

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE AGRONOMÍA
POSTGRADO EN AGRONOMÍA
PROTECCIÓN VEGETAL**



EVALUACIÓN DE CEPAS DE *BOTRYTIS SPP.* Y SU CONTROL *IN VITRO* E *IN VIVO* CON INDUCTORES DE RESISTENCIA EN GERBERA (*Gerbera jamesonii* H. Bolus)

Ing^a. Agr^a. Teida Jesuana Hurtado M.

Maracay, 2014

NOTA DE PRESENTACION

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

Tabla de Contenido

Índice de Tablas	8
Índice de Figuras.....	10
Índice de Anexos.....	18
INTRODUCCIÓN.....	23
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
REVISIÓN DE LITERATURA.....	27
1.- Generalidades e Importancia del Cultivo	27
2.- Moho Gris ó Podredumbre Gris	28
2.1.- Importancia de la enfermedad.....	28
2.2.- Síntomas del moho gris ó podredumbre gris.....	33
3.- ETIOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN DE <i>BOTRYTIS</i>	40
4.- CICLO DE LA ENFERMEDAD Y EPIDEMIOLOGÍA.....	41
5.- PATOGÉNESIS. EFECTO DEL PATOGENO SOBRE LA PLANTA.....	45
6.- CONTROL DE LA ENFERMEDAD.....	47
6.1.- Control cultural o manejo de las prácticas agronómicas.....	48
6.2.- Control químico.....	49
6.3.- Control natural.....	55
6.4.- Control biológico.....	55
7.- INDUCTORES DE RESISTENCIA.....	59
7.1.- Generalidades de la inducción de la resistencia.....	59

7.2.- Micoorganismos como inductores de resistencia	66
7.3.- El Silicio.....	68
7.4.- Ácido Fosfórico.....	70
7.5.- Quitosano	71
MATERIALES Y MÉTODOS	74
1.- Muestreos de unidades de producción de ornamentales.	74
2.- Aislamientos e identificación de patógenos.	76
Descripción de los Síntomas.	76
Aislamientos del patógeno.....	76
Caracterización de las colonias.	77
3.- Pruebas de patogenicidad.....	77
4.- Sensibilidad a fungicidas.....	79
5.- Control In vitro de la cepa seleccionada de <i>Botrytis</i> con inductores de resistencia.	82
6.- Control In vivo de la cepa seleccionada de <i>Botrytis</i> con inductores de resistencia.	84
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
1.- Muestreo de fincas productoras de ornamentales de los estados Aragua y Miranda.	87
2.- SINTOMATOLOGÍA	92
2.1.- Sintomatología en Flores.....	92
⇒ Mancha Parda en los Pétalos:	93
⇒ Mancha Acuosa de los Pétalos:.....	95
⇒ Formación de la Tela:	96
⇒ Caída del Capítulo:	97

⇒ Deformación de la flor:	99
2.2.- Sintomatología foliar.....	101
⇒ Manchas blandas:	101
⇒ Manchas Pardas:	103
2.3.- Marchitez de la planta	104
3.- Características morfológicas de los aislamientos de <i>Botrytis sp.</i> Mediante observaciones macroscópicas y mediciones microscópicas.	108
4.- Colonias en medio de cultivo	118
4.1.- Características de las colonias en los medios de cultivo a los 7 días.	121
4.2.- Crecimiento de las colonias a los 20 días.	123
5.- PATOGENESIS.....	126
5.1.- Inoculación de sustratos.....	126
5.2.- Inoculación foliar.....	131
6.- Evaluación de la sensibilidad de las cepas de <i>Botrytis</i> a los principales fungicidas químicos utilizados por los productores.	142
7.- Ensayo de control <i>In Vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> , cepa Bot 05 aislada de gerbera (<i>Gerbera jamesonii</i>) con inductores de resistencia.....	160
8.- Ensayo de control <i>In Vivo</i> de <i>Botrytis cinerea</i> (Bot 05) aislada de gerbera (<i>Gerbera jamesonii</i>) con inductores de resistencia	170
CONCLUSIONES	194
RECOMENDACIONES.....	196
BIBLIOGRAFÍA	198
ANEXOS	215

Índice de Tablas

Descripción	Pág.
Tabla 1. Lista de ornamentales susceptible a <i>Botrytis Cinerea</i>	29
Tabla 2. Cultivos de ornamentales en los que se ha realizado estudios de diagnóstico de enfermedades fungosas en Venezuela.....	32
Tabla 3. Ingredientes activos de los principales fungicidas utilizados en el control de <i>B. cinerea</i> en algunas ornamentales y cultivos asociados a estos.....	50
Tabla 4. Ingredientes activos permitidos en Venezuela para el control de <i>B. cinerea</i>	51
Tabla 5.- Fungicidas seleccionados para la prueba de sensibilidad de cepas de <i>Botrytis</i> aisladas de ornamentales de los estados Aragua y Miranda.....	81
Tabla 6.- Inductores de resistencia seleccionados para la prueba de control <i>In vitro</i> de la cepa Bot 05 de <i>Botrytis</i>	83
Tabla 7. Inductores de resistencia seleccionados para la prueba de control <i>In vivo</i> de la cepa Bot 05 de <i>Botrytis</i>	86
Tabla 8. Porcentaje de Incidencia de <i>Botrytis sp.</i> obtenido en los muestreos efectuados en los estados Aragua y Miranda a partir de enero de 2008 hasta enero de 2011 en unidades de producción de ornamentales.	88
Tabla 9. Unidades de Producción Seleccionadas.....	90
Tabla 10. Datos de las estructuras de las cepas evaluadas directamente en el hospedante.....	110
Tabla 11. Comportamiento del crecimiento de las cepas en medio de cultivo P.D.A y A.V. con dos condiciones de luminosidad.....	120
Tabla 12. Comportamiento de las colonias a los 20 días de crecimiento.....	121

Descripción	Pág.
Tabla 13. Control <i>In vitro</i> de Bot 05 con los inductores de resistencia.....	162
Tabla 14. Evaluación de las variables agronómicas en el ensayo de control <i>In vivo</i> de Bot 05 con inductores de resistencia.....	174

Índice de Figuras

Descripción	Pág.
Figura 1. Porcentaje de germinación de conidios de <i>B. cinerea</i> en función del tiempo y de la temperatura (Bigre <i>et al.</i> , 1990).....	42
Figura 2. Curva de progreso de la enfermedad desde el enero de 2010 al enero de 2011 en las unidades de producción seleccionadas para el estudio de <i>Botrytis sp.</i> en ornamentales.....	91
Figura 3. Mancha parda de la flor: A-B: Manchas en forma de salpicadura; C: Quemado de las puntas y bordes de los pétalos; D-F: Mancha parda.....	93
Figura 4. Mancha parda de los pétalos con presencia de halo rojizo.....	94
Figura 5. Síntoma de la mancha acuosa de los Pétalos. A: Síntoma inicial en una flor sencilla; B: presencia del signo en una flor madura; C: Presencia del síntoma y signo en flor sencilla a punto de cosecha; D: Síntoma y signo en flor doble madura.....	95
Figura 6. Síntoma de la tela en flores. A: Flores en post cosecha; B: Síntoma de la macha parda y de la tela.....	96
Figura 7. A: Síntoma del capítulo caído; B: Estrés hídrico en la planta...	97
Figura 8. Pudrición de la base del capítulo. A: Sintomatología externa de la pudrición de la base del capítulo y deformación de los sépalos de la flor; B: Corte longitudinal del capítulo; C: Detalle del avance de la pudrición en el peciolo floral; D: Detalle de la pudrición en la base del capítulo y en las semillas y flores verdaderas; E: Signo de la enfermedad en semillas y flores colocadas en cámara húmeda.....	98
Figura 9. Detalle de los daños en los capítulos. A: Flor sana; B: Pudrición en la base del capítulo y daño en flores verdaderas y semillas, así como pétalos con la mancha parda.....	99

Descripción	Pág.
Figura 10. Deformación de las flores. A: Aplanamiento del capítulo; B: Apertura des uniforme de los pétalos; C: Deformación de los sépalos; D: Expansión de los pétalos hacia atrás; E-H: Presencia del signo de la enfermedad a partir de los 7 días después de la identificación en campo.....	100
Figura 11. Presencia de del síntoma de la deformación de la flor en el cultivo. A: Síntoma inicial; B: Síntoma a los 7 días.....	101
Figura 12. Manchas blandas en hojas banderas.....	102
Figura 13. Mancha parda foliar. A: Mancha momificada con el signo de la enfermedad sin halo; B: Mancha momificada con el signo de la enfermedad con el halo púrpura.....	104
Figura 14. Hojas con mancha parda colocadas en cámara húmeda. A: Detalle general; B: Formación de estructuras reproductivas de <i>Botrytis</i> ..	104
Figura 15. Síntomas de marchitez causada por <i>Botrytis sp.</i> en plantas de gerbera de pote. A: Síntoma de deficiencia y de la enfermedad; B: Planta con el signo en las hojas bajas.....	105
Figura 16. Síntoma de la marchitez causada por <i>Botrytis sp.</i> en plantas de gerbera. A: Presencia del signo en el ápice de la planta; B: Síntoma en los peciolo; C: Vista del cultivo.....	106
Figura 17. Detalle de la marchitez causada por <i>Botrytis sp.</i> A: Síntoma inicial; B: Síntoma más visible de la marchitez; C: Deterioro del tallo y raíces; D-E: Signo del patógeno en las raíces.....	108
Figura 18. Cepa Bot 01. A: micelio y Conidióforo; B: Forma de Conidios.....	111
Figura 19. Cepa Bot 02. A: Conidióforos en el tejido vegetal; B: Detalle de los tricomas.....	112
Figura 20. Cepa Bot 02. A: Detalle del la ramificación del conidióforo; B: Conidios.....	112

Descripción	Pág.
Figura 21. Cepa Bot 03. Germinación del conidióforo en el tejido vegeta...	113
Figura 22. Cepa Bot 03. A: Ramificación del conidióforo; B: Conidios.....	113
Figura 23. Cepa Bot 04. A: Grupo de micelios que conforman el estroma; B: Germinación del micelio.....	114
Figura 24. Cepa Bot 04. A: Conidióforo; B: Micelio; C: Diversidad de conidios presentes en la cepa.....	115
Figura 25. Cepa Bot 05. A: Micelio desarrollado internamente en el tejido; B: germinación del micelio en un radio de 368 μ ; C: base de los conidióforos.....	116
Figura 26. Cepa Bot 05. A: Conidióforos; B: Diversidad de formas de conidios.....	116
Figura 27. Crecimiento de las cepas en medio de cultivo PDA. A: Bot 01 en oscuridad; B: Bot 01 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; C: Bot 02 en oscuridad; D: Bot 02 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; E: Bot 03 en oscuridad; F: Bot 03 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; G: Bot 04 en oscuridad; H: Bot 04 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; I: Bot 05 en oscuridad; J: Bot 05 en 12 h luz/ 12 h oscuridad.....	122
Figura 28. Crecimiento de las cepas en medio de cultivo AAv. A: Bot 01 en oscuridad; B: Bot 01 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; C: Bot 02 en oscuridad; D: Bot 02 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; E: Bot 03 en oscuridad; F: Bot 03 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; G: Bot 04 en oscuridad; H: Bot 04 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; I: Bot 05 en oscuridad; J: Bot 05 en 12 h luz/ 12 h oscuridad.....	123
Figura 29. Colonias a los 45 días. A: Bot 01 envés de la capsula; B: Bot 01 detalle de los esclerocios; C: Bot 02 crecimiento de la colonia; D: Bot 02 detalle de los esclerocios; E -F: Bot 03 en PDA; G: Bot 03 forma de los esclerocios; H - I: Bot 04 en AAV; J-K: Bot 04 en PDA; L-M; Bot 05 en AAV; N-O: Bot 05 en PDA.....	125

Descripción	Pág.
Figura 30. Plantas de gerbera de maceta inoculadas con Bot 01. A: Síntoma a los 7 días; B: Planta a los 15 días; C: Planta inoculada y el Testigo.....	126
Figura 31. Plantas de gerbera de maceta inoculadas con Bot 02. A: Cambio del ángulo en la inserción de la hoja; B: Necrosamiento en la hojas bajas; C-D: Doblez de los ápices y tallo floral.....	127
Figura 32. Plantas de gerbera de maceta inoculadas con Bot 03. A: Plata a los 7 ddi; B-D: Planta a los 18 ddi.....	128
Figura 33. Plantas de gerbera en maceta inoculadas con Bot 04. A - B: Necrosis en hojas bajas; C: Doblez del ápice de las hojas y presencia de la pudrición blanda; D: Planta inoculada a los 10 días; E: Comparación entre las plantas inoculadas y el testigo.....	129
Figura 34. Plantas de gerbera en maceta inoculadas con Bot 05. A: Amarillamiento de las hojas; B: Necrosis de los peciolo; C: Doblez de las hojas; D: Muerte de las plantas.....	130
Figura 35: Plantas de gerbera de maceta con inoculación foliar de Bot 01. A: Presencia de micelio en el capítulo. B: Caída del capítulo; C-D: Manchas foliares; E-F: Signo de la enfermedad.....	132
Figura 36. Plantas de gerbera de maceta con inoculación foliar de Bot 02. A-B: Síntoma en la flor; C-D: Síntoma en la hoja; E-F: Presencia del signo en los tejidos vegetales en putrefacción.....	133
Figura 37. Plantas de Gerbera de maceta con inoculación foliar de Bot 03. A: Síntoma en la flor; B: Pudrición de hojas bajas; C-D: Manchas foliares necróticas con halo verde claro; E-F: Pudrición blanda con el signo de la enfermedad; G-H: Presencia del micelio en tejidos en putrefacción.....	135
Figura 38. Plantas de gerbera de maceta con inoculación foliar de Bot 04. A: Decoloración en los pétalos de la flor; B: Doblez del ápice y cambio del ángulo de inserción de la hoja; C: Mancha foliar desde el borde de la hoja; D-E: Mancha parda acuosa desde la base del peciolo; F: Mancha parda con halo amarillento.....	137

Descripción	Pág.
Figura 39. Plantas de gerbera en maceta con inoculación foliar de Bot 05. A: Primer síntoma foliar; B–C: Síntoma en los capítulos; D: Evidencia del signo de la enfermedad; E: Formación de Agregados.....	139
Figura 40. Evaluación del crecimiento miceliar de Bot 01 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	143
Figura 41. Características de la colonia Bot 01 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 200 ppm; B: Benomilo a 100 ppm; C–D: Iprodione a 5 ppm; E: Clorotalonil a 100 ppm; F: Testigo.....	144
Figura 42. Evaluación de la germinación de conidios de Bot 01 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	145
Figura 43. Evaluación del crecimiento miceliar de Bot 02 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	146
Figura 44. Características de la colonia Bot 02 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 5 ppm; B: Iprodione 2 ppm; C: Clorotalonil a 5 ppm; D: Testigo.....	147
Figura 45. Evaluación de la germinación de conidios de Bot 02 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	148
Figura 46. Evaluación del crecimiento miceliar de Bot 03 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	149
Figura 47. Características de la colonia Bot 03 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 5 ppm; B: Iprodione 5 ppm; C: Clorotalonil a 10 ppm; D: Testigo.....	150

Descripción	Pág.
Figura 48. Evaluación de la germinación de conidios de Bot 03 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	151
Figura 49. Evaluación del crecimiento miceliar de Bot 04 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	152
Figura 50. Características de la colonia Bot 04 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 10 ppm; B: Benomilo 5 ppm; C: Carbendacin a 0,5 ppm; D-E: Clorotalonil 5 ppm; F: Iprodione; G: Testigo.....	153
Figura 51. Evaluación de la germinación de conidios de Bot 04 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	154
Figura 52. Evaluación del crecimiento miceliar de Bot 05 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	155
Figura 53. Características de la colonia Bot 05 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 10 ppm; B: Benomilo 200 ppm; C: Iprodione 2 ppm; D: Testigo.....	156
Figura 54. Evaluación de la germinación de conidios de Bot 05 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	157
Figura 55. Evaluación de la germinación de conidias de las cepas de <i>Botrytis cinerea</i> a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil con ocho dosis diferentes.....	158
Figura 56. Evaluación <i>In vitro</i> al 3 ^{er} día. A: Enfrentamiento con <i>Trichoderma</i> (Tricobiol); B: Enfrentamiento con mezclas de <i>Trichoderma</i> (Trico Plus A).....	165

