y Riego. (2015). Sistema Integrado de Estadística Agraria. Perú: SIEA. Recuperado de: <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2016/01/SIEA-SET-2015.pdf>
72. MINAGRI - Ministerio de Agricultura y Riego. (2016). *Boletín Estadístico de Producción Agrícola, Pecuaria y Avícola*. Perú: SIEA. Recuperado de: http://siea.minag.gob.pe/siea/sites/default/files/produccion-agricola-pecuaria-avicola-dic16_2_0.pdf
73. MINAGRI - Ministerio de Agricultura y Riego. (2017). *Boletín Análisis Económico de la Producción Nacional Uva Fresca*. Perú.
74. Mohamad, P. S. Z., Reza, H., Jalil, K., & Reza, E. (2012). Determination and comparing of the essential oil components in wild and cultivated populations of *Thymus kotschyianus* Boiss. & Hohen. *African Journal of Plant Science*, 6(2), 89–95.
75. Morales, P. (1995). *Cultivo de uva*. Santo Domingo: Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc.
76. Morales, A. (2015). Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
77. Muñoz, K., Cortés, N., Pujol, A., Osorio, E., Calderón, J., Londoño, J. (2012). Determinación de la actividad antioxidante en ingredientes herbales para alimentos utilizando nuevos métodos de análisis químico. *Scientia Agropecuaria*, 2(2012), 133 - 137.
78. Pearson R., Goheen A. (1994) 'Compendium of Grape Diseases'. pp. 13–15. (APS Press: St Paul, MN).

79. Pérez, M; Flores, P; García, V. & Lozano, V. (1995). Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en Marín, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 13:1-9.
80. Pérez, J.L. (2004). Podredumbre Gris (*Botrytis cinerea* Pers.) In Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación. España. Secretaria General Técnica. Centro de Publicaciones, 202-208.
81. Plascencia, R; Olalde, V; Ceja, L; Ceja, L; Venegas, J; Oyoque, G; Angoa, M. (2012). Antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs. *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Ra Ximhai 8,3.
82. Plotto A, R Roberts, D Roberts (2003) Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). ISHS Acta Hort. 628:737-745.
83. Ponce, F; García, M; Lozoya, H; Herrera, T. (2002). Resistencia de *Botrytis cinerea* (Pers.) Fr,M a dos fungicidas benzimidazoles utilizados en la floricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8(1): 95-105.
84. Reddy, G; Gupta, B; Ray, K; Rodriguez, V. (1997). Development of the Drosophyla olfactory sense organs utilizes cell-cell interactions as well as lineage. *Development* 124(3): 703--712.
85. Regnault-Roger, C., Philogéne, B.J.R., Vicent, C. (2004). Biopesticidas de origen vegetal. 1ª Edición en español. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
86. Rong, T. & Ting, Z. (2000). Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Research*, 12:113-121.
87. Ruesta, A. & Rodríguez, R. (1992). Manual Cultivo de la Vid en el Perú. Segunda Edición. Ediciones FUNDEAGRO. 15, 39, 161, 173.
88. Sierra Exportadora. (2016). Sierra Exportadora inició su capacitación a productores de frutas para mejorar su competitividad en el mercado externo. Recuperado de: <http://www.sierraexportadora.gob.pe/2016/03/25/sierra-exportadora-inicio-capacitacion-productores-de-frutas-para-mejorar-su-competitividad-en-el-mercado-externo/>