Descripción	Pág.
Figura 57. Ensayo <i>In vitro</i> al 3 ^{er} día. A: Quitosano + <i>Trichoderma</i> (Biorend 8 ml + Tricobiol); B: Silicio + <i>Trichoderma</i> (Quick sol 3 ml + Tricobiol); C: Ácido fosfórico + mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos 5 ml+ Trico Plus A); D: Ácido fosfórico + mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos 3 ml + Trico Plus A); E: Silicio + mezcla de <i>Trichoderma</i> (Quick sol 2 ml + Trico Plus A); F: Quitosano + mezcla de <i>Trichoderma</i> (Biorend 10 ml + Trico Plus A).....	165
Figura 58. Comportamiento del patógeno ante las dosis más altas de Quitosano (Biorend) y el enfrentamiento con las cepas comerciales de <i>Trichoderma</i> . A: Enfrentamiento con <i>Trichoderma</i> (Tricobiol); B: Enfrentamiento con mezcla de <i>Trichoderma</i> (Trico Plus A).....	166
Figura 59. Comparación del enfrentamiento de <i>Trichoderma</i> con Bot 05. A: Bot 05 + Tricobiol; B: Bot 05 + Trico Plus A.....	167
Figura 60. Los mejores tratamientos en el control <i>In vitro</i> de Bot 05. A: <i>Trichoderma</i> (Tricobiol); B: Silicio + <i>Trichoderma</i> (Quick sol 3 ml/l + Tricobiol); C: Ácido fosfórico + mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos 3 ml/l + Trico Plus A); D: Quitosano + <i>Trichoderma</i> (Biorend 8 ml/l + Tricobiol)...	168
Figura 61. Control de Bot 05 con <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Hojas bajas y bandera con los síntomas; Detalle de las manchas foliares.....	175
Figura 62. Control de Bot 05 con Ácido Fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos 3 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Hojas bajas y bandera.....	176
Figura 63. Control de Bot 05 con Silicio + <i>Trichoderma</i> (Quick sol 3 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Mancha foliar con halo amarillento; C: Vista de hojas bajas; C: mancha necrótica.....	177
Figura 64. Control de Bot 05 con Quitosano + <i>Trichoderma</i> (Biorend 8 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Mancha foliar; C: Vista de hojas bajas.....	178
Figura 65. Control de Bot 05 con Ácido Fosfórico + <i>Trichoderma</i> (Agrifos 5 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Mancha foliar; C: Vista de hojas bajas.....	179

Descripción	Pág.
Figura 66. Control de Bot 05 con Quitosano + <i>Trichoderma</i> (Biorend 10 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Mancha foliar con halo amarillento y signo de la enfermedad; C: Vista de hojas bajas.....	180
Figura 67. Control de Bot 05 con Silicio + <i>Trichoderma</i> (Quick sol 2 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Vista de hojas bajas; C-D: Detalle de las manchas foliares.....	181
Figura 68. Control de Bot 05 con Ácido Fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos 5 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de los tricomas en las hojas ; C: Vista de hojas bajas; D: Manchas foliares.....	182
Figura 69. Control de Bot 05 con Ácido Fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos 7 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas bajas.....	183
Figura 70. Control de Bot 05 con Quitosano + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Biorend 8 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas bajas.....	184
Figura 71. Control de Bot 05 con Quitosano + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Biorend 10 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas afectadas.....	185
Figura 72. Control de Bot 05 con Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas afectadas.....	186
Figura 73. Control de Bot 05 con Silicio + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Quick sol 3 ml/l +Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas afectadas.....	187
Figura 74. Control de Bot 05 con Silicio + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Quick sol 5 ml/l +Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas afectadas.....	188

Descripción	Pág.
Figura 75. Testigo del ensayo de Control <i>In vivo</i> de Bot 05. A -B: Plantas de gerbera culminado el ensayo; C: Vista de hojas afectadas.....	189

Índice de Anexos

Descripción	Pág.
Anexo 1. Esquema de los tratamientos en el ensayo de control <i>In vivo</i> de Bot 05 con los inductores de resistencia.....	215
Anexo 2. Muestreos realizados desde enero del 2008 hasta enero del 2011, para la obtención de las cepas de <i>Botrytis sp.</i>	216
Anexo 3. Unidades de Producción muestreadas desde enero del 2008 a diciembre 2010.....	219
Anexo 4. Análisis Descriptivo del Muestreo.....	220
Anexo 5. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 01 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	221
Anexo 6. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 02 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	223
Anexo 7. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 03 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	225
Anexo 8. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 04a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	227
Anexo 9. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 05 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.....	229
Anexo 10. Detalle del control <i>In vitro</i> de Bot 05 con los tratamientos de Ácidos fosfóricos (Agrifos). A: Agrifos 3 ml/l; B: Agrifos 5 ml/l; C: Agrifos 7 ml/l.....	231
Anexo 11. Detalle del control <i>In vitro</i> de Bot 05 con los tratamientos de Quitosano (Biorend). A: Biorend 8 ml/l; B: Biorend 10 ml/l; C: Biorend 12 ml/l.....	231

Descripción	Pág.
Anexo 12. Detalle del control <i>In vitro</i> de Bot 05 con los tratamientos de Silicio (Quick sol). A: Quick sol 2 ml/l; B: Quick sol 3 ml/l; C: Quick sol 5 ml/l.....	231
Anexo 13. Detalle del control <i>In vitro</i> de Bot 05 con los tratamientos de ácido fosfórico + <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Tricobiol). A: Agrifos 3 ml/l + Tricobiol; B: Agrifos 5 ml/l + Tricobiol; C: Agrifos 7 ml/l + Tricobiol.....	231
Anexo 14. Detalle del control <i>In vitro</i> de Bot 05 con los tratamientos de Quitosano + <i>Trichoderma</i> (Biorend + Tricobiol). A: Biorend 8 ml/l + Tricobiol; B: Biorend 10 ml/l + Tricobiol; C: Biorend 12 ml/l + Tricobiol.....	232
Anexo 15. Detalle del control <i>In vitro</i> de Bot 05 con los tratamientos de Silicio + <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Tricobiol). A: Quick sol 2 ml/l + Tricobiol; B: Quick sol 3 ml/l + Tricobiol; C: Quick sol 5 ml/l + Tricobiol.....	232
Anexo 16. Detalle del control <i>In vitro</i> de Bot 05 con Ácido fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Trico Plus A). A: Agrifos 3 ml/l + Trico Plus A; B: Agrifos 5 ml/l + Trico Plus A; C: Agrifos 7 ml/l + Trico Plus A.....	232
Anexo 17. Detalle del control <i>In vitro</i> de Bot 05 con Quitosano + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Biorend + Trico Plus A). A: Biorend 8 ml/l + Trico Plus A; B: Biorend 10 ml/l + Trico Plus A; C: Biorend 12 ml/l + Trico Plus A.....	233
Anexo 18. Detalle del control <i>In vitro</i> de Bot 05 con Silicio + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Trico Plus A). A: Quick sol 2 ml/l + Trico Plus A; B: Quick sol 3 ml/l + Trico Plus A; C: Quick sol 5 ml/l + Trico Plus A.....	233

RESUMEN

En Venezuela la producción de ornamentales es diversa y uno de los cultivos destacados es Gerbera (*Gerbera jamesonii* H.B.) como flor de corte y de pote; la cuál presenta diversos problemas con enfermedades fungosas. Es por ello la necesidad de realizar una evaluación de diferentes cepas de *Botrytis* y su control *In vitro* e *In vivo* con inductores de resistencia, realizándose muestreos estratificados con 10 muestras por unidad de producción en los estados Aragua y Miranda; las cuales fueron llevadas a Expertabiol UCV-Maracay, realizándose la descripción de los síntomas; aislamiento del patógeno en PDA ac.; caracterización morfológica de las colonias en PDA ac y AAV con alternancia de luz y oscuridad total; pruebas de patogénesis con inoculación del cuello de la planta y parte aérea con cada una de las cepas seleccionadas; prueba de sensibilidad a los fungicidas Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a 0,5; 2; 5; 10; 100; 200; 500 y 1000 ppm de i.a.; posteriormente se efectuó el control *In vitro* con los inductores de resistencia, siendo estos Ácido fosfórico; Quitosano; Silicio; *Trichoderma harzianum*; mezcla de *Trichodermas* y la combinación de estos; y el control *In vivo* se realizó en plantas sanas de gerbera de pote. Se efectuaron 160 muestreos seleccionándose 5 cepas (Bot 01; Bot 02; Bot 03; Bot 04 y Bot 05), de las unidades de producción que presentaron la enfermedad en distintas épocas del año, identificándose síntomas en las flores; manchas foliares y marchitez o podredumbre de la planta. El patógeno encontrado fue *Botrytis cinerea* Pers. La inoculación foliar la metodología más apropiada. La cepa Bot 05 resultó ser la más agresiva con necrosamiento de tejido y signo del patógeno a las 72 h después de la inoculación. Todas las cepas presentaron poca sensibilidad a Azoxystrobin; En el control *In vitro* los mejores tratamientos fueron *Trichoderma* 40,74 %; Ácido fosforoso 3 ml/l + Mezcla de *Trichoderma* 39,72 % y Silicio a 3 ml/l + *Trichoderma* 39,17. En el control *In vivo* el mejor tratamiento fue Silicio 5 ml/l + Mezcla de *Trichoderma*.

Palabras Claves: Gerbera; *Botrytis*; Epidemiología; Sensibilidad; Control; Inductores de resistencia

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, la producción de los rubros de ornamentales, conforman un mercado incipiente de importantes proyecciones, por su rentabilidad, adaptabilidad de muchos cultivos a las condiciones agroclimáticas de las zonas productoras y por la cantidad de mano de obra que se requiere para la obtención del producto final (Flores de corte o de pote) Hurtado, (2004).

Las principales zona productoras son: la región andina conformada por los estados Mérida, Táchira y Trujillo; y en la región central por los estados Aragua, Carabobo, Miranda y Vargas. Presentando unidades de producción de bajo, mediano y alto nivel de tecnología, donde los cultivos de mayor superficie son rosas (*Rosa sp.*), crisantemos (*Chrysanthemum morifolium* = *Dendranthema morifolium*), aster (Áster) y solidaster (*Solidaster luteus*), sin embargo se puede encontrar cultivos como gerbera (*Gerbera jamesonii*) y bulbos como el liliun (*Lilium candidum*), gladiolo (*Gladiolus spp*), tulipán (*Tulipa spp*); que por condiciones de mercado y de tecnología se hacen rentables a pesar de la poca superficie cultivada. En la producción de flores bajo condiciones controladas y con alta tecnología (invernaderos), se presentan problemas fitopatológicos importantes que afectan la producción y calidad de flores (Castaño *et al.*, 2007). Dentro de la gran gama de inconvenientes que presentan los floricultores se puede considerar que los problemas fitosanitarios juegan un papel importante, destacándose entre ellos los daños ocasionados por trips, mosca blanca, áfidos, ácaros y entre los patógenos se destacan la

podredumbre gris ó moho gris, royas, mildiú, oidium, pudriciones radicales y nematodos.

En un estudio realizado por Vargas *et al.*, 1989 en rosas en la región central del país, señalaron que de las especie de flores de corte estudiadas se detectaron 11 hongos, entre los cuales *Botrytis cinerea*, *Oidium sp* y *Pestalotia* causaron los daños más severos. De igual manera diversos autores (Bigre *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1992; Bañon *et al.*, 1993; Agrios, 1997; Rondon, 2001), señalan a *Botryotinia fuckeliana* De Bary (Whetzel), quien en su estado anamorfo es *Botrytis cinerea* Pers.; como la principal enfermedad en ornamentales por los daños causados en una gran gama de hospederos en pre y post cosecha. El desarrollo del hongo con carácter epifítico depende de complejas interacciones entre factores ambientales y bióticos. Entre estos tiene especial importancia el desarrollo estacional de muchos de los cultivos; la potencialidad, liberación y dispersión del inóculo, así como también los fenómenos de penetración e infección del hongo (Lisboa, 2003; Castaño *et al.*, 2007).

A nivel internacional se presentan diversas estrategias para el control de la enfermedad en cultivos a campo abierto (vid, frutales, hortalizas, rosas, girasol), o cultivos protegidos como es el caso de alguna de las ornamentales y hortalizas). En los últimos años, han aparecido nuevas moléculas con actividad contra este hongo, las cuales están siendo evaluadas y utilizadas, sin embargo el uso de estos productos está limitado por las normas de tolerancia o límite máximo de residuos

permitidos por los países, lo que reduce en muchas ocasiones las posibilidades de su uso (Agrios, 1997).

En vista de que este problema se presenta con alta incidencia en Venezuela y cada vez las pérdidas son mayores, además de no existir estudio sobre la caracterización de las cepas de *Botrytis* aisladas de ornamentales, así como de su control *In vitro* ó *In vivo* y las posibilidades de la existencia de resistencia o alta susceptibilidad a los productos químicos, se plantea este estudio mediante la utilización de inductores de resistencia con el objetivo de establecer la evaluación de diferentes cepas de *Botrytis* y su control *In vitro* e *In vivo* con inductores de resistencia en Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus), como una alternativa de control.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la evaluación de diferentes cepas de *Botrytis* y su control *In vitro* e *In vivo* con inductores de resistencia en Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ⇒ Realizar los muestreos en fincas productoras de ornamentales en los estados Aragua y Miranda.
- ⇒ Caracterizar morfológicamente los aislamientos de *Botrytis sp.* Mediante observaciones macroscópicas y mediciones microscópicas.
- ⇒ Evaluar la sensibilidad de las cepas de *Botrytis sp.* a los principales fungicidas químicos utilizados por los productores.
- ⇒ Evaluar el control de la cepa de *Botrytis cinerea* a nivel *In vitro* con los inductores de resistencia.
- ⇒ Evaluar el control de la cepa de *Botrytis cinerea* a nivel *In vivo* en plantas de maceta de Gerbera (*Gerbera jamesonii*) con los inductores de resistencia.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.- Generalidades e Importancia del Cultivo

El Género de Gerbera presenta más de 50 especies, siendo la gran mayoría de éstas de origen africano. El descubrimiento fue realizado en el siglo XVIII por el naturalista holandés Grenovius, pero es a los hermanos Gerber (Botánicos alemanes) a quienes se les debe el nombre. Es una planta herbácea, perteneciente a la familia de las Asteraceas (Compuestas). Su cultivo puede durar varios años, sin embargo cuando este es de forma comercial sólo se interesa durante 2 a 3 años. Presenta como características morfológicas un tallo rizomático; hojas alternas con tricomas, las cuales varían de forma y tamaño según el híbrido o color de las flores. (Oszkinis y Lisiecka, 1990; Bañon *et al.*, 1993).

El cultivo de flores de corte o de maceta de gerbera, se ha incrementado en las últimas décadas especialmente por el gran colorido y variedades de la especie, así como por su duración en postcosecha y su versatilidad para realizar arreglos florales (www.infoagro.com (2001); Ocampo, 2001; Vidale, 1992). Esto implica que los mejoradores genéticos trabajen principalmente en estas características, dejando a un lado la resistencia de los cultivos a las plagas y enfermedades (Oszkinis y Lisiecka, 1990; Rogers y Tjia, 1990; Bañon *et al.*, 1993; Ocampo, 2001).

En nuestro país, el cultivo fue introducido en la década de los 90, siendo los primeros productores: Finca La Noguera, Floralex Continental y Culflor (Brito, 2001). En el caso específico de Floralex Continental C.A., exportaba hasta principios del 2000 el 85 % de su producción a los Estados Unidos (Floralex Continental, 2002); en vista de la rentabilidad del cultivo, el incremento de la superficie sembrada para el año 2008 es de unas 35 hectáreas a nivel nacional, donde se estima una población de 210.000 plantas, las cuales bajo un buen manejo agronómico y de control de plagas y enfermedades deberían producir aproximadamente 420.000 flores al mes, generando un movimiento nacional de 700.000 BsF. Siendo los principales estados productores Miranda y Mérida con 20 y 10 hectáreas respectivamente, y al cuantificar la inversión para el año 2008 en una superficie de 2.500 m² el costo de las plántulas es de 90.000 BsF. A pesar de las proyecciones e inversiones el cultivo presenta problemas fitosanitarios donde se destacan en la actualidad los ataques de ácaros; moho gris; mildiú y exceso de sales, los cuales hacen que los niveles de producción esperados no se alcancen (ASOFLORMI, 2009).

2.- Moho Gris ó Podredumbre Gris

2.1.- Importancia de la enfermedad.

En un estudio efectuado por 495 científicos, Di Prieto, (2012) señala que en la lista de los hongos más dañinos del planeta encontramos encabezando el tizón del arroz por *Magnaporthe oryzae* y el moho gris por *Botrytis cinerea*. La relevancia de esta enfermedad se puede evidenciar en la gran cantidad de cultivos que afecta, principalmente en los rubros de

hortalizas, frutales, forestales y las ornamentales; y su amplio rango de hospederos (**Tabla 1**), hace que su control sea de gran dificultad para los productores. Los daños se presentan desde el momento de la propagación (semillas, semilleros, esquejes), crecimiento y tutoraje o conducción de los cultivos, en floración o venta (floricultura e pote), y en post cosecha (cavas refrigeradoras o en el transporte).

Tabla 1. Lista de ornamentales susceptible a *Botrytis cinerea*

ageratum	Chrysanthemum	foxglove	monkey	Ruellia
alexanders	cineraria	fuchsia	marigold	saxifrage
allium	clematis	gardenia	mertensia	sedum
alpinea	climbing beauty	gentian	narcissus	senecio
amaryllis	colchicum	geranium,	nasturtium	snapdragon
anemone	coleus	gerbera	orquideas	snowball
angelica	columbine coreopsis	gladiolus	oysterplant	snowdrop
arabis	cranesbill	globe-amaranth	oxalis	statice
arborvitae	cryptanthus	gloxinia	pensamiento	stephanotis
aster	cuphea	gynura	parthenium	stock
aster China	cyclamen	gypsophila	penstemon	stokesia
azalea	cytisus	heather	peony	sumac
breath Bebés	dahlia	heliotrope	peperomia	sunflower
begonia	daisies	heuchera	pepper, Christmas	sunrose
bellflower	delphinium	hibiscus honeysuckle	philodendron	thyme
caladium	dracaena	hyacinth	phlox	tobacco, flowering
calathea	Dutchman's- pipe	hydrangea	pinks	toadflax
calceolaria	epilobium	impatiens	poinsettia	tradescantia
calendula	erigeron	Indian paint	poppy	Transvaal daisy
California poppy	erythronium	iris	pothos	tuberose
cala	euonymus	kalanchöe	primrose	tulipan
lirio calla	eupatorium	larkspur	Pyracantha	verbena
calthus	evening-primrose	lilac	pyrethrum	viburnum
camassia	exacum	lilies	pyrola	vinca
camellia	ferns	lobelia	rhododendron	violeta
candytuft	firecracker	lupine	rhoea	Violeta Africana
Cape marigold	lirio flamingo	magnolia	rosas	wallflower
carnation	flowering	Maltese cross	lirio amazon planta de	wormwood
century				zinnia

Fuente: Pataky, (1997)

En la producción de ornamentales a nivel mundial se estima entre 1 - 3 % de pérdidas por esta enfermedad, siendo uno de los principales problemas del manejo de la enfermedad por la gran gama de hospederos, así como la resistencia que ha presentado a varios fungicidas de uso común de los productores. Smith *et al.*, 1992, señalan que las pérdidas se deben a muerte de plántulas, muerte de partes vegetales por encima de las lesiones de tallo y a la destrucción de frutos, que a menudo se considera como la causa de pérdidas más importantes. El hongo puede extenderse con rapidez en una amplia gama de temperaturas, incluso en almacenes refrigerados. En Europa se considera la mayor causa de pérdidas en invernaderos.

Calderón y Restrepo, (2001), en cultivo hidropónico de flores en Colombia, Ecuador y Holanda señalan que en estos países los problemas fitosanitarios son mínimos, sin embargo la podredumbre gris por *Botrytis* es un problema severo en el Ecuador. Cuando se presentan enfermedades, las plantas afectadas se retiran del invernadero y se llevan a una zona de cuarentena donde son tratadas y una vez sanas retornan a su lugar de origen. Los síntomas aparecen principalmente en forma de tizones en las inflorescencias, pudriciones foliares, canchales, o pudriciones del tallo, ahogamiento de plántulas y como pudriciones de tubérculos, cormos, bulbos y raíces (Agrios, 1997).

En Venezuela se han realizados diagnósticos de las principales enfermedades en algunas ornamentales (**Tabla 2**), siendo *Botrytis* el patógeno más común. Los daños se evidencian en los tallos, hojas y

flores; generando pérdidas en pre y post cosecha, sobre todo de aquellas especies que deben mantenerse bajo refrigeración. En el caso particular de Poinsettia los efectos se evidencian al final del ciclo cuando se termina el cambio de color de las hojas, generando para el año 2006, un aumento de las pérdidas del 2 al 5 % en los Altos Mirandinos (ASOCOFLOMI, 2009). Sin embargo a pesar de esta problemática no se ha realizado ningún estudio de caracterización de las cepas por regiones, ni se ha investigado la resistencia o tolerancia a los fungicidas de mayor utilización por los productores, de igual manera no se utiliza el control natural, ni biológico para minimizar los efectos.

Garcés y Orozco, (2007) señalan al moho gris, como una de las enfermedades que produce grandes pérdidas para el sector floricultor y hace que se incremente el uso de productos químicos que contaminan el ambiente y afectan la calidad de vida del hombre. Siendo las altas frecuencias de aplicaciones en la época de lluvias, ya que la alta humedad relativa tanto diurna como nocturna, sumada a las temperaturas relativamente altas durante el día, provocan la germinación de las esporas y un desarrollo rápido del hongo el cual puede ser de muy difícil control, debido a que muchas especies de *Botrytis* secretan enzimas pectolíticas y otras enzimas que degradan las paredes celulares, facilitando de esta manera la invasión del patógeno a los tejidos de la planta.

Tabla 2. Cultivos de ornamentales en los que se ha realizado estudios de diagnóstico de enfermedades fúngicas en Venezuela.

Cultivo	Patógenos	Autores
Ornamentales	<i>Sphaerotheca fulinea</i> , <i>Phyllactinia</i> sp., <i>Erysiphe cichoracearum</i> , <i>Uncinula</i> <i>astraliana</i> , <i>Ovulariopsis</i> sp., <i>Erysiphe</i> <i>poligoni</i> ; <i>Sphaerotheca pannosa</i> , <i>Microsphaera polonica</i> .	Sanabria, 1988
Aster	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Moreno, 2003
	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Centeno y Ojeda, 1998
Ave del paraíso	<i>Alternaria alternata</i> , <i>gloesporium musarum</i> , <i>Glomorella cingulata</i> , <i>Phomopsis</i> sp, <i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>Phyllosticta musae</i> .	Madriz et al., 1991
Bromelia	<i>Drechslea</i> sp.	Díaz y Longa. 2006
Cala	<i>Fusarium solani</i>	Álvarez, 1995
	<i>Phytophthora</i> sp.	Marín, 2002
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Pérez, 2004
Clavel	<i>Heterosporium echinulatum</i> , Botrytis cinerea , <i>Uromyces cariophyllinus</i> , <i>Fusarium</i> sp	Acevedo y Moreno, 2001
Crisantemo Tipo Pompón	<i>Puccinia horiana</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>chrysanthemy</i>	Acevedo y Moreno, 2001
Crisantemo	<i>Puccinia horiana</i>	Varela, 1995
Gerbera	<i>Phytophthora cryptogea</i> y <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	Hurtado y Subero, 2003
	Botrytis sp., <i>Alternaria alternata</i> <i>Cercospora</i> sp	Hurtado et al., 2001 Pulido, 2004
Gladiolo	<i>Fusarium</i> sp	Ferreira y Sanabria, 1991
Heliconias	<i>Myrothecium</i> sp.	Escalona, et al., 1992
Papagayo	<i>Fusarium solani</i>	Santaella et al., 1999
Rosa	<i>Cercospora rosicola</i>	Marcano, 1980
	Botrytis	Vargas et al., 1988
	<i>Fusarium</i> sp.	Basso, 1988
	Botrytis cinerea , <i>Oidium</i> sp y <i>Pestalotia</i>	Vargas et al., 1989.
	<i>Fusarium solani</i>	Sosa, 1992

2.2.- Síntomas del moho gris ó podredumbre gris

Por la gran diversidad de especies pertenecientes a este rubro existen diversos síntomas que se manifiestan en las plantas, sin embargo la gran mayoría de los investigadores concuerdan que el hongo es capaz de producir sobre su hospedero una podredumbre húmeda con presencia en muchos casos de un micelio gris, de allí el nombre de la enfermedad. Bigre *et al.*, 1990 mencionan que sobre las plantas ornamentales se evidencian dos tipos clásicos de síntoma de *Botrytis*, describiéndose a continuación:

Enfermedad de la tela: Se observa frecuentemente sobre el mantillo del sustrato, invernaderos, etc. Sobre las plantas jóvenes donde son cultivadas, un revestimiento muy suelto y extendido, conduciendo a la desecación y la muerte de plantas jóvenes puede ocurrir rápidamente, esta tela representa el único micelio de *B. fuckeliana* constituido por hifas blanco- grisáceas, de diámetro variable y tiene una extensión rápida.

Podredumbre gris: Esta enfermedad afecta a numerosos huéspedes. La mecanización de los cultivos es la fuente de aumento de daños debido a las heridas ocasionada por las maquinas y los restos de tejido dejados *In situ* (caso específico del cultivo de gladiolo). Su característica principal es la presencia de un moho de color grisáceo.

Bañon *et al.*, (1993), señalan diversas características de los síntomas según el cultivo, así como en rosas puede afectar a tallos jóvenes y adultos ocasionando lesiones de color pardo y necrosis en ellos. En los botones con diferencia de grados de apertura aparecen pequeñas

manchas rojo – púrpura, posteriormente el micelio y las estructuras de propagación del hongo, cubren toda la flor observándose en este caso una masa pulverulenta gris, el ataque puede ser en cámara de almacenamiento. Los botones infectados generalmente no se abren, aunque tampoco se inclinan. En un principio, las flores abiertas presentan manchas en los pétalos, con tonalidades rojizas y de forma circular. Las hojas infectadas se tornan pardas y se marchitan. La infección afecta con mayor frecuencia a los extremos cortados de los tallos y los troncos. El hongo se puede extender rápidamente hacia la parte baja del tronco ennegreciéndolo y afectando las yemas (Vidale, 1992; Castaño *et al.*, 2007).

Williams-Woodward, (2007) señala que en geranio, el hongo infecta al follaje y las flores senescentes primero y puede entonces moverse en tejidos finos sanos. Las hojas que se marchitan primero muestran síntomas diversos, con manchas de color marrón, áreas humedecidas, las cuales comienzan en los márgenes de las mismas. Estas áreas descoloradas pronto adquieren un aspecto dividido en zonas, angular con las porciones más anchas. Las flores también se pueden infectar por *Botrytis*, y cuando estas son afectadas pueden tener manchas minúsculas de la decoloración o ser marchitadas totalmente. Los pétalos afectados pierden su tonalidad y se secan, pero pueden mantenerse juntos. Cuando estos pétalos se caen sobre las hojas sanas sirven como fuente de inóculo para las infecciones de la hoja. Las infecciones severas del vástago ocasiona la muerte de la planta en un período del tiempo corto.

En otros cultivos como la Hortensia, esta enfermedad es muy frecuente y grave, los síntomas en las hojas son manchas grises que comienzan por el borde del limbo, los tallos son frecuentemente afectados en las cicatrices foliares. Las flores se desecan afectando diversas partes de la flor sobre todo en las yemas florales. En poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) la podredumbre se presenta sobre todo en los esquejes y en el comienzo del oscurecimiento del cultivo. En ciclamen (*Cyclamen persicum*) se presenta un desarrollo rápido, sobre todo en a finales de año, pudiendo producir la podredumbre del corazón de la planta, en las hojas y las flores se abaten en el borde del envase o matero, también ocasiona en otras épocas del año, manchas solo en las flores y los síntomas se asemejan bastante a los causados por *Rhizoctonia solani*. Por otra parte en las violeta, begonia, orquídeas, crisantemos generalmente son afectadas al final de la vegetación o inicio de floración (Vidale, 1992).

Bigre *et al.*, 1990 señalan que en los bulbos actúan diferentes especies de *Botrytis* tales como: *cinerea*, *tulipae* y *gladiolorum*. Estos son a veces llamados fuego por que las hojas resultan quemadas sin aparición de enmohecimiento gris. En muchas ocasiones en la escamas se puede evidenciar la presencia de los esclerocios. Los brotes afectados son deteriorados y en una planta invadida por el hongo se considera como un foco para el cultivo. En las hojas las manchas son a veces impropriadamente llamadas royas. La enfermedad progresa a lo largo del tallo hasta el bulbo pudiendo provocar una necrosis muy profunda de aspecto esponjoso. Los ataques de este patógeno son más frecuentes en gladiolos que en otros tipos de bulbos tales como los lillium y los tulipanes. En los Lillium se puede encontrar a *B. elliptica* y *B. cinerea*, en todos los órganos aéreos

de la planta, comenzado por una serie de punteaduras de color gris pardo o naranja oscuro, llegando a formar manchas de 1 - 2 cm de forma redondeada o elíptica con el perímetro muy pronunciado a modo de anillos con tonalidades anaranjadas. La superficie del tejido limitada por el anillo visible tanto por el haz como por el envés de la hoja, las cuales se degradan poco a poco, se arrugan, se deshidratan y mueren quedando como una especie de porción de papel, cuando los botones son infectados en sus primeras fases de desarrollo, generalmente son afectados los que se sitúan externamente en la inflorescencia, pero si la enfermedad aparece posteriormente en los pétalos aparece una serie de punteaduras similares a las viruelas de color gris y al tacto presenta una podredumbre blanda. (O'Neill y McQuicken, 2005; Alvarez *et al.*, 2003). Como el liliun es un cultivo nuevo en Venezuela, de allí la importancia de conocer los síntomas de la enfermedad en diversos hospederos y en otros países.

Cabrera *et al.*, 2003; señalan que otro aspecto de daños sobre flores es el picoteado o punteado, en el cual se forma unas pequeñas manchas o lesiones pardas de forma alargada uniformes que se distribuyen sobre los pétalos y son más evidentes sobre las flores de color claro. Este fenómeno se considera como una hipersensibilidad de los tejidos a la infección de *Botrytis* en cada lesión corresponde a un punto de infección, el hongo se encuentra a continuación del bloqueo en algunas células infectadas. En *stative* (*Limonium sinuatum*) provoca podredumbres blandas de color grisáceo y de gran incidencia en cultivos bajo plástico. Las heridas de las hojas desarrollan muchas veces un diseño zonado. Los pétalos de la flor pueden tener pequeñas manchas o se marchitan completamente. Los tallos pueden debilitarse progresivamente por las

heridas del esqueje o desarrollar canchales de color pardo a marrón que se originan en la base de los pecíolos de las hojas marchitas. Las hojas en las plantas de semillero suelen morir y se cubren con el moho gris. Las flores se decoloran y se marchitan. El tallo entero de la flor puede tornarse de color amarillo y morir. En la etapa de propagación, las hojas de plántulas jóvenes pueden verse totalmente afectadas por el hongo y de esta forma la enfermedad llega al campo. Si el ataque se da en plantas viejas se puede provocar una pudrición seca de la corona. (<http://www.infoagro.com> (2001); O'Neill y McQuicken, (2005).

En gerbera, los síntomas se inician sobre el material viejo y en descomposición produciéndose daños importantes. El micelio es gris y acompañado por pudriciones blandas, cuando afecta a las lígulas se denota la formación de pequeñas manchas grisáceas sobre la superficie (Bañón *et al.*, 1993), Mientras que Oszkinis y Lisiecka, (1990) señalan que el hongo invade la base del tallo justo donde se forman los pecíolos de las hojas y las inflorescencias. En los lugares afectados por este patógeno los tejidos se vuelven acuosos, comienzan a desintegrarse y se cubren con un moho gris, ocasionando la marchitez de las hojas y los pecíolos. Los botones florales infectados no se desarrollan totalmente y en su superficie aparecen una capa gris del hongo. También pueden ser infectadas las semillas de gerbera, las cuales contribuyen a la propagación de la enfermedad.

Moorman, (1999) difiere en la descripción de los daños en las flores, y menciona que los pecíolos presentan grandes manchas de color marrón.

Las hojas se vuelven cloróticas y mueren. Los pétalos tienen manchas doradas a tostadas. Se mueren los tallos a nivel del suelo. Los tejidos infectados se cubren con un crecimiento fúngico gris. Mientras que Florist, (1999) afirma que los síntomas de la enfermedad son manchas en las flores (peças grises) pudrición en el corazón de la flor, mostrando una lanilla fúngica polvorosa de color gris - marrón. En estudios realizados por Hurtado *et al.*, 2001, encontraron que las manchas foliares necróticas de color pardo y con aspecto acuoso en hojas y en los pétalos de las flores, así como una podredumbre en el tallo donde se diagnóstico la presencia de *Botrytis sp.*

En otros cultivos hortícolas, señalados por Meyer *et al.*, 2007, señala que el chile dulce (*Capsicum annum*) y el tomate (*Lycopersicon esculentum*), son afectados por una de las enfermedades más severas en invernadero conocida como el moho gris (*Botrytis cinerea*), la cual afecta a flores, frutos y tallos. Otro reporte es un síntoma particularmente sorprendente en los frutos es el denominado "mancha fantasma". En realidad, se trata de ataques de *Botrytis* abortados. Alrededor de un punto central muy pequeño y necrótico se observa un tenue anillo de 5 a 10 mm de diámetro, blanquecino sobre el fruto verde y amarillo en el fruto maduro. La calidad gustativa del fruto no sufre, pero si la presentación.

Cedeño *et al.*, 2003, identificaron a *Botrytis porri* como la causa de pudrición en el cuello de plantas de ajo (*Allium sativum*) cultivadas en el sector Mesa de Caballo, Municipio Miranda del estado Mérida, Venezuela. En otro cultivo hortícola producido en campo abierto o en condiciones

protegidas donde la enfermedad ocasiona daños considerables es en fresa (*Fragaria linneo*); aquí el síntoma característico es un moho gris en el fruto donde se ocasiona las pudriciones blandas secundarias cuando se almacenan, transportan y venden en el mercado (<http://www.infoagro.com>, 2003).

Lisboa, (2003) señala que los daños por *Botrytis*, es sin duda una de las enfermedades que ocasiona los mayores estragos en el cultivo de la vid (*Vitis vinífera* L.), siendo por ello de importancia su estudio en dicho rubro. Los principales síntomas son: el tizón del racimo que se manifiesta en la temporada de prefloración o durante la flor, y se caracteriza por un desecamiento del escobajo, especialmente en el extremo terminal y en los hombros de racimo. También se puede observar una pudrición temprana, que se desarrolla en el viñedo durante el verano, sin que se hayan registrado lluvias. Las bayas infectadas de los racimos, se tornan de color café, pierden humedad y presentan esporulación o fructificaciones del hongo en su superficie. Las bayas presentan la piel suelta y que se desarrolla inmediatamente después de las lluvias durante la época de cosecha. Se manifiesta con manchas de color violáceo, que luego se tornan de color pardo, en las variedades blancas y son difíciles de distinguir en las variedades tintas.

3.- ETIOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN DE BOTRYTIS

Botrytis cinerea, se incluye dentro el grupo de los Deuteromycota, Orden Moniliales, el cual corresponde al estado anamórfico del Ascomycota *Brotryotinia fruckeliana*, de rara presencia en la naturaleza. Las esporas asexuales se forman sobre las hifas del hongo que se encuentran expuestas libremente a la atmósfera. Pertenece a la Familia Moniliaceas, Género *Botrytis*, presentando conidióforos erectos y conidios originados en los ápices redondeados de las ramificaciones (Coley *et al.*, 1980; Agrios, 1997).