89. Taborda, L. (2013). Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK. y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Colletotrichum musae* en banano y *Botrytis cinerea* en fresa.
90. Tropicos. (2018). *Thymus vulgaris* L. Recuperado de <http://www.tropicos.org/Name/17600443>
91. Salazar, D.M., & Melgarejo, P. (2005). Viticultura. Técnicas de Cultivo de la Vid, Calidad de la Uva y Atributos de los Vinos. AMV Ed. Mundi-Prensa S.A., Madrid, España.
92. SEDAM - Secretaría Técnica Cadena Frutícola Huila. (2006). Manual técnico del cultivo de uva (*Vitis labrusca*) en el departamento de Huila. Litocentral Ltda., Huila, Colombia.
93. Servicios al exportador. (2017). Informe Mensual de Exportaciones: enero 2017. Recuperado de: <http://www.siicex.gob.pe/siicex/documentosportal/104506851rad6B52F.pdf>
94. Soliman, K.M., & Badeaa, R.I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40(11), 1669-1675.
95. Umaña, G. (1996) Control biológico de enfermedades postcosecha de frutas. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. En: III Congreso de Fitopatología.
96. Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., & Efthimiadou, A. (2013). Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 41, 86-92.
97. Wang, C., Zhang, J., Chen, H., Fan, Y., & Shi Z. (2010). Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Tropical Plant Pathology*, 137-142.
98. Walter, R., Innes, C.M.J., & Allan, E.J. (2001). The potential biocontrol agent *Pseudomonas antimicrobica* inhibits germination of conidia and outgrowth of *Botrytis cinerea*. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 346-348.

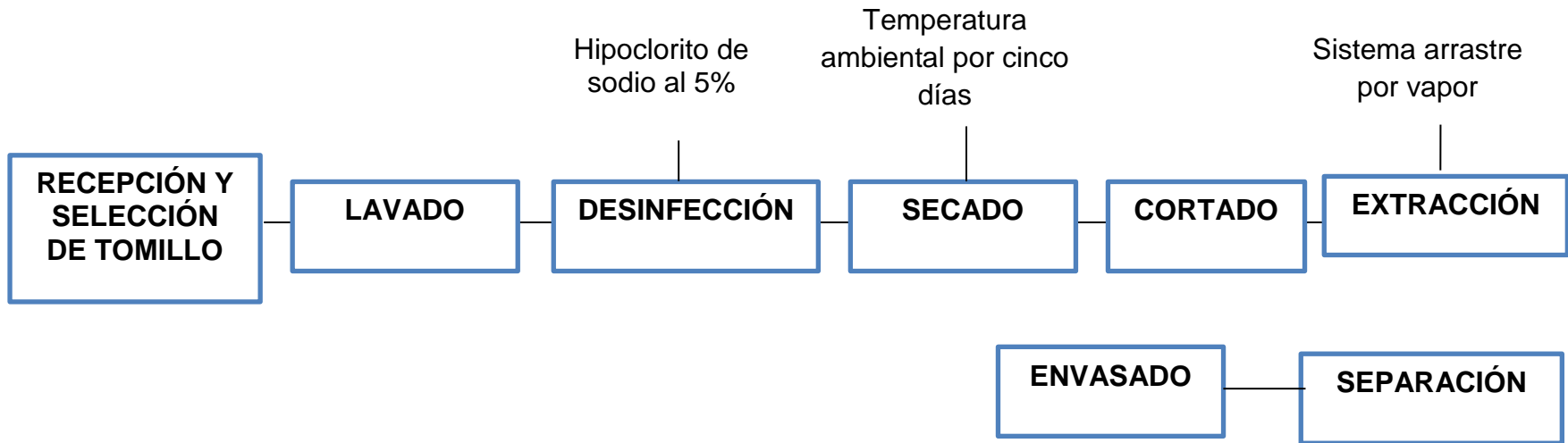
99. Wilson, C. L., Solar, J.M., El Ghaouth, A., & Wisniewski, M.E. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiologist*, 81, 204-210.

X. ANEXOS

ANEXO 1: DESCRIPCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ZONA DE RECOLECCIÓN DE TOMILLO (*THYMUS VULGARIS* L.)