Botryotinia, se diferencia de *Sclerotinia* por tener una médula esclerotial más compacta, gelatinizada y un anamorfo en *Botrytis*. El teleomorfo puede encontrarse en el campo, aunque predomina el anamórfo. Los esclerocios varían de forma y tamaño, pero normalmente son al menos de 3 mm de diámetro, para que se produzcan apotecios se necesita períodos de almacenamiento en frío, los tallos de los apotecios pueden llegar hasta 3 cm de longitud y a 1 - 2 mm de grueso; los discos son cóncavos, pardos amarillentos y de hasta 8 mm de diámetro. Las ascas son cilíndricas, las ascosporas elipsoidales a fusiformes de 9 - 15 x 4 - 7 μm , y uninucleadas. Los conidióforos son más pálidos cerca del ápice, las ramas terminales producen conidios lisos, unicelulares, ovoides o elipsoidales, hialinos a pardo claro o en masa pardo grisáceo en media miden 10 x 7,5 μm , aunque aparecen variaciones amplias. En estudios realizados por Hurtado *et al.*, 2001, encontraron que en aislamientos efectuados en gerberas, se obtuvo una colonia de *Botrytis sp.* cuyas características eran de rápido desarrollo en forma de espiral con micelio

de color crema oscuro y ralo en PDA, con conidios de 0.2 - 0.5 x 1.0 - 4.5 μm y pigmentados.

4.- CICLO DE LA ENFERMEDAD Y EPIDEMIOLOGÍA

Agrios, (1997), señala que el hongo inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Al parecer, este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con la semillas contaminadas mediante esclerocios, también se propagan mediante cualquier sustrato o tejido en el suelo y requiere de un clima húmedo y moderadamente frío (18 - 23 °C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule libere y germine sus conidios y para que conduzca la infección. El patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en cosechas que se han mantenido almacenadas durante largos períodos, aun cuando las temperaturas estén entre 0 y 10° C. Los conidios que han geminado rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero penetran en los tejidos de la planta a través de heridas o después d que se han desarrollado durante un cierto tiempo y han formado micelio sobre los pétalos de flores senescentes, follaje moribundo de las plantas, escama de bulbos muertos, etc. Por lo común, los esclerocios germinan produciendo filamentos miceliales que infectan directamente los tejidos del hospedante, pero en algunos casos dichos esclerocios germinan produciendo apotecios y ascoporas.

Bigre *et al.*, 1990 señalan que *B. cinerea*, es un parásito débil, no especializado, una espora aislada no es en general capaz de invadir una hoja, un tallo o fruto sano. La penetración tiene lugar por una herida o un órgano que envejece. Una sobrealimentación en nitrógeno así como una nutrición desequilibrada favorece al hongo. La condición óptima para su desarrollo virulento es de 15 a 20° C. La presencia de agua favorece la infección, manifestándose en seis días a 6 – 7° C y en dos días a 18° C (**Figura 1**). La infección tiene lugar en dos fases:

1. El hongo se instala y parásita por primera vez.
2. Posteriormente gracias a la producción de *poligalacturonasa* y *la pectina depolimerasa = protopectinasa* por el hongo este ataca a los tejidos sanos, desde que tienen lugar las condiciones biológicas favorables sobre todo una humedad elevada.

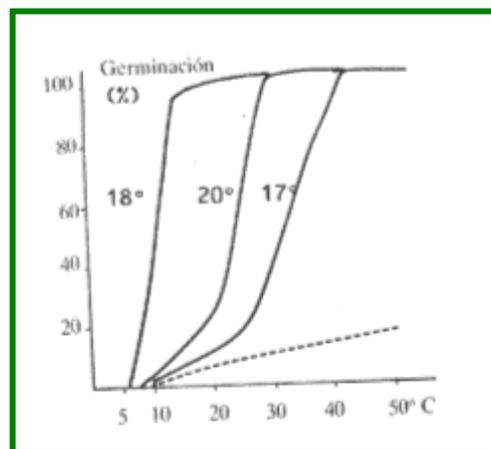


Figura 1. Porcentaje de germinación de conidias de *B. cinerea* en función del tiempo y de la temperatura (Bigre *et al.*, 1990)

Esta enfermedad aparece principalmente en plantas enfermas, débiles o sobre fertilizadas con nitrógeno o en condiciones de temperaturas demasiado baja y alta humedad del aire. Debe evitarse una humedad relativa elevada en los invernaderos y temperaturas de 15 - 20° C, siendo estas las óptimas para el patógeno. La infección está muy influida por las condiciones climáticas. En particular la precipitación y la HR afecta a todos los estadios del desarrollo, mientras que la temperatura, aunque menos importante, también es significativa. La lluvia y el viento dispersan los conidios. La presencia de inóculo transportado por el viento se correlaciona con el momento de esporulación de los esclerocios. El óptimo térmico para la germinación de las conidias es 18° C; la germinación en agua se estimula por la presencia de distintos solutos orgánicos (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos); la germinación puede tener lugar en ausencia de agua si la HR sobrepasa el 90 %; sin embargo en la práctica la infección tiene lugar en una relación estrecha con los efectos del agua y la temperatura a 15 - 20° C debe haber agua por lo menos 15 h y la temperatura mínima de infección en torno a los 8° C. Para atacar a tejidos verdes en crecimiento activo debe colonizar previamente, como base, sustratos saprofíticos como pueden ser distintos fragmentos de restos vegetales, tales como las corolas marchitas o secciones de hoja o pecíolos que quedan prendidos en los racimos al madurar estos (Oszkinis y Lisiecka 1990; Smith *et al.*, 1992; Bañón *et al.*, 1993).

El estudio realizado por Vargas *et al.*, 1989 en rosas en el estado Miranda determinaron que la época del año donde se presentó la incidencia de la enfermedad fue en la época seca, siendo los órganos afectados el tallo, las hojas y flores. Este hongo puede invernar en forma de esclerocios

formados en los sarmientos a partir del otoño en los países con presencia de las cuatro estaciones, también puede persistir como micelio en cavidades de la corteza o en yemas durmientes o latentes. En primavera, o en tiempo lluvioso y los esclerocios esporulan produciendo conidios. La lluvia y el viento son los que dispersan estas estructuras, la germinación puede tener lugar en ausencia de agua si la HR sobrepasa el 90 %. Para atacar a tejidos verdes en crecimiento activo debe colonizar previamente, como base, sustratos saprofíticos como pueden ser distintos fragmentos de restos vegetales, tales como las corolas marchitas o secciones de hoja o pecíolos (Smith *et al.*, 1992).

Los estudios realizados por Raposo *et al.*, 2008 en invernaderos de tomate y pepino en Almería cuantificaron la supervivencia del micelio como porcentaje de la recuperación de *B. cinerea*, durante dos años en los que dejaron trozos de tallo de tomate infectados artificialmente en el interior y exterior de los invernaderos, y encontraron que el hongo fue capaz de sobrevivir y ser infectivo cuando se encontraba en el exterior del invernadero. Luego evaluaron las fuentes de inóculo primario y supervivencia del patógeno, y encontraron que *Botrytis* sobrevive fundamentalmente como micelio. Y al cuantificar el porcentaje de la recuperación de *B. cinerea* durante el periodo de estudio en el material infectado artificialmente encontraron que el hongo es capaz de sobrevivir una vez transcurridos 110 días y si las condiciones son favorables puede desarrollarse y producir la enfermedad (Melgarejo *et al.*, 2007).

Castaño *et al.*, 2007 mencionan que la humedad es el factor determinante para el desarrollo de la enfermedad; la germinación de los conidios puede realizarse sin la presencia de agua libre, pero debe haber una humedad relativa superior a 90 %; siendo la temperatura óptima de 18° C. el hongo puede penetrar directamente a los tejidos de la planta, pero también aprovecha la presencia de las heridas. Por otra parte el alto contenido de carbohidratos, deficiencia de calcio y exceso de nitrógeno, son factores predisponentes para que se desarrolle el hongo, ellos influyen en el contenido de etileno, el cual es bien conocido como mayor factor endógeno para que se desarrolle el moho gris, lo que explica el por qué la enfermedad es más severa en tejidos senescentes.

5.- PATOGÉNESIS. EFECTO DEL PATOGENO SOBRE LA PLANTA.

Botrytis cumple una fase de sobrevivencia por medio de los esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de planta en descomposición sin embargo, Benito *et al.*, 2000 señalan que existen diversos factores para el desarrollo de la enfermedad entre los que se destacan el ciclo de la infección donde los conidios pueden ser producidos sobre cualquier material vegetal y ser transportadas a grandes distancias por el viento, una vez que el conidio ha alcanzado la superficie del huésped se inicia el ciclo de infección el cual presenta diversas fases las cuales mencionamos a continuación:

- a. La adhesión y germinación de los conidios sobre su huésped.

b. Su penetración por heridas, aberturas naturales o por la participación de enzimas o procesos mecánicos incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración en algunos sistemas.

c. Establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta

d. Fase de latencia del hongo durante el cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en el área de necrosis correspondiente a las lesiones primarias.

e. Transcurrido un tiempo en algunas lesiones primarias el hongo realiza el vencimiento de las barreras defensivas de las plantas e inicio de su diseminación en el tejido vegetal circundante a partir de aquellas, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido enfermo el patógeno produce una nueva generación de conidios que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.

En estudios realizados por Meyer *et al.*, 2007, donde evaluaron el papel de L-rhamnosa producido por *Botrytis cinerea* en las interacciones planta-patógeno, encontraron que las primeras interacciones entre un patógeno y su anfitrión, ocurren a menudo en la zona del contacto entre la matriz extracelular (ECM) del patógeno. En la planta, los polisacáridos son estructuras importantes de la célula y son los interconectores entre los polímeros de la pared de celular. También funcionan como elicitores activos que ayudan a emitir una respuesta de defensa en la planta. El ECM de *B. cinerea*, cumple una función importante, ya que es el

encargado de estimular la germinación de los conidios en el huésped y está constituido por un 20 % aproximadamente de polisacáridos, los cuales pueden estar implicados en enviar señales dentro del hongo para el alargamiento del tubo germinativo y poder inducir la producción de enzimas hidrolíticas.

En este proceso también pueden estar implicados unos polisacáridos que poseen una capacidad extraordinaria de interconectar al patógeno con el anfitrión. Al estudiar las interacciones entre los polisacáridos originados por el hongo y el de las plantas, se puede obtener una nueva perspectiva de la patogenicidad y ver como es el proceso con el fin de suprimirlo, usando anticuerpos monoclonales. El antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal de *Botrytis* es el (MAb) BC-12.CA41, el cual tiene un sitio obligatorio en el L-rhamnosa (Meyer *et al.*, 2007).

6.- CONTROL DE LA ENFERMEDAD

En vista de la complejidad existente en el control de la enfermedad, se ha hecho necesaria realizar el manejo integrado o gerencia de la enfermedad, considerando las condiciones climáticas, el ingrediente activo de los fungicidas, las prácticas agronómicas del cultivo y el control biológico.

6.1.- Control cultural o manejo de las prácticas agronómicas

Bigre *et al.*, 1990; Bañon *et al.*, 1993; Agrios, 1997; señalan que el manejo agronómico es uno de los aspectos más importantes para el control de la enfermedad y que se debería de considerar el dimensionamiento, tipo de invernadero y las condiciones de crecimiento del cultivo donde *B. cinerea* es un problema grave. Dichas prácticas se mencionan a continuación:

- ♦ Evitar las siembras demasiado densas en condiciones de baja luminosidad.
- ♦ Desinfección de semillas.
- ♦ La solarización es efectiva para el control de esclerocios.
- ♦ Manejar la aireación y el riego en invernadero con el fin de reducir la duración de los periodos diarios que combinan humedad a saturación y condensaciones y temperaturas de 15 - 17° C.
- ♦ Hacer podas y deshojados al ras del tallo para no dejar tocones que sirvan al desarrollo del parásito. Aplicación de una pasta fúngica en las heridas.
- ♦ Controlar los niveles de nitrógeno en el suelo, ya que niveles elevados favorecen el desarrollo de la enfermedad.
- ♦ Es fundamental la retirada de restos de cultivo y plantas afectadas por la enfermedad tanto del exterior del invernadero como alrededores.
- ♦ Aplicación de cubiertas plásticas de invernadero con absorción de luz ultravioleta ya que reducen la esporulación y la tasa de colonización epidermal.
- ♦ Los órganos almacenados como es el caso de los bulbos, deben protegerse manteniéndolos de 2 a 4 días a una temperatura de 32 a 50°

C a fin de eliminar el exceso de humedad y manteniéndolos posteriormente a 3° C en un ambiente lo más seco posible.

- ♦ Utilización de sistemas de riego localizado con el fin de evitar el humedecimiento de hojas, tallos y flores.
- ♦ Utilización de películas plásticas cuando el cultivo se encuentre cercano a la floración.
- ♦ Eliminación de flores abiertas, no comerciales en el cultivo.

6.2.- Control químico

A nivel internacional existen diversas moléculas que son capaces de controlar a la podredumbre gris en diversos cultivos, los ingredientes activos y dosis varían según el sistema de producción, manejo del cultivo, existencia en los mercados de agroquímicos de cada país entre otros. Los siguientes autores (**Tabla 3**), señalan diversos ingredientes activos capaces de controlar a *B. cinerea*.

En Venezuela, solo existen 15 ingredientes activos para el control de *B. cinerea*, y generalmente su recomendación es para otros cultivos que no son ornamentales, por lo cual hay que tener sumo cuidado en las combinaciones, concentraciones y dosis a aplicar sobre todo en la época de floración ya que se puede presentar problemas de fitotoxicidad en las plantas, manchado de las flores o precipitación de los productos, causando pérdidas considerables por medio de este método de control; ver **Tabla 4**.

Tabla 3. Ingredientes activos de los principales fungicidas utilizados en el control de *B. cinerea* en algunas ornamentales y cultivos asociados a estos.

Autor	Cultivo	Agroquímico
Williams-Woodward, (2007)	flores y frutales	Diclorán ó Zineb; Difolatán, Maneb; Zinc, Clorotalonil
	Fresa	Captán, Thiram ó Benomilo.
	Tallos podados	Tiram + Iprodione + Éter De Petróleo_Triadimefon.
	Tomate y cebolla	Iprodione, Vinclozolina o Procimidona_Tiram, Diclofluanida o Clorotalonil.
Bañon <i>et al.</i> , 1993	Gerbera	Vinclozolina, Iprodione Y Procimidona.
	Lilium	Benomilo, Iprodione, Clorotalonil
Vidale, 1992	Poinsettia	Maneb, Captan, Benomilo e Iprodione
	Ciclamen	Zineb
	Violeta, begonia, crisantemos	Procloraz
	Kalanchoë	Furalaxil.
Rondon, 2001	Gerbera	Iprodione, Benlate, Funcloraz, Folpan
Moorman, 1999	Gerbera.	Vinclozonil, Cobre, Clorotalonil ó Fludioxonil
Muñoz y Escalona (2005)	Fresa	Procyidone
http://www.infoagro.com (2003)		Benzimidazol y Dicarboximida Clortalonil, Hidróxido de Cobre, Sulfato de Cobre Pentahidratado Y Mancozeb
O ´Neill y McQuicken (2005)		Clorotalonil, Mancozeb, o Iprodione

Tabla 4. Ingredientes activos permitidos en Venezuela para el control de *B. cinerea*.

Acido fósforico	Azoxystrobin	Benomilo
Captan	Carbendazim	Cimoxanilo+Mancozeb
Clorotalonil	Dichlofluaned	Folpet
Iprodione	Mancozeb	Maneb
Propineb	Trifenil hidroxido de estaño	Zineb

Fuente: Anzola, (2009)

Es de importancia señalar la rotación de los ingredientes activos en vista de que en distintos estudios se ha confirmado la resistencia de *B. cinerea* a determinadas moléculas. O'Neill y McQuilken (2005), estudiaron el control de la enfermedad en ornamentales en condiciones protegidas, en donde encontraron que los fungicidas proporcionan control incompleto en los aislamientos de *B. cinerea*, presentado resistencia a Iprodione, en comparación con Azoxystrobin; Cyprodinil; Funcloraz; Tebuconazole y Clorotalonil, en cultivos de calendula (*Calendula officinalis*); ciclamen; helianthemum (*Helianthemum glomeratum*) y primula (*Primula obconica*).

Otro ejemplo de resistencia a la enfermedad lo demostraron Montealegre y Vásquez, (1996), en el cultivo de pera con Benzimidazoles, Carboximidaz y Dicarboximidaz. Encontrando que existen cepas *B. cinerea* con resistencia cruzada a Benomil y Tiabendazol, mientras que otras cepas presentan conidias que germinan a 500 ppm i.a. y cuyo micelio creció a 200 ppm de i.a. de estos fungicidas.

En Captan y Folpet, el nivel de resistencia observado fue menor que en los Benzimidazoles, encontrándose cepas cuyas conidias germinaron hasta 5 ppm i.a. y donde el micelio creció hasta 10 ppm i.a. en Iprodione y Vinclozolin, también las cepas presentaron resistencia cruzada, sin embargo esta fue menor que las anteriores encontrándose que algunas de ellas fueron capaces de germinar a 200 ppm i.a. y su micelio de crecer a 10 ppm i.a.