Departamento	Lima
Provincia	Lima
Distrito	Pachacamac
Localidad	Manchay Bajo
Coordenadas UTM	Latitud: - 12.171278 Longitud: -76.862495
Altitud	153 msnm

ANEXO 2. DIAGRAMA DE FUSO PARA LA OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL



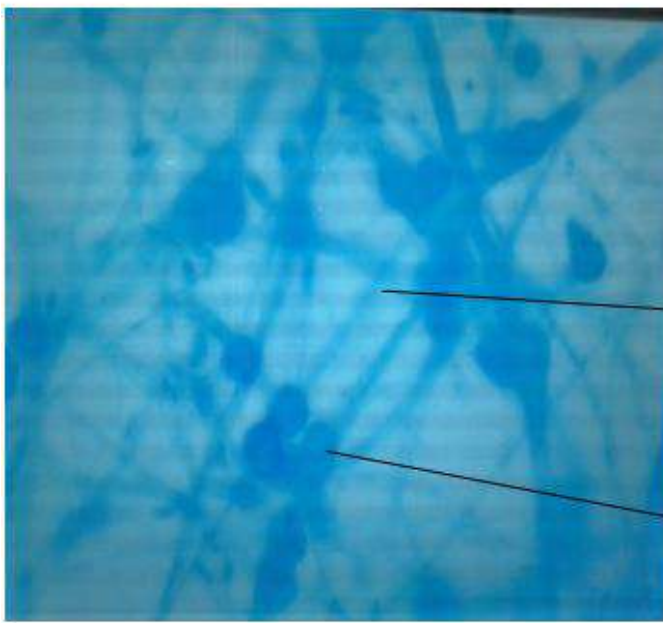
Elaboración propia.

**ANEXO 3: PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO
(*Thymus vulgaris* L.).**

1.	2.	3.	4.
			
<p>Planta de tomillo cultivado</p>	<p>Hojas y tallos de tomillo secos</p>	<p>Hojas y tallos en el equipo de arrastre por vapor</p>	<p>Aceite esencial de tomillo</p>

Elaboración propia.

ANEXO 4: OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE *Botrytis cinerea*.