Jalil *et al.*, 1998, realizaron ensayos de la sensibilidad de *Botrytis cinerea* a Pirimetanil con pruebas de resistencia cruzada a Iprodione. Quienes probaron que el fungicida Pirimetanil a 5 mg. i.a./l, en agar glucosa gelatina (GGA), fue capaz de inhibir el crecimiento demostrando así que no existe una resistencia cruzada entre ambos fungicidas. Mientras que Carrero *et al.*, 2003 probaron 3 grupos de fungicidas y efectuaron pruebas de sensibilidad para la inhibición del crecimiento y esporulación del hongo, encontrando que el primer grupo conformado por Procloraz y Myclobutanil fueron capaces de inhibir el crecimiento en 0,0 cm y 0,13 cm respectivamente; mientras que el segundo grupo conformado por Clorotalonil y Mancozeb se encontró que el hongo fue capaz de crecer en 0,94 cm y 2,4 cm respectivamente y en el tercer grupo conformado por Azoxystrobin y Benomilo, se evidencio que *B. cinera* fue capaz de crecer 6,84 cm y 7,22 cm. Mientras que en las pruebas de inhibición de esporulación se encontró que los fungicidas más eficientes fueron Procloraz; Clorotalonil; y Benomilo, los cuales inhiben totalmente la producción de conidias, en el tratamiento con Mancozeb ocurrió muy baja esporulación, mientras que en los correspondientes a Azoxystrobin,

Myclobutanil y el testigo, la producción de conidióforos y conidios fue abundante.

En el mismo año Riveros, (1998), realizó un estudio para conocer la población de *B. cinerea*, y asociar sus características con la disminución en la eficacia de control con Dicarboximidias. Aislando 80 biotipos, los cuales fueron establecidos en PDA conteniendo 0; 0.1; 0.5 y 2.5 ppm de Vinclozonil y adicionalmente 10 ppm de Benomilo. Obteniendo un 46 % de biotipos como resistentes al fungicida. Y Jalil *et al.*, 1998 evaluaron 26 aislamientos de *B. cinerea In vitro*, recolectadas del cultivo de tomates de la zona central y centro norte de Chile, quienes obtuvieron que la dosis mínima inhibitoria en el 46 % de los aislamiento fue superior a 5 ppm i.a. y el 54 % variando entre 1 y 5 ppm, de Pirimetanil e Iprodione respectivamente y que no existió resistencia cruzada entre ambos fungicidas. Melgarejo *et al.*, 2007 evaluaron la frecuencia de aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a los distintos fungicidas, y analizaron 602 aislamientos recogidos en distintos invernaderos de Almería de los años: 1992 - 1993; 1995 - 1996 y 1999 - 2000. Las cuales presentaron resistencia a Dicarboximidias; Benzimidazoles (47 %); N-fenilcarbamatos (28 %), e incluso detectaron un 14 % de aislados con resistencia triple.

Bombelli y Wright (2006), realizaron pruebas del control de *Botrytis cinerea* y evaluaron el efecto del KHCO_3 sobre la calidad de frutos de tomate durante la poscosecha. Determinando el efecto del KHCO_3 sobre el desarrollo de *Botrytis cinerea*, midiendo diariamente el desarrollo de la colonia en placas de Petri con concentraciones crecientes de KHCO_3 . La

inmersión de frutos en soluciones KHCO_3 2 %, probó ser eficaz en la prevención del ataque de *B. cinerea* durante un período de dos semanas, manteniendo en general la calidad comercial. Sin embargo, se observó una pérdida significativa de la firmeza del fruto. Concentraciones inferiores al 2 % no controlaron totalmente el ataque fúngico, en tanto que una concentración mayor acompañada por un período más prolongado de exposición a la sal produjo una pérdida en la calidad del fruto. La exposición *In vitro* a KHCO_3 1 % produjo un efecto fungistático en el hongo.

Palmer *et al.*, 1997 realizaron investigaciones en el control de *B. cinerea*, con el uso de sales de bicarbonato, fosfato, nitrato y otras a nivel *In vitro* y se evaluó la inhibición del crecimiento del hongo. Donde encontraron que el efecto de la capacidad buffer mantiene elevado el pH, lo que impide el desarrollo del hongo, el cual no puede liberar suficiente ácido para bajar el pH y lograr un óptimo crecimiento; el ion bicarbonato por sí mismo tiene el poder inhibidor sobre la estructura del hongo, y esto puede ser atribuido a su acción sobre enzimas o sobre secreciones enzimáticas del protoplasma o su influencia tóxica directa. Por otro lado, los bicarbonatos pueden incrementar los niveles osmóticos de las superficies de la hoja, lo cual va en detrimento de las esporas del hongo.

6.3.- Control natural

Rangel *et al.*, 2005, realizaron estudios de la inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* proveniente de aislamientos de fresa con extracto etanólico de cuatro plantas silvestres, obteniendo como resultados que *Clidemia hirta*; *Andropogum bicornis*; *Pteridium caudatum*; *Sida acuta*, Presentaron un alto potencial para el control, sin embargo no se debería considerar la utilización de *P. caudatum* y *S. acuta*, siendo esta ultima la que presenta cierta toxicidad para los animales y aun se desconocen sus efectos sobre el hombre.

Fiallos, (2012) realizó una evaluación de la inhibición *In Vitro* de *B. cinerea* aislada de rosas con extractos alcohólicos y acuosos de hierba mora (*Solanum nigrum*), encontrando que el tratamiento alcohólico de bayas en dosis de 20 cc/l inhibió el crecimiento de la colonia. Ortega y Bautista 2007, utilizaron extracto de inflorescencias de Brócoli (*Brassica oleracea v. itálica*), y efectuaron aplicaciones en 3 concentraciones 0,5; 1 y 1,5 % y el testigo con agua, siendo el tratamiento con el 1,5 % quien obtuvo un 15 % menor incidencia que el testigo.

6.4.- Control biológico

En los últimos años se ha venido incorporando la utilización del control biológico en los manejos integrados de las distintas enfermedades y la podredumbre gris no se escapa a ella, sobre todo por la cantidad de trabajos reportados donde se evidencia la identificación de cepas que

presentan resistencia a determinados fungicidas. En Biocontrol, 2009, se menciona la utilización de diversos hongos como: *Trichoderma spp.*, *Coniothyrium spp.*, *Gliocladium p.*, *Mucor spp.*, *Penicillium spp.*, *Verticilium spp.*, bacterias y nematodos como antagonistas de *B. cinerea*, citando a los primeros como los más importantes en los cultivos hortícolas. Para el control biológico del moho gris de las manzanas se ha citado el hongo antagonista *Trichoderma harzianum*.

BIOCONTROL, 2009; hace referencia al control biológico en floricultura, utilizando hongos antagonistas, obteniendo buenos resultados en la producción de statice (*Limonium sinuatum*), evitando el problema que daba el patógeno. Otros ejemplos se observan con Gladiolo específicamente problemas en el bulbo, por muerte simultánea introducción del hongo *Trichoderma*, con el cual se evitó gran parte de su muerte o pérdida de bulbos. En crisantemos y clavel se obtuvo un buen control de patógenos con *Trichoderma* y *Verticilium*. Mostrando una buena alternativa de producir a bajos costos y con producciones más sanas.

Horst *et al.*, 2005, realizaron estudios de la supresión del daño de *Botrytis* en begonia con la utilización de *Trichoderma harziaum* (T382) en turba y mezclas estiércol-enmendadas, encontrado que las pruebas realizadas demostraron que T382 redujo perceptiblemente la severidad del destrozo del *Botrytis* en begonia. En estudios realizados por la Asociación Colombiana de Exportadores de Flores (ASOCOLFLOR) 2003, reportan que el manejo de *Botrytis* en siembras de rosas y gerbera; encontrándose evidencia el porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* en cámara húmeda, en cultivo de gerberas en la Finca Inversiones Aldho. Chía,

Cundinamarca. Con pérdidas por aparición de *Botrytis* en postcosecha sobre flor aparentemente sanas al momento de la cosecha, es muy significativa en la disminución de la rentabilidad en diferentes cultivos. Se ha demostrado en más de 65 fincas de la Sabana de Bogotá que el Producto Biológico «E», con base en *Trichoderma harzianum* DSM 14944, ejerce un efecto inhibitor prolongado sobre el patógeno.

En las investigaciones realizadas por Díaz *et al.*, 1999 en *statice* (*Limonium sinuatum*), evaluaron diferentes alternativas de control de *Botrytis cinerea* con control químico (Iprodione – Captan); control cultural y control biológico (*Trichoderma hamatum* con aplicaciones de 6.5×10^6 esporas/ml inoculado en el suelo por 4 semanas) y manejo integrado de la enfermedad, también se realizó combinación de estas alternativas donde el parámetro de medición fue el número de bultos o paquetes cosechados por planta. Siendo la combinación de *Trichoderma hamatum* y el control químico con 0,27 bultos/planta y el tratamiento de control químico + manejo cultural con 0,26 bultos/planta en comparación con el manejo integrado fue el menor tratamiento control con 0,06 bultos/planta. Sin embargo, el tratamiento de control biológico + manejo cultural 0,2 bultos/plantas resulto un valor muy aceptable sobre todo para cumplir con los parámetros de exportación.

En otros estudios realizados con el fin de obtener alternativas del control biológico de la enfermedad Seddon, (2007) realizó ensayos utilizando *Bacillus brevis* en el control de la enfermedad, encontrando una ventaja al usar esta bacteria, por la producción de sustancias antifúngicas debido a

la bioquímica de ésta. Esta investigación enfocó el potencial antagonista y demostró que *B. brevis*, es capaz de ejercer un control a niveles medios a altos de la enfermedad del moho gris en los sistemas protegidos y cosechados de col de China, lechuga, tomate, uvas, peras; dependiendo del nivel de la enfermedad y las condiciones ambientales que prevalecían. Otra bacteria utilizada es *Bacillus subtilis* que presenta un buen control en cultivos de Vid (Esterio *et al.*, 1996). Mientras que Chiou y Wu, 2001 utilizaron diez aislamientos de bacterias en el control de *B. elliptica*, donde *Burkholderia gladioli* (B99 y B111) y *Bacillus amyloliquefaciens* (B128 y B190), fueron las más efectivas en el control de la enfermedad.

Esterio *et al.*, 1996 evaluaron la efectividad de los fungicidas Trichodex (*Trichoderma harzianum*); BC-1000 (tratamiento orgánico) y fungicidas tradicionales: Benomilo; Captan; Vinclozonil; Iprodione y Folpet, en el control de *B. cinerea* en uva de mesa en un campo de producción del Valle Central de Chile. Obtuvieron como resultados que Trichodex fue una buena alternativa en el control del patógeno; teniendo resultados similares con el BC-1000. Los demás tratamientos presentaron un mayor valor de pudrición final. Sin embargo, en el trabajo realizado por Melgarejo *et al.*, 2007, trabajando con la cepa T39 de *Trichoderma harzianum*, encontraron que esta no fue eficaz en las condiciones ensayadas en el control de la enfermedad, siendo interesante la búsqueda de otras cepas adaptadas a la zona u otros agentes biológicos compatibles con el sistema de producción.

En los estudios *In vitro* e *In vivo* realizados por Garcés, (1997) en el control de *B. cinerea* aislado de rosas y de statice (*Limonium sinuatum*), utilizando como agente biológico a *T. hamatum* (T-18) y *B. subtilis*, obtuvo diferencias en los resultados, observándose un control total *In vitro*, con *T. hamatum* se observó micoparasitismo, mientras que *B. subtilis* ocasionó la lisis del micelio. Por su parte en el ensayo *In vivo* no se obtuvo control de la enfermedad en las aplicaciones por aspersión, ni como sobrenadante.

7.- INDUCTORES DE RESISTENCIA

7.1.- Generalidades de la inducción de la resistencia.

Las plantas para defenderse disponen de una variedad de mecanismos de defensa que van desde las barreras físicas hasta las reacciones bioquímicas que alertan a las células entre sí, produciendo sustancias tóxicas que eliminan o inhiben la colonización por parte de la plaga o del patógeno. Las regiones tropicales y subtropicales, por sus características particulares, poseen una gran biodiversidad de microorganismos y especies vegetales, las cuales constituyen una fuente para la producción de plaguicidas biológicos, promotores de crecimiento y moléculas activadoras o promotoras de la inducción de resistencia (Riveros, 2001).

Inducción de resistencia a plagas

La inducción de resistencia (IR) a patógenos fue descubierta a comienzos de 1901, con los estudios de inmunización, realizados por Ray y Beauverie; mientras que los primeros trabajos se realizaron después de 1970 (Riveros, 2001). En la actualidad, se ha completado estudios de inducción de resistencia en 30 especies de plantas aproximadamente y paradójicamente, el mayor desarrollo se ha expresado en insectos, en el cual se han estudiado 100 especies, esto incluye resistencia inducida por patógenos, insectos plagas o sus productos y diversos grupos de moléculas activadoras orgánicas e inorgánicas. Este sistema cada vez más gana un espacio importante como método para el manejo de plagas y enfermedades en los cultivos, pues además de los efectos directos en la solución de problemas fitosanitarios, permite racionalizar el uso de agroquímicos (Vélez, 2008).

En cuanto a la inducción de resistencia sistémica es en la relación planta-insecto plaga y la inducción de resistencia sistémica adquirida es a la relación planta-patógeno, siendo la **Resistencia sistémica inducida (ISR)** básicamente induce la producción de fitoalexinas como agente de control, actúa sobre un amplio espectro de invasores, sus niveles de control son de leves a moderados, pero de muy larga duración (normalmente todo el ciclo del cultivo) y **Resistencia sistémica adquirida (SAR)**: Existen 2 tipos de Rutas, la Salicílico dependiente y la Salicílico independiente. La resistencia salicílico independiente es activada para hongos necrotrofos (que se alimentan de tejido muerto como *Botrytis*), heridas y algunos herbívoros (larvas), se induce proteínas de

defensa y estimula la acumulación de lignina en las paredes celulares; cubre un amplio espectro de invasores, brinda control moderado a fuerte pero de mediana duración; normalmente es la primera ruta en ser activada pero también en ser reprimida (Buchanan *et al.*, 2000; Vélez, 2008).

Para Vélez, (2008), existen 2 teorías complementarias que soporta la inducción de resistencia: **La coevolución de sistemas**, siendo una teoría que describe la forma como el invasor y la planta se adaptan, seleccionan y evolucionan ante nuevas estrategias de ataque y defensa conservando un equilibrio. Y **La teoría de Miedo**, la cual señala que es el miedo y no el desconocimiento celular a determinado agente biótico lo que activa la defensa de las células, esta teoría permite la existencia de un sistema inmunológico natural en los vegetales. El mismo autor también menciona que las plantas poseen mecanismos de defensa o preformados (cutícula, vellos, toxinas, etc.), que están presentes y son funcionales aun antes que haya interacción con el invasor, y mecanismos de defensa activos o inducibles (metabolismo activo) que sólo son funcionales después de una primera interacción con el invasor; ambos mecanismos son muy eficientes y de hecho en la naturaleza la enfermedad es la excepción y no la regla. La interacción genéticamente incompatible (resistente), es aquella donde el invasor fracasa en su ataque porque es reconocido en forma oportuna, la planta reacomoda su metabolismo crea condiciones inadecuadas para el desarrollo de la invasión, cuanto más corto es el proceso de reconocimiento a reacomodación metabólica (en tiempo y/o número de células implicadas) mayor nivel de resistencia.

Vélez, (2008) señala que para que el proceso sea efectivo se deben cumplir algunas etapas entre la interacción planta-patógeno. Estas interacciones se basan en 4 fases las cuales son las siguientes:

- ❖ **Inducción:** la planta reconoce la presencia del invasor o señales, dispersa señales secundarias y reacomoda su metabolismo.
- ❖ **Acondicionamiento:** La planta da inicio a flujos de carbono y nitrógeno del metabolismo primario al secundario, se activan los genes de defensa (si existen), se inicia la síntesis de proteínas, precursores proteicos derivados fenólicos, elicitores (señales) y fitoalexinas; éstos productos son elaborados y almacenados de forma continua hasta tanto se dé una nueva confrontación con el invasor.
- ❖ **Respuesta:** Ante un nuevo ataque del invasor los productos elaborados y almacenados durante el acondicionamiento se transforman en proteínas de defensa y/o resistencia, especies activas de oxígeno, fenoles y fitoalexinas, que son liberados al ambiente intra e intercelular, son los agentes que generan control.
- ❖ **Homeostasis:** Superado el ataque del invasor la planta activa mecanismos antioxidativos que recuperan el equilibrio, se devuelve parte del carbono y nitrógeno al metabolismo primario y se almacenan algunas señales.

La inducción de resistencia requiere de una secuencia ordenada y completa de programación metabólica de la planta, que toma normalmente de 2 - 4 días; no existe efecto de control curativo o de choque como con algunos pesticidas, es la planta la que se defiende y no

el inductor el que causa el daño al invasor. Ante la paradoja que se origina en el uso preventivo de los inductores de resistencia para asegurar eficacia, y el hecho de que la inducción sin confrontación implica un gasto y no una inversión de recursos rentables para la planta, la estrategia más adecuada de uso apunta a su aplicación en zonas y/o problemas endémicos, o donde los sistemas de diagnóstico temprano o de anticipación permitan definir la cercanía real de una confrontación (Buchanan *et al.*, 2000; Vélez, 2008).