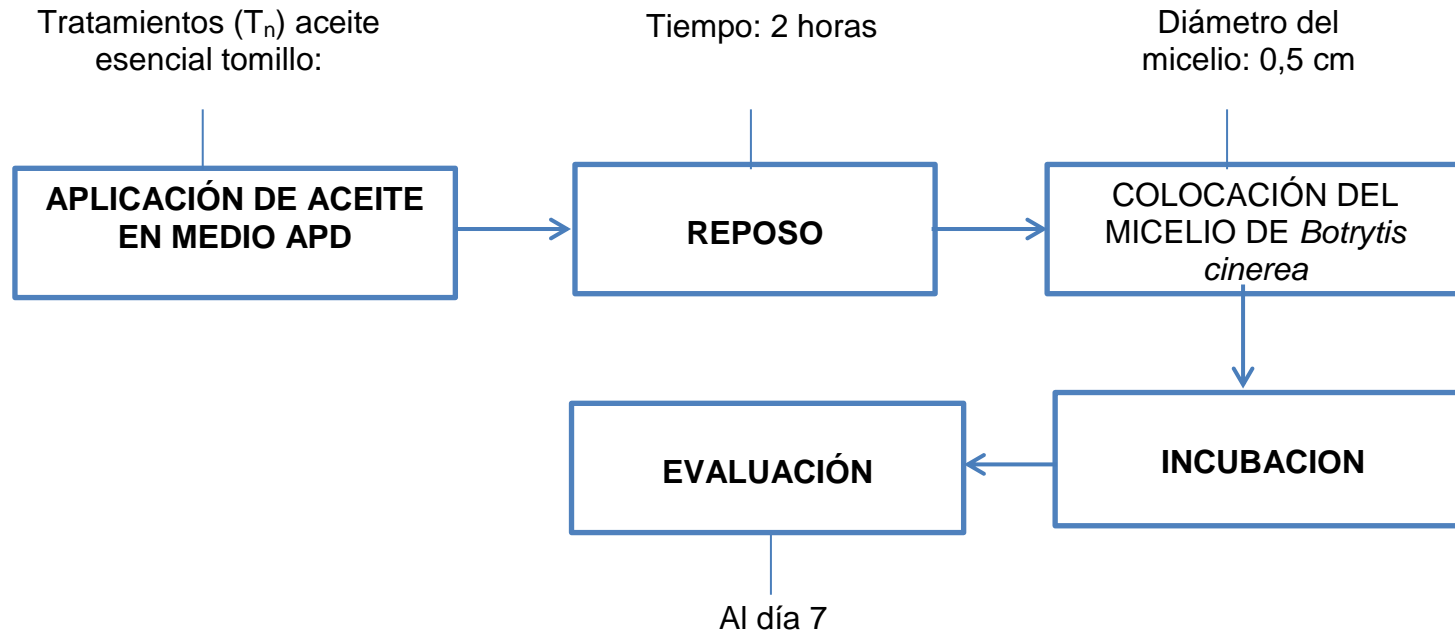


Hifas

Conidios (esporas de reproducción asexual)

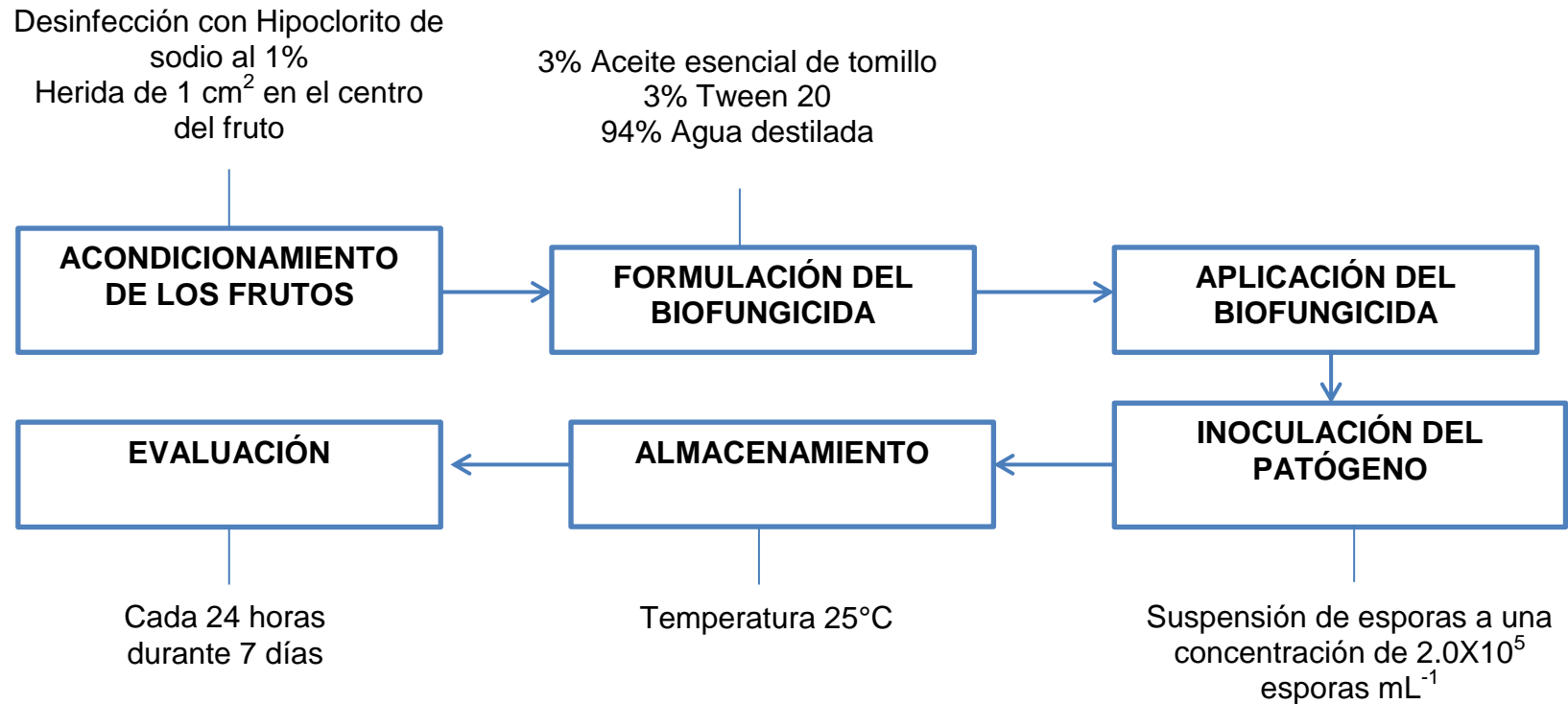
Elaboración propia.