**Criterios que definen y limitan a un inductor de resistencia son:
(modificado de Steiner & Schönbeck) [Vélez, 2008, Madriz, 2002]**

- Debe modificar la interacción planta invasor para que aparezca fenotípicamente una interacción incompatible.
- Ausencia de efectos tóxicos del agente inductor (o sus metabolitos) sobre el invasor tanto *In vitro* como *In vivo*.
- Necesidad de un intervalo de tiempo entre la aplicación del inductor y el inicio de la protección.
- Ausencia de correlación típica dosis respuesta conocida para compuestos tóxicos.
- Protección no específica para un rango variable de invasores.
- Protección tanto local como sistémica.
- Dependencia del genotipo y del metabolismo de la planta.

Mientras que Buchanan *et al.*, 2000 señalan que existen factores importantes para que un patógeno sea virulento, destacándose entre ellas:

- Elevada tasa de reproducción durante el ciclo de crecimiento de la planta hospedera.
- Eficiente mecanismo de dispersión por el viento, vectores y agua.
- Un tipo diferente de reproducción (a menudo sexual) hacia el final del ciclo de crecimiento de la planta, para producir un segundo tipo de estructura reproductiva que tiene un largo período de supervivencia.
- Gran capacidad para generar diversidad genética o mutaciones.
- Monocultivos y genotipos patogénicos bien adaptados.

Madriz, (2002) señala que las plantas pueden poseer mecanismos constitutivos de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o preformada se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos, como por ejemplo capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa químicos constitutivos, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. Así mismo la formación de barreras estructurales como uno de los mecanismos de defensa más evidentes, siendo la producción y deposición de sustancias que actúan como barreras físicas evitando el avance del patógeno; siendo una de ellas la lignificación o la formación de papilas en las células de la epidermis.

Moléculas activadoras o promotoras de resistencia

El concepto de activador desde el inicio, fue utilizado para moléculas capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en la planta, en ausencia del patógeno. En la actualidad, esta definición, se ha generalizado y aceptado para cualquier molécula química que pueda estimular mecanismos de defensa o asociados con la respuesta de defensa en las plantas. Las moléculas activadoras no deben ser tomadas como sustitutivos de fungicidas, si no como una alternativa adicional dentro de una estrategia de manejo integrado (Riveros, 2001).

Existen diferentes tipos de moléculas activadoras que son de origen vegetal, o también llamadas activadoras endógenas y las de origen parasitario o producidas por algún agente físico externo, son conocidas como activadoras exógenas. En el caso de las primeras se sabe que las células vegetales poseen una pared celular, la cual presenta un 90 % de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, y pectina) asociados a un 10 % de proteínas y esta pared celular puede liberar moléculas activadoras endógenas, responsables de la inducción de mecanismos de defensa en ellas. Mientras que en caso de las moléculas activadoras exógenas pueden ser clasificados en bióticas y abióticas (Riveros, 2001).

En la actualidad existen moléculas activadoras comercializadas, que han logrado la protección de cultivos, es decir la aspersion del producto funciona como una vacuna para la planta y la protege de infecciones futuras, lo cual constituye una labor preventiva y no curativa. Siendo el

INA (ácido 2,6-dicloro isonicotínico) y el BION (S-metil benzo[1,2,3,]thiadiazole-7-carbothiate (=acibenzolar-S-metil o BTH), los primeros ingredientes activos utilizados, ambos productos actúan como sustitutos del ácido salicílico (AS) en una resistencia sistémica adquirida (Riveros, 2001).

Daayf *et al.*, 1998 señalan que la empresa de agroquímicos BASF comercializa con el nombre de MILSANA, un producto sintético equivalente al obtenido del extracto de la planta *Reynoutria sachalinensis* el cual ha dado buenos resultados como inductor de resistencia en ornamentales y huertos hortícolas. Otra experiencia similar la obtuvieron Tally *et al.*, 2000, los cuales señalan que la inducción de resistencia local generada por el patógeno que indica una señal de defensa a otras partes de la planta, que son reforzadas con la aspersion del producto (Bion) o molécula activadora, permitiendo que los mecanismos bioquímicos de resistencia alcancen niveles similares a los que se dan en un tejido inducido biológicamente. El tiempo de inducción para alcanzar un umbral verdadero de protección varía entre 2 y 4 días y que la duración del efecto de protección es de aproximadamente seis semanas.

7.2.- Micoorganismos como inductores de resistencia

Riveros, (2001) señala que existen moléculas exógenas bióticas producidas *In vivo*, estos son liberados espontáneamente en los filtrados de microorganismos, o pueden ser extraídas de tejidos infectados por métodos de infiltración de un tampón que lave los espacios intercelulares,

el cual supuestamente ha estado colonizando previamente el patógeno biotrófico. En cuanto a las moléculas activadoras exógenas abióticas, actualmente hay disponible gran cantidad de productos, donde se incluyen aquellos semisintéticos, tales como: ácidos grasos; RNA levaduras; glicoproteínas, lipopolisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, etc.

Ulacio *et al.*, 2013 señalan que a partir del V Congreso Mundial de *Trichoderma*, celebrado en Costa Rica en 2008, se debe sustituir la palabra biofungicida por el bioregulador para referirse específicamente a *Trichoderma*, como estrategia para regular la acción de los hongos patógenos de las plantas. Desde hace varios años diversos autores han demostrado la inducción de resistencia por parte de *Trichoderma*, siendo Meyer *et al.*, 1998 quienes demostraron que la aplicación de *T. harzianum* descrita como la cepa T-39, fue capaz de producir resistencia en plantas de tomate; lechuga; pimentón; frijol y tabaco a los ataques de *Botrytis cinérea* en aplicaciones foliares, causando un retardo o menos difusión de la lesión.

Jiménez, (2009) menciona que en los estudios recientes se ha encontrado que la actividad antimicrobiana de *Trichoderma* spp. muestra una interacción entre dicho organismo y la planta. Algunas especies de *Trichoderma* son capaces de colonizar los espacios intercelulares de las raíces, invadiendo capas superficiales, pero no penetran más allá, debido a que provocan reacciones de defensa de plantas, lo cual indica el desarrollo de una simbiosis, debido a su facilidad para adherirse a la raíz,

resistir los metabolitos secundarios producidos por la planta. Su capacidad de escapar a señales bioquímicas, le permite interactuar con los tejidos, operar como elicitador de los mecanismos de defensa de las plantas.

En la actualidad en Colombia, se está trabajando el cultivo de gerbera con biofertilizantes, para la obtención de mejores rendimientos en el cultivo, siendo Soroa *et al.*, 2003 quienes estudiaron el efecto de aplicación de estos productos a partir de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), sobre algunas variables de crecimiento en gerbera de corte y de pote, teniendo como resultado que las aplicaciones de *Glomus fasciculatum* + *Burkholderia cepacia*, como el mejor tratamiento en cuanto al área foliar, inicio de floración; diámetro del capítulo; y cierta tolerancia a plagas y enfermedades.

7.3.- El Silicio

Inicialmente se atribuyó el incremento en resistencia de las plantas a las enfermedades en presencia de Silicio, como una barrera mecánica pasiva que impedía las infecciones. Actualmente existe evidencia concluyente que el silicio está involucrado en el incremento de resistencia de muchas plantas, como el pepino, al ataque de los mildiú mediante la activación de sistemas antifúngicos que aparecen en las hojas infectadas. Esta actividad es atribuida a la presencia de metabolitos de bajo peso molecular, clasificados como fitoalexinas. La fertilización con silicio está relacionada

con la aparición de sistemas enzimáticos de defensa como peroxidasa (POX), polifenoloxidasa (PPO) y fenilalanina amonía-lyasa (PAL), que se activan en presencia de las infecciones, iniciando la síntesis de compuestos de defensa de las plantas contra agentes externos (Bernal y Ballen, 2007).

Bernal, (2008) señala que en las células se hacen deposiciones de silicio llamados ópalos o fitolitos de ópalos (cuerpos sólidos de sílica amorfa), que son mayormente incorporados a las paredes celulares de los sitios donde se culmina la transpiración, le dan rigidez y aspereza a las paredes. La dureza ayuda a prevenir el volcamiento, y suministra protección contra la penetración de organismos patógenos y plagas. El efecto del silicio en la inducción de las fitoalexinas, combinados con el de los fosfitos estimula la autoprotección de la planta contra enfermedades causadas por hongos, bacterias, y el ataque de los insectos - ácaros y de las condiciones desfavorables de clima al estimular el desarrollo y actividad de estructuras poliméricas en la cutícula y los tricomas y fitolitos en la superficie de las hojas. La acumulación de silicio en la parte aérea de la planta también induce un cambio notable en la arquitectura de ésta. En el caso de las flores, los tallos son más robustos y rectos, contribuyendo a mejorar la calidad de la flor para exportación.

Kamenidou, (2009) realizó un estudio en el cual evaluó la eficacia de las diferentes formas de aplicación de silicio soluble (Si) y la combinación con dos tipos de fungicidas en el control de tres enfermedades siendo estas el Oidium en zinnia (*Zinnia elegans*) y girasol (*Helianthus annuus*)

causada por *Golovinomyces* (= *Erysiphe*) *cichoracearum*; la podredumbre de la raíz en gerbera causada por *Phytophthora drechsleri* y el moho gris de girasol causado por *Botrytis cinerea*. Los resultados obtenidos fueron que la aplicación de Si en zinnia y girasol redujo los niveles de la enfermedad después de la segunda semana y cuando se mezcló con Miclobutanilo ocurrió un sinergismo suprimiendo totalmente la enfermedad. En las gerberas afectadas por *Phytophthora*, se controló la enfermedad por 5 semanas cuando se combinó el Mefenoxam con silicato de potasio. No siendo así cuando se aplicó los suplementos de Si, observándose que no hubo un control de la enfermedad. En el caso del girasol afectado con *B. cinerea* se observó que la germinación de las conidias y el crecimiento micelial, se retrasaron en las plantas que tenían solo Si, fortaleciéndose los tricomas creando una barrera mecánica donde se acumularon las conidias.

7.4.- Ácido Fosfórico

Bernal y Ballen, (2007), señalan que las fitoalexinas son sustancias fungitóxicas que el vegetal produce para defenderse de un ataque de hongos, disminuyendo su crecimiento e inhibe la formación de las esporas. Por lo general solamente aparecen después de la presencia del ataque del patógeno. Además se presenta la muerte de las células hipersensibles (células enfermas), lignificación y reforzamiento de las paredes celulares (engrosamiento) y aparecen enzimas capaces de afectar a los hongos y causar su muerte. La importancia de la aplicación de ácido fosfórico (H_3PO_3), actúa como estimulador de las defensas en las plantas mediante la formación de fitoalexinas y como fungicida para

muchas especies del grupo de Oomicetos y otros hongos entre los cuales se destacan: *Phytium*; *Peronospora*; *Pseudoperonospora*; *Bremia*; *Botrytis* entre otros. En una gran cantidad de especies de plantas. Tiene como particularidad especial su comportamiento basipétalo y acropétalo y una acción sistémica y de buena residualidad dentro del tejido vegetal, ya que se presenta estabilizado con ácidos carboxílicos, para evitar su transformación muy rápida a ácido fósfórico.

Valagro, (2008^a) menciona que Agrifos es un fungicida preventivo basándose en fosfitos monopotásicos, su acción es generar metabolitos de estrés en el patógeno para la rápida producción de fitoalexinas dentro de la planta. Obtuvieron como resultados que Kendal y Agrifos fueron los fungicidas e inductores que presentaron los mejores controles en *P. sparsa* en las variables incidencia en tallos; incidencia en hojas y porcentaje de yemas no activadas en rosas en Colombia (Valagro, 2008^b).

7.5.- Quitosano

La quitina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, se encuentra presente en la cutícula de los crustáceos, exoesqueleto de artrópodos y en las paredes celulares de los hongos; esta muy asociada con sales inorgánicas, proteínas, pigmentos y lípidos. La quitina desacetilada se conoce como quitosano, polímero constituido fundamentalmente por unidades de glucosamina (2-amino-2desoxi-D-glucosa) con uniones de $\beta(1-4)$. Presentando una capacidad antifúngica, y en estudios *In vitro* se ha evaluado actividad en diferentes especies de

hongos, obteniendo como resultado que los estudios fundamentalmente han estado relacionados con el crecimiento micelial, la esporulación, la germinación y la morfología de las hifas y esporas (Hernández *et al.*, 2005).

En los frutos se ha observado la formación de barreras estructurales (papilas, lignificación, tilosas) que limitan la disponibilidad de nutrientes al patógeno, además de impedirles físicamente avanzar hacia el interior de los tejidos. El Ghaouth *et al.*, 2004; evaluaron a nivel ultraestructural el efecto del quitosano en el proceso de infección de *B. cinerea* en pimentón morrón, y observaron que el tejido no tratado e inoculado, la colonización del hongo se realizó rápidamente, causando la degradación de las paredes celulares del hospedero y de la lámina media; sin embargo, en los tejidos tratados con quitosano, el crecimiento de las hifas se restringió al sitio de infección. Los autores atribuyen este efecto en los tejidos donde se aplicó el quitosano a la formación de deposiciones en las paredes celulares, y al llenado de los espacios intercelulares con material fibrilar. Estudios posteriores permitieron corroborar este efecto dado que el tratamiento con quitosano estimuló la formación de barreras estructurales en pimentón morrón, siendo la observación más común el adelgazamiento de la pared celular en el hospedero, la formación de protuberancias celulares y el llenado de los espacios intercelulares con un material de naturaleza fibrilar.

Otros estudios mencionados por Hernández *et al.*, 2005, sugieren que el quitosano puede tener efecto fungicida o fungistático dependiendo de la

concentración a la que se utilice. A concentraciones de 1.5 % se le atribuye un efecto fungicida en el crecimiento de *B. cinerea*. *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Rhizoctonia stolonifer* asociado al grado de desacetilación del quitosano. En *B. cinerea* y *R. stolonifer*, se ha observado la salida de aminoácidos y proteínas del interior de la célula, manifestándose este efecto durante la hora siguiente de aplicación del tratamiento. Al realizar observaciones microscópicas, encontraron una forma anormal, y un crecimiento aéreo extraño del hongo. No obstante, la germinación de las esporas y la elongación del tubo germinativo sólo se afectaron con altas concentraciones de quitosano (6 mg/ml).

En frutos de manzana (*Malus pumila* Mill.) tratados con quitosano al 1.2 %, se observó que los conidios de *B. cinerea* exhibieron una forma anormal, inhibiéndose la germinación de los mismos y el crecimiento micelial. En aislamientos de *B. cinerea* de pimentón (*Capsicum annum* L.) las hifas tratadas con quitosano presentaban varios grados de desorganización celular que se manifestaban desde perder la consistencia de la célula hasta la degradación del protoplasma, mientras que en los tratamientos donde no se aplicó este biopolímero las hifas conservaron su apariencia normal (Hernández *et al.*, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Muestreos de unidades de producción de ornamentales.

Los muestreos se realizaron en las unidades de producción de ornamentales, las cuales podían tener o no cultivos de gerbera de corte o de pote en los estados Aragua y Miranda a partir de enero de 2008 a enero del 2011, efectuando por lo menos 3 visitas por año a cada finca. En el caso específico de la Colonia Tovar, la enfermedad produce grandes pérdidas en los cultivos hortícolas, es por ello que se efectuaron los muestreos en el cultivo de rosas en vista de la alta severidad de la enfermedad en este cultivo.

El tipo de muestreo que se realizó fue estratificado tomando en cuenta los pisos altitudinales y las condiciones agroclimáticas de cada unidad de producción; se hizo una toma de muestra de forma constante, siendo estas de diez (10) por cada una de ellas. Las muestras se colectaron tomando en cuenta los síntomas típicos de la enfermedad, siendo estos una podredumbre gris o moho gris, así como las manchas pardas y ovaladas en los pétalos de las flores; tomándose también aquellos síntomas anormales y de manchas que presentaban las flores y plantas. En esta actividad se procedió a tomar las coordenadas geográficas con GPS Map 76C Sx Garmin y la fecha de colecta, con el fin de poder pronosticar la distribución a las posibles zonas donde se produce la enfermedad. En vista de la poca información epidemiológica de la

enfermedad en el país, se procedió a efectuar la evaluación de la incidencia en los muestreos considerando la siguiente fórmula:

$$I: \frac{\text{Número de plantas enfermas} \times 100}{\text{Número de plantas Total}}$$

Con el fin de obtener algún tipo de información que permita hacer un estudio más detallado del comportamiento de la enfermedad en los diversos sistemas de producción y su posible manejo integrado.

Se realizó la selección de las cepas y/o unidades de producción en función a la presencia del patógeno en todos los muestreos efectuados desde el 2008 hasta diciembre del 2009. A partir de enero del 2010 hasta enero del 2011, se ejecutaron muestreos mensuales con la finalidad de evaluar el patrón de incidencia de la enfermedad; para ello se tomó una población de 200 plantas de gerbera de un mismo lote y edad con materiales genéticos diferentes pero ubicadas en el centro del invernadero, solo en el caso de la unidad de producción ubicada en la Colonia Tovar, se colectó del Cultivar Friddon de Rosas.

Las muestras fueron colectadas en bolsas de polietileno, previamente identificadas y se trasladaron al laboratorio Expertabiol de la Estación Experimental Experta, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela en Maracay, estado Aragua. Donde se procedió a realizar los análisis respectivos.

2.- Aislamientos e identificación de patógenos.

Descripción de los Síntomas.