ANEXO 3. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRUEBA *IN VIVO*.



Elaboración propia.

ANEXO 6. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRUEBA *IN VIVO*



Elaboración propia.

ANEXO 7: COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL BIOFUNGICIDA

EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (3 L)				
Insumos	Cantidad	Unidad	Costo Unitario (S/.)	Costo Total (S/.)
Tomillo	638	kg	4	2550
Actividades				
Transporte	1	ud.	100	100
Secado	1	ud.	0	0
Extracción de aceite esencial	638	kg	10	6380
COSTO TOTAL (S/.)				9030
COSTO POR LITRO (S/./L)				3010

ELABORACIÓN DEL BIOFUNGICIDA (100 L)				
Insumos	Cantidad	Unidad	Costo unitario (S/.)	Costo total (S/.)
Aceite esencial tomillo	3	L	3010	9030
Tween 20	3	L	45	135
Agua destilada estéril	94	L	5	470
SUBTOTAL (S/.)				9635
Actividades				
Mezcla	100	L	3	300
Envasado	100	ud.	2	200
Acondicionado	100	ud.	1	100
SUBTOTAL (S/.)				600
COSTO TOTAL (S/.)				10235
COSTO POR LITRO (S/./L)				102,35

Elaboración propia.

ANEXO 8: COSTO DE APLICACIÓN EN UNA HECTÁREA DE CULTIVO DE VID

APLICACIÓN DEL BIOFUNGICIDA EN CAMPO DE 1 HECTÁREA					
Insumos	Cantidad	Unidad	Costo unitario (S/.)	Costo por aplicación (S/. /ha)	Costo total anual (S/. /ha/año)
Biofungicida	3,3	L	102,35	337,8	1351
Agua	6,7	L	-	-	-

Elaboración propia.

N° Solicit ud	Fecha recepción	Tipo de muestra	Departamento	Nombre científico de la plaga	Nombre común de la plaga	Categoría	Nombre científico del cultivo	Nombre común del vegetal	Altitud	Área sembrada	Área afectada del cultivo	Unidad
2012109637	26/10/2012 09:32:15	FRUTO	ICA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	462	162	0.001	ha
2012110523	23/11/2012 09:54:18	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	1315	0.8	0.4	ha
2012110529	23/11/2012 09:56:38	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	943	1.5	0.45	ha
2012110536	23/11/2012 09:53:32	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	408	2.5	0.35	ha
2012110547	23/11/2012 09:55:51	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	386	3	0.3	ha
2012110553	23/11/2012 09:55:05	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	341	1	0.3	ha
2012111256	10/12/2012 15:11:12	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	1046	1	0.4	ha
2012111259	10/12/2012 14:58:32	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	1040	2	0.45	ha
2012111262	10/12/2012 15:03:58	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	1245	1.5	0.3	ha
2012111265	10/12/2012 15:04:39	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	1387	2	0.3	ha
2012111271	10/12/2012 15:00:19	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	1693	1	0.4	ha
2013102675	19/02/2013 12:11:41	FRUTO	CAJAMARCA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	1075	0.7	0.3	ha
201010363	25/01/2010 09:03:04	FRUTO	AYACUCHO	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	2460	3	3	ha
201013582	10/09/2010 09:23:04	FRUTO	AYACUCHO	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	2339	2	2	ha

201310 7213	06/05/2013 12:52:34	HOJA	AREQUIPA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	1966	0.001	0.001	ha
201410 2836	05/06/2014 10:18:34	FRUTO	MOQUEGUA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	1435	0.6	0.6	ha
200915 705	19/10/2009 08:48:07	FRUTO	LIMA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	145	30	30	ha
200916 057	30/10/2009 08:56:27	HOJA	ICA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	415	3	0.001	ha
201210 4281	02/04/2012 08:21:22	FRUTO	ANCASH	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	230	49.5	5	%
201311 2335	24/10/2013 09:33:29	HOJA	ICA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	85	0.028	0.001	ha
201610 0009	05/01/2016 14:24:18	HOJA	ICA	<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris/ Moho gris	Presente: Sin control oficial	<i>Vitis vinifera</i>	Vid	120	10.5	10.5	ha

Fuente: SENASA (Base de datos: Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Vegetal) (SIGSVE). (2017).

ANEXO 10: RESULTADOS ESTADÍSTICOS - ANOVA

ANOVA

MGI (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	37862.776	5	7572.555	260.229	.000
Dentro de grupos	872.987	30	29.100		
Total	38735.763	35			

ANEXO 11: RESULTADOS ESTADÍSTICOS - TUKEY

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: MGI (%)

HSD Tukey

(I) Concentración aceite esencial (ppm)	(J) Concentración aceite esencial (ppm)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.0	125.0	-15.01684*	3.11446	.001	-24.4898	-5.5439
	200.0	-43.56902*	3.11446	.000	-53.0419	-34.0961
	250.0	-53.93939*	3.11446	.000	-63.4123	-44.4665
	300.0	-61.81212*	3.11446	.000	-71.2850	-52.3392
	500.0	-100.00000*	3.11446	.000	-109.4729	-90.5271
125.0	.0	15.01684*	3.11446	.001	5.5439	24.4898
	200.0	-28.55219*	3.11446	.000	-38.0251	-19.0793
	250.0	-38.92256*	3.11446	.000	-48.3955	-29.4496
	300.0	-46.79529*	3.11446	.000	-56.2682	-37.3224
	500.0	-84.98316*	3.11446	.000	-94.4561	-75.5102
200.0	.0	43.56902*	3.11446	.000	34.0961	53.0419
	125.0	28.55219*	3.11446	.000	19.0793	38.0251
	250.0	-10.37037*	3.11446	.025	-19.8433	-.8974
	300.0	-18.24310*	3.11446	.000	-27.7160	-8.7702
	500.0	-56.43098*	3.11446	.000	-65.9039	-46.9581
250.0	.0	53.93939*	3.11446	.000	44.4665	63.4123
	125.0	38.92256*	3.11446	.000	29.4496	48.3955

	200.0	10.37037*	3.11446	.025	.8974	19.8433
	300.0	-7.87273	3.11446	.148	-17.3456	1.6002
	500.0	-46.06061*	3.11446	.000	-55.5335	-36.5877
300.0	.0	61.81212*	3.11446	.000	52.3392	71.2850
	125.0	46.79529*	3.11446	.000	37.3224	56.2682
	200.0	18.24310*	3.11446	.000	8.7702	27.7160
	250.0	7.87273	3.11446	.148	-1.6002	17.3456
	500.0	-38.18788*	3.11446	.000	-47.6608	-28.7150
500.0	.0	100.00000*	3.11446	.000	90.5271	109.4729
	125.0	84.98316*	3.11446	.000	75.5102	94.4561
	200.0	56.43098*	3.11446	.000	46.9581	65.9039
	250.0	46.06061*	3.11446	.000	36.5877	55.5335
	300.0	38.18788*	3.11446	.000	28.7150	47.6608

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