Una vez trasladadas las muestras al laboratorio, se procedió a realizar la descripción de los síntomas observados, tomando en cuenta la forma y color de la lesión; presencia o no del signo de la enfermedad, así como la podredumbre del órgano afectado. Esto se realizó con la finalidad de evaluar si existe alguna sintomatología típica por zona geográfica o por material vegetal.

Aislamientos del patógeno

Para los aislamientos de *Botrytis* se tomó como referencia la metodología descrita por: Montes, (1992); Agrios, (1997); Carrero *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2006 y Cedeño *et al.*, 2007.

Una vez seleccionado el tejido dañado con el síntoma típico de la enfermedad, se procedió a lavar con abundante agua destilada estéril. Posteriormente se desinfectó con (NaClO) al 2 % durante 2 minutos, para luego secarlo con papel absorbente estéril y desde la zona comprendida entre el tejido necrosado y el sano, se tomó secciones de aproximadamente 2 mm, para luego sembrarlos en plato de Petri con Papa - Dextrosa - Agar acidificado (PDA ac.) e incubarlos en condiciones de 12 h luz/ 12 h oscuridad a $27 \pm 2^{\circ}$ C por 5 - 7 días.

Caracterización de las colonias.

Una vez obtenidas las colonias puras se procedió a sembrar en platos de Petri con PDA ac. y Agar Avena (AAv), bajo 12 horas luz y 12 horas oscuridad; conjuntamente con oscuridad total, por 7; 15 y 20 días. Para evaluar el diámetro de la colonia y las características morfológicas de las mismas, en cuanto a los siguientes parámetros establecidos por Ellis, (1971) para las distintas especies de *Botrytis*:

⇒ Micelio: Forma de crecimiento; color, tipo de crecimiento.

⇒ Conidióforo: deben ser evaluadas sobre el tejido afectado.

⇒ Conidias: deben ser evaluadas sobre el tejido afectado.

Las placas que se colocaron en total oscuridad, se evaluaron por un período de 15 a 20 días con el fin de obtener los esclerocios y de allí evaluar sus características en cuanto a su forma, color y tiempo de formación.

Este ensayo se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos y 6 repeticiones.

3.- Pruebas de patogenicidad.

Para esta prueba se tomó en cuenta las metodologías descritas por: French y Hebert, (1980); Garcés, (1997); Carrero *et al.*, 2003 y Hurtado, (2004).

Se procedió a efectuar 2 tipos de inoculación, en vista de los tipos de síntomas obtenidos en los muestreos; las cuales se describen a continuación:

⇒ **Inoculación del cuello de la planta:**

Se tomaron dos discos con micelio de una colonia pura del hongo con siete días de desarrollo en PDA Ac, y se colocó en el sustrato entre el cuello de la planta y las raíces. Luego estos discos fueron cubiertos con un algodón humedecido con agua destilada estéril. Las plantas una vez inoculadas, se colocaron en cámara húmeda en condiciones de laboratorio con 12 horas luz y 12 horas oscuridad y temperaturas de $16 \pm 2^\circ \text{C}$. Una vez transcurrido 2 días de la inoculación se procedió a realizar las evaluaciones hasta el día número 15.

⇒ **Inoculación de la parte aérea de la planta:**

Se procedió a tomar una colonia con 7 días de edad en medio de cultivo PDA Ac. En la cual se agregaron 20 ml de agua destilada estéril (ADE), posteriormente se efectuó un raspado de la colonia, y una agitación por 10 minutos para posteriormente evaluar su concentración y estructura predominante en la solución; en el caso donde se observó la presencia de conidias se utilizó una cámara de Neubauer y en la presencia de solo micelio se evaluó por campo. El método utilizado fue el de aspersión y las plantas se colocaron en cámara húmeda y en condiciones de laboratorio con 12 horas luz y 12 horas oscuridad a $16 \pm 2^\circ \text{C}$. Las evaluaciones se

efectuaron a partir de las 24 horas, tomando en cuenta los síntomas encontrados en cada una de las cepas.

Para cada una de los tipos de inoculaciones se utilizaron gerbera de maceta de la casa comercial Sakata, tipo Festival y se utilizaron 5 plantas por cada cepa seleccionada más las plantas testigo. Una vez obtenidos los síntomas se procedió a efectuar los aislamientos con el fin de comprobar los postulados de Köch. En cuanto a las características de cada colonia se realizaron los preparados microscópicos de los tejidos afectados con el fin de efectuar la caracterización de las cepas por el micelio; conidióforo (largo, ancho, pigmentación, tipo de base) y conidia (largo, ancho, pigmentación).

4.- Sensibilidad a fungicidas.

En este ensayo se consideraron los trabajos realizados por Montealegre y Vásquez, (1996) y Carrero *et al.*, 2003.

Se efectuó la incorporación de la dosis respectiva de cada uno de los fungicidas indicados en la **Tabla 5**, en los platos de Petri previamente esterilizado, y posteriormente se procedió a realizar el vaciado con 20 ml de medio de cultivo PDA. Una vez solidificado se efectuó la prueba de crecimiento y de germinación de conidias, tomando un plato de Petri con

el patógeno de 72 horas de edad y un crecimiento bajo las condiciones de 25 ± 2 °C en total oscuridad.

Evaluación de Crecimiento del micelio: En los platos de Petri con el fungicida se procedió a colocar en el centro un disco de 2 mm de diámetro de la colonia seleccionada, posteriormente se procedió a colocarlas en oscuridad total por 7 días evaluando el crecimiento diario de la colonia. Una vez terminado el ensayo se realizó el cálculo de porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio utilizando la fórmula empleada por Latiege, (1990).

$$\text{PICM} = 100 (\text{CC} - \text{CT}) / \text{CC}$$

Donde:

PICM: Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial

CC: Crecimiento del Control

CT: Crecimiento del Tratamiento

Evaluación de germinación de conidios y crecimiento del micelio:

Se tomó el plato de Petri con el fungicida y se procedió a esparcir una solución de una suspensión de conidios de 1 ml; en cuanto a la concentración de las conidios o de micelio, se consideró como referencia la que se utilizó en la patogenicidad. Posteriormente se incubaron por 48 - 72 horas a 16 ± 2 °C, para luego estimar el porcentaje de conidios o

micelio germinado en la placa a través del método de Leroux y Gredt, (1981).

En vista de la complejidad del ensayo, se realizó este ensayo por separado para cada cepa, tomando en cuenta un diseño experimental completamente aleatorizado, con 6 repeticiones por tratamiento.

Tabla 5.- Fungicidas seleccionados para la prueba de sensibilidad de cepas de *Botrytis* aisladas de ornamentales de los estados Aragua y Miranda.

Ingrediente activo	Nombre Comercial	Presentación	Dosis
Azoxystrobin	Amistar	Gránulos dispersables	0,5; 2; 5; 10; 100; 200; 500 y 1000 ppm i.a.
Benomilo	Fitosan	Polvo Mojable	
Iprodione	Rovral	Polvo Mojable	
Carbendazim	Derosal	Solución Concentrada	
Clorotalonil	Pugil	Polvo Mojable	

Una vez culminado este ensayo se procedió a seleccionar la cepa que presentó menor sensibilidad a los fungicidas y mayor virulencia en la prueba de patogenicidad para ser utilizada para los siguientes ensayos.

5.- Control In vitro de una cepa de *Botrytis* con inductores de resistencia.

En este ensayo se consideraron los trabajos realizados por Montealegre y Vásquez, (1996); Molina *et al.*, 2006 y Carrero *et al.*, 2003.

Se evaluó el crecimiento del micelio en las placas de Petri con el inductor de resistencia correspondiente al tratamiento (**Tabla 6**), se procedió a colocar en el centro un disco de 2 mm de diámetro de la cepa seleccionada, posteriormente se procedió a colocarlas en oscuridad total por 7 días donde se evaluó el crecimiento diario de la colonia. Una vez terminado el ensayo se procedió a realizar los cálculos de porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio utilizando la fórmula empleada por Latiege, (1990).

$$\text{PICM} = 100 (\text{CC} - \text{CT}) / \text{CC}$$

Donde:

PICM: Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial

CC: Crecimiento del Control

CT: Crecimiento del Testigo

En el caso de las cepas de *Trichoderma*, se realizó un enfrentamiento entre los hongos, colocando en los lados opuestos del plato de Petri con medio de cultivo PDA. En este ensayo se utilizaron dos productos comerciales siendo estos **Tricobiol** de uso común entre los productores y **Trico Plus A** con cepas nativas, las cuales fueron obtenida por medio de prácticas o técnicas de enriquecimiento, descrito por Hurtado *et al.*, 2007.

Tabla 6.- Inductores de resistencia seleccionados para la prueba de control *In vitro* de la cepa seleccionada de *Botrytis*

Tratamiento	Ingrediente activo	Abreviatura	Dosis	
1	Ácido Fosfórico (Agrifos)	Ag3	3 ml /l	0,06 ml/ capsula
2	Ácido Fosfórico (Agrifos)	Ag5	5 ml/l	0,1 ml/ capsula
3	Ácido Fosfórico (Agrifos)	Ag7	7 ml/l	0,14 ml/ capsula
4	Quitosano (Biorend)	Bd8	8 ml/l	0,16 ml/ capsula
5	Quitosano (Biorend)	Bd10	10 ml/l	0,2 ml/ capsula
6	Quitosano (Biorend)	Bd12	12 ml/l	0,24 ml/ capsula
7	Silicio (Quick-sol)	Qs2	2 ml/l	0,04 ml/ capsula
8	Silicio (Quick-sol)	Qs3	3 ml/l	0,06 ml/ capsula
9	Silicio (Quick-sol)	Qs5	5 ml/l	0,1 ml/ capsula
10	<i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Tr	Disco de 2 mm	
11	Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	TPA	Disco de 2 mm	
12	Ácido Fosfórico (Agrifos) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Ag3+Tr	3 ml/l + disco 2 mm	0,06 ml/ capsula
13	Ácido Fosfórico (Agrifos) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Ag5+Tr	5 ml/l + disco de 2 mm	0,1 ml/ capsula
14	Ácido Fosfórico (Agrifos) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Ag7+Tr	7 ml/l + disco de 2 mm	0,14 ml/ capsula
15	Quitosano (Biorend) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Bd8+Tr	8 ml/l + disco de 2 mm	0,16 ml/ capsula
16	Quitosano (Biorend) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Bd10+Tr	10 ml/l + disco de 2 mm	0,2 ml/ capsula
17	Quitosano (Biorend) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Bd12+Tr	12 ml/l + disco 2 mm	0,24 ml/ capsula
18	Silicio (Quick-sol) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Qs2+Tr	2 ml/l + disco de 2 mm	0,04 ml/ capsula
19	Silicio (Quick-sol) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Qs3+Tr	3 ml/l + disco de 2 mm	0,06 ml/ capsula
20	Silicio (Quick-sol) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricobiol)	Qs5+Tr	5 ml/l + disco de 2 mm	0,1 ml/ capsula
21	Ácido Fosfórico (Agrifos) + Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	Ag3+TPA	3 ml/l + disco de 2 mm	0,06 ml/ capsula
22	Ácido Fosfórico (Agrifos) + Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	Ag5+TPA	5 ml/l + disco de 2 mm	0,1 ml/ capsula
23	Ácido Fosfórico (Agrifos) + Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	Ag7+TPA	7 ml/l + disco de 2 mm	0,14 ml/ capsula
24	Quitosano (Biorend) + Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	Bd8+TPA	8 ml/l + disco de 2 mm	0,16 ml/ capsula
25	Quitosano (Biorend) + Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	Bs10+TPA	10 ml/lts + disco de 2 mm	0,2 ml/ capsula
26	Quitosano (Biorend) + Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	Bd12+TPA	12 ml/l + disco de 2 mm	0,24 ml/ capsula
27	Silicio (Quick-sol) + Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	Qs2+TPA	2 ml/l + disco de 2 mm	0,04 ml/ capsula
28	Silicio (Quick-sol) + Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	Qs3+TPA	3 ml/l + disco de 2 mm	0,06 ml/ capsula
29	Silicio (Quick-sol) + Mezclas de <i>Trichoderma sp</i> (Trico Plus A)	Qs5+TPA	5 ml/l + disco 2 mm	0,1 ml/ capsula
30	Testigo	Tes	Un disco del patógeno de 2mm	

Este ensayo se evaluó mediante un diseño experimental completamente aleatorizado, conformado por 30 tratamientos y 6 repeticiones.

6.- Control *In vivo* de una cepa de *Botrytis* con inductores de resistencia.

En este ensayo se utilizaron plantas de gerberas de pote tipo festival recién transplantadas en envases de polietileno número 14, con suelo estéril (tierra negra; fibra de coco; cascarilla de arroz y compost de caballo), el cual presentaba un pH de 5,5 – 6 y una Ce de 0,98 dS; estas plantas eran provenientes del Vivero Tropi Rosas C.A., las cuales se cultivaron en el umbráculo de la Estación Experimental Experta en la Facultad de Agronomía de la UCV, hasta efectuar la aplicación de los productos e inoculación.

El control de plagas se efectuó mediante la aplicaciones semanales de *Beauveria bassiana* (Cepa B068), del Laboratorio Expertabiol y se colocaron trampas de color amarillo y azules para el monitoreo de mosca blanca y trips. Se efectuaron aplicaciones semanales de fertilizantes hidrosolubles (Solucat 10-52-10; Nitrato de calcio; Solucat 20-20-20), tomando en cuenta la Ce de la solución y una vez obtenido los primeros indicios de la floración se comenzó a efectuar las aplicaciones foliares (dos) de los inductores de resistencia a las dosis seleccionadas en la **Tabla 7**, con 7 días de intermedio entre cada una de ellas; la selección de los tratamiento se realizó en función de los mejores resultados obtenidos en el control *In vitro*. Posteriormente se procedió a realizar la inoculación,

con la cepa de *Botrytis cinerea* (**seleccionada en el ensayo anterior**), haciendo una aspersión foliar del patógeno a partir de las 5:00 p.m., previamente se evaluó la concentración del inóculo mediante una cámara de Neubauer ($4,6 \times 10^5$ conidias/ml), de una colonia pura del hongo con siete días de desarrollo en plato de Petri con PDA Ac, en total oscuridad.

Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas por 10 días, tomando en cuenta la aparición de síntomas o signos de la enfermedad. En cuanto a la evaluación de los niveles de calcio y de potasio foliar, se tomó toda la parte aérea de 2 plantas al azar por cada tratamiento al tercer día después de la inoculación, estas fueron secadas en estufa a 100° C por 24 horas y se trasladaron al laboratorio de suelos del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Maracay, para su respectivo análisis. También se evaluaron características agronómicas durante la aplicación de los tratamientos tales como:

- Aparición de la hoja bandera.
- Largo de la hoja bandera.
- Evaluación del tejido afectado.
- Niveles foliares de Calcio y de Potasio.

Este ensayo se utilizó un diseño experimental de bloques al azar, conformado por 15 Tratamientos y 8 repeticiones (**Anexo 1**).

Tabla 7. Inductores de resistencia seleccionados para la prueba de control *In vivo* de la cepa seleccionada de *Botrytis*

Tratamiento	Descripción	Dosis
1	<i>Trichoderma</i> (Tricobiol)	0,25 g/l
2	Ácido Fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Trico Plus A)	3 ml/l + 0,25 g/l
3	Silicio + <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Tricobiol)	3 ml/l + 0,25 g/l
4	Quitosano + <i>Trichoderma</i> (Biorend + Tricobiol)	8 ml/l + 0,25 g/l
5	Ácido Fosfórico + <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Tricobiol)	5 ml/l + 0,25 g/l
6	Quitosano + <i>Trichoderma</i> (Biorend + Tricobiol)	10 ml/l + 0,25 g/l
7	Silicio + <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Tricobiol)	2 ml/l + 0,25 g/l
8	Ácido Fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Trico Plus A)	5 ml/l + 0,25 g/l
9	Ácido Fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Trico Plus A)	7 ml/l + 0,25 g/l
10	Quitosano + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Biorend + Trico Plus A)	8 ml/l + 0,25 g/l
11	Quitosano + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Biorend + Trico Plus A)	10 ml/l + 0,25 g/l
12	Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Trico Plus A)	0,25 g/l
13	Silicio + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Trico Plus A)	3 ml/l + 0,25 g/l
14	Silicio + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Trico Plus A)	5 ml/l + 0,25 g/l
15	Testigo	ADE

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Muestreo de fincas productoras de ornamentales de los estados Aragua y Miranda.

Al comenzar a ejecutar este trabajo, se encontró que en el país no existía ningún tipo de información en el área epidemiológica de la enfermedad en ningún rubro el cual nos impide conocer las poblaciones existentes, así como diseñar estrategias adecuadas para el manejo o control de la misma. Es por ello que en ésta investigación se efectuaron 160 muestreos (**Anexo 2**), los cuales permitieron estimar la incidencia de *Botrytis sp.* en 26 unidades de producción de ornamentales, desde enero de 2008 hasta enero 2011 (**Tabla 8**), en los estados Aragua y Miranda, considerando su ubicación geográfica con el fin de establecer criterios o factores que nos permita efectuar mediciones de la enfermedad.

Tabla 8. Porcentaje de incidencia de *Botrytis sp.* obtenido en los muestreos efectuados en los estados Aragua y Miranda a partir de enero de 2008 hasta enero de 2011 en unidades de producción de ornamentales.

	MUESTREOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	33	23	25	9	0	29	28	24	18
2	5	24	0	22	11	10	0	16	0	18
3	0	25	20	21	0	15	15	16	25	23
4	21	0	18	0	12	10	0	55	3	11
M 5	32	32	0	16	15	0	22	0	3	14
U 6	0	0	19	14	17	6	13	28	8	15
E 7	3	18	22	11	0	22	12	16	8	28
S 8	1,9	15	25	0	25	15	0	0	15	18
T 9	28	19	0	9	31	0	12	13	3	15
R 10	0	0	27	5	33	10	9	0	22	15
E 11	39	24	25	0	27	4	20	42	29	28
O 12	40	26	30	5	0	3	0	22	68	33
S 13	17	0	31	14	26	0	13	25	20	45
14	0	19	0	12	24	32	0	14	24	30
15	12	22	27	17	23	30	9	0	11	11
16	12	24	23	0	32	0	9	12	12	15
	210,9	281	290	171	285	157	163	172	275	337
	2.341,9 plantas enfermas									

En los muestreos se evidenció la existencia de diversos síntomas de la enfermedad, donde la caída del capítulo floral es la que mas pasa desapercibida y siendo esta una fuente importante de inóculo primario. En la **Tabla 8**, encontramos los diversos valores de la incidencia en cada uno de los muestreos realizados, siendo estos muy variables presentándose desde 0 hasta 68 % de plantas enfermas, aunque esta gran diferencia se debe principalmente a la virulencia del patógeno y no a las condiciones ambientales, ni del manejo del cultivo, como se pensaba en un principio (esto será aclarado con mayor detalle en la patogenicidad).

Por la información obtenida, se puede inferir que la enfermedad presenta una gran importancia para los productores, ya que en varios casos se presenta por lo menos en una época del año, lo que implica una pérdida y aumento de los costos en su control; pero solo en 6 unidades de producción no se presentó el problema, posiblemente por las medidas de bioseguridad y el manejo fitosanitario presentes en la misma, así como las condiciones ambientales desfavorables, como es en el caso de Súper Plántulas (Guayabita) y Califlor (Valle de Tucutunemo) en el estado Aragua (**Anexo 3**). Por otra parte solo se encontraron 5 fincas que presentaron algún síntoma de la enfermedad en plantas o flores en cada uno de los muestreos efectuados desde el 2008 hasta el 2010; lo cual permitió seleccionarlas como cepas para su estudio en este trabajo.

Al efectuar la selección de las unidades de producción o de cepas en función de los muestreos, se procedió a la identificación de cada una de ellas (**Tabla 9**). Encontrando diversos pisos altitudinales y ubicaciones geográficas, a pesar que en su mayoría se ubican en el municipio Guaicaipuro del estado Miranda. En el caso específico de Bot 04, fue seleccionada por presentar la mayor incidencia con 33 y 40 % de plantas enfermas en los muestreos preliminares. Posteriormente se efectuó el cálculo de la estadística descriptiva (**Anexo 4**), con la finalidad de conocer el número de muestreos necesarios para el estudio de la incidencia y su comportamiento en el tiempo; en nuestro caso por ser cultivos perennes esta evaluación se realizó en 12 muestreos (uno por cada mes) en cada una de las fincas seleccionadas.

Tabla 9. Unidades de Producción Seleccionadas

Cepa	Unidad de producción	Localidad	Municipio	Estado	Coordenadas	
					UTM	
Bot 01	Finca Monverana	Lagunetica – Vía Pozo de Rosas	Guaicaipuro	Miranda	Altura: 1.601 N: 10°20'56" W: 067°06'19,2"	19 P 707463 1144604
Bot 02	Finca La Noguera	Pozo de Rosas	Guaicaipuro	Miranda	Altura: 1.454 N: 10°21'49,6" W: 067°06'36,5"	19 P 706936 1146229
Bot 03	Flores Las Llanadas	Laguneta de la Montaña	Guaicaipuro	Miranda	Altura: 1.529 N: 10°20'05,2" W: 067°07'57,7"	19 P 704491 1143019
Bot 04	La Serenisima	La Lagunita	Tovar	Aragua	Altura: 1.862 N: 10°23'32,7" W: 067°17'34,1"	19 P 686901 1149281
Bot 05	Vivero Los Montes Verdes	Los Teques	Guaicaipuro	Miranda	Altura: 1.229 N: 10°19'50,9" W: 067°04'00,1"	19 P 711705 1142601

Al evaluar el comportamiento de la enfermedad entre enero del 2010 – 2011, encontramos un comportamiento distinto en cada una de las unidades de producción seleccionadas (**Figura 2**) o cepas seleccionadas, siendo la tendencia una enfermedad policíclica (cadena de ciclos de infección o serie de procesos monocíclicos los que se dan en tiempo y espacio) Hernández, (2005). Mientras que en el caso específico de **Bot 01** es monocíclica, por la forma que esta curva presenta (Ulacio, 2011). Sin embargo en el caso específico de **Bot 04 – Bot 05**, fue donde se presentaron disminuciones de la población en el mes de agosto, posiblemente por las pocas precipitaciones en la zona; por lo tanto no hubo aumento considerable de la humedad relativa y las condiciones ambientales no fueron favorables en estas unidades de producción; luego

continuó su desarrollo. Siendo **Bot 05**, la cepa con la mayor incidencia en 7 meses del año, haciéndola una de las cepas con más permanencia y viabilidad.

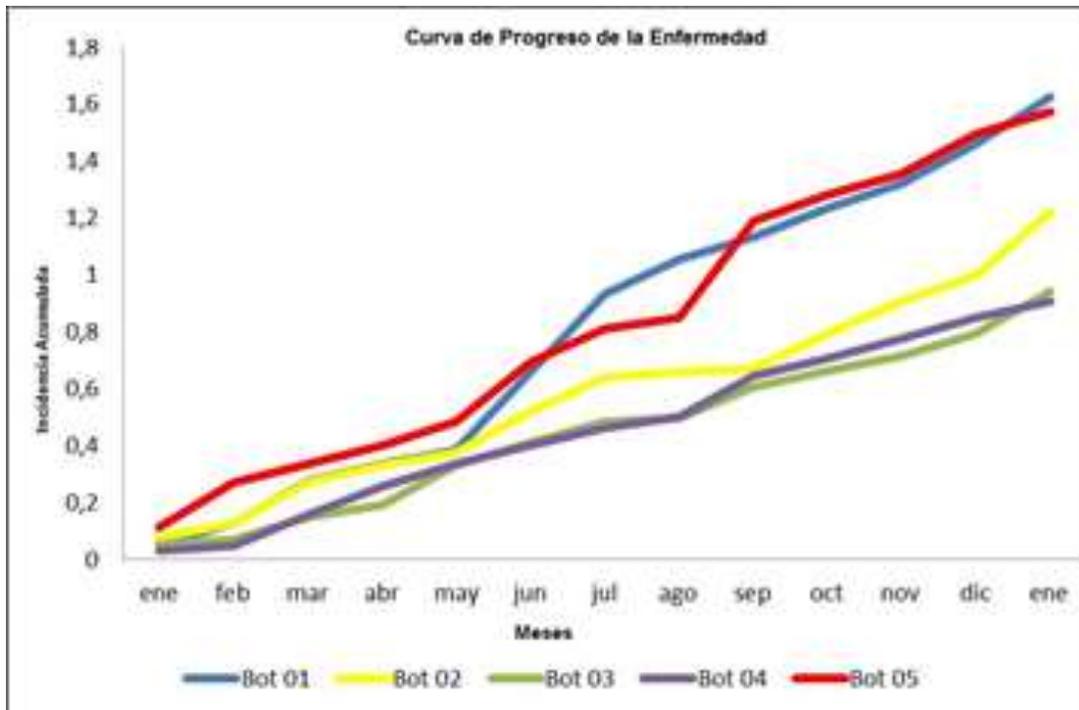


Figura 2. Curva de progreso de la enfermedad desde el enero de 2010 al enero de 2011 en las unidades de producción seleccionadas para el estudio de *Botrytis sp.* en ornamentales.

Al evaluar los resultados obtenidos en este trabajo, se demuestra que existe suficiente material para efectuar posteriores estudios de *Botrytis*, considerando los parámetros epidemiológicos, pero deben incluirse todos los cultivos presentes en una zona determinada, donde se pueda generar una epidemia, tal como fue el caso del estudio realizado por Gepp *et al.*, 2012. Estos estudios nos permitirían efectuar controles adecuados de la enfermedad, considerando las prácticas agronómicas las cuales sirven para bajar la población del inóculo. Castaño y López (2011), señalan el

éxito en la integración de los métodos de control mildiú veloso en rosas (*Peronospora sparsa*), y las prácticas de manejo permitieron incluir el modelo logístico planteado por Van Der Planck (1963), logrando disminuir la enfermedad en cualquier punto de la epidemia, reduciendo el inóculo inicial, y acortando la velocidad de desarrollo de la epidemia al reducir la duración del ciclo.

2.- SINTOMATOLOGÍA

Al efectuar los muestreos se encontró con la presencia de diversos síntomas de la enfermedad en el cultivo, algunos de ellos son de fácil identificación pero otros pasan desapercibidos y tienden a ser confundidos con otros problemas fitosanitarios, causados por otras enfermedades bióticas y abióticas, de las cuales se requiere de un conocimiento o experiencia en el manejo del cultivo para poder diferenciar uno de los otros. Estos síntomas se distinguen en 3 grupos; siendo estos los presentes en flores; manchas foliares y marchitez o podredumbre de la planta. A continuación se realiza una descripción de cada uno de ellos:

2.1.- Sintomatología en Flores

Los síntomas en las flores son diversos, estos se pueden distinguir en manchas pardas en los pétalos; Manchas acuosas de los pétalos;

formación de tela; caída del capítulo y deformación del capítulo; los cuales se describen con detalle a continuación:

⇒ **Mancha parda en los pétalos:**

Se evidencia una mancha de forma alargada; ovalada o irregular de color pardo claro a pardo oscuro, lo cual va a depender directamente del color de la flor (**Figura 3**). Al inicio se pueden observar pequeñas manchas como salpicadura de color marrón, las cuales pueden encontrarse de forma dispersa en el pétalo y la flor, o este puede ser su único síntoma; en algunas ocasiones se observó un quemado en la punta de los pétalos y en el borde de los mismos cuando las temperaturas variaban entre 12 y 15° C entre el día y la noche. Pero nunca son manchas acuosas, siempre se caracterizan por ser secas o hundidas. Estos síntomas concuerdan con los señalados por Cabrera *et al.*, 2003.

Este tipo de síntoma se evidencia principalmente en la primera hilera de pétalos y escasamente se observó daño en los pétalos inferiores de la flor, al menos que esta se encuentre en el punto de cosecha o este haya pasado.



Figura 3. Mancha parda de la flor: A: Manchas en forma de salpicadura; B: Quemado de las puntas y bordes de los pétalos; C: Mancha parda

En algunas unidades de producción donde se efectúan aplicaciones de algún tipo de inductor de resistencia o fertilizaciones de nitrato de calcio foliar, en los materiales de color blanco se evidenció la presencia de un halo rojizo y diferentes tonalidades de marrón en la misma flor (**Figura 4**), estos pueden ser como salpicaduras o manchas ovales a irregulares en los primeros pétalos, presentando un centro mucho más oscuro. Este síntoma en particular ha sido indiferente del híbrido y de la casa comercial, así como de las condiciones ambientales. Las lesiones observadas concuerdan con lo descrito por Bañon *et al.*, 1993; Cabrera *et al.*, 2003; Moorman, (1999) y Hurtado *et al.*, 2001. Es de importancia señalar que no se observó la presencia de signo de la enfermedad en ninguna de las muestras colectadas, pero al efectuar el aislamiento se encontraron colonias con las características de *Botrytis*.

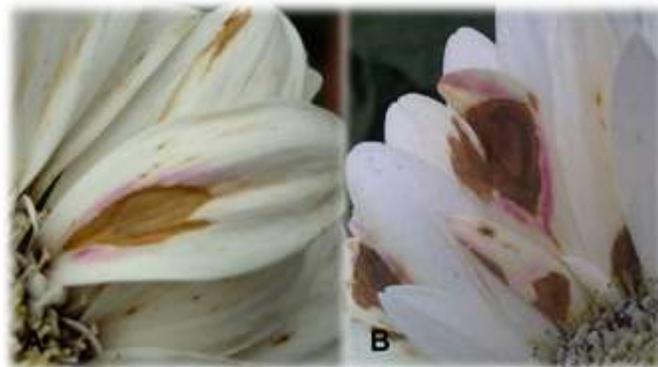


Figura 4. Mancha parda de los pétalos con presencia de halo rojizo

⇒ **Mancha acuosa de los pétalos:**

Son manchas pardas claro con aspecto acuoso o con podredumbre, generalmente con la presencia del signo de la enfermedad, caracterizado por un micelio gris y al efectuar la extracción del capítulo se puede observar como se desprende un polvo (conidias), siendo estas uno de los principales vehículos de diseminación. Este síntoma se presenta en los pétalos inferiores de las flores, sin importar el grado de madurez o punto de cosecha de la misma (**Figura 5**); este síntoma corresponde al señalado por Oszkinis y Lisiecka, (1990) para el cultivo.



Figura 5. Síntoma de la mancha acuosa de los pétalos. A: Síntoma inicial en una flor sencilla; B: Presencia del signo en una flor madura

Este tipo de daño solo se observó en aquellas unidades de producción, en el cual su sistema de riego es por aspersión o por riego con manguera, los cuales generan una película de agua sobre la flor, desde el centro de la planta o en el crecimiento de la misma.

⇒ **Formación de la tela:**

Es un síntoma que generalmente se encuentra en post cosecha, a las 24 o 48 horas después de armar los paquetes o bouquet; y se evidencia un micelio algodonoso de color blanco o gris en el centro de la flor o flores verdaderas (**Figura 6**). Esta es la sintomatología más mencionada de la enfermedad y la que causa muchas pérdidas a nivel de post cosecha, en vista que al existir una flor con ese problema automáticamente se debe eliminar el paquete y todos los que se encuentran a su alrededor. En algunas ocasiones este problema se evidencia en las floristerías; este síntoma corresponde a los señalado por Bañon *et al.*, 1993; Bigre *et al.*, 1990; Oszkinis y Lisiecka, (1990) para *Botrytis cinerea*.

Existen casos donde se observó la presencia de la salpicadura parda y la tela, pero generalmente se encontró en flores blancas y amarillo claro.



Figura 6. Síntoma de la tela en flores.

⇒ **Caída del capítulo:**

En este caso se observa cuando la flor se encuentra cerca de su madurez fisiológica y existe un doblez en la base del capítulo, se diferencia de un problema de estrés hídrico porque solo se puede ver en una o dos flores, mientras que en el otro caso son todas las flores de la planta (**Figura 7**).



Figura 7. A: Síntoma del capítulo caído; B: Estrés hídrico en la planta.

Generalmente este tipo de síntoma pasa muy desapercibido en el cultivo y se consideraba como un problema de origen fisiológico, pero al efectuar cortes longitudinales y transversales se observa una pudrición blanda justo en la base y con una deformación de los sépalos. El daño causado al peciolo presenta tejido en putrefacción seguido de un borde marrón oscuro o marrón claro, muy rara vez se evidenció la presencia de un halo o tejido momificado en este. En la base del capítulo puede estar necrosado completamente o solo una parte de este de igual manera en

las semillas, sin embargo al tomar semillas con o sin el síntoma de la enfermedad y al colocarlas en cámara húmeda estas presentaron el signo de la misma; siendo este un vehículo primario para la diseminación de la enfermedad así como la formación de una epidemia bajo las condiciones ambientales optimas, (**Figura 8 y 9**). Hasta los momentos no se ha encontrado ningún trabajo científico que señale este síntoma como parte de la infección causada por *Botrytis* sobre el cultivo.

En las unidades de producción muestreadas en el estado Aragua se observaron flores con la caída del capítulo y con manchas pardas en los pétalos, generalmente en aquellos híbridos de colores amarillo; naranja y blanco (**Figura 9**), también en estas inflorescencias se evidenció que la pudrición de la base o de las semillas siempre comenzaba por un lado de las flores, donde se encontró la mayor cantidad de manchas. De igual manera todas las semillas al colocarlas en cámara húmeda presentaron el signo del patógeno.



Figura 8. Pudrición de la base del capítulo. A: Sintomatología externa de la pudrición de la base del capítulo y deformación de los sépalos de la flor; B: Corte longitudinal del capítulo; C: Detalle del avance de la pudrición en el peciolo floral



Figura 9. Detalle de los daños en los capítulos. A: Flor sana; B: Pudrición en la base del capítulo y daño en flores verdaderas y semillas, así como pétalos con la mancha parda.

⇒ **Deformación de la flor:**

En algunas ocasiones se evidenció la presencia de malformaciones de las flores en las unidades de producción, estas puede ser un aplanamiento hacia un lado del capítulo; apertura desuniforme de los pétalos; deformación de los sépalos o exposición de las flores masculinas en lugares inadecuados o la expansión de todos los pétalos hacia atrás (**Figura 10**). Ninguna de esto tipos de síntomas presentaban podredumbre ni la presencia de algún signo de la enfermedad, pero al colocar estas flores en cámara húmeda y tomar tejido aparentemente sano y sembrarlo en medio de cultivo P.D.A ac. Se presentó el hongo *Botrytis sp.* en todos los puntos de siembra. Oszkinis y Lisiecka, (1990) señalan que parte de los síntomas encontrados en el cultivo por causa de esta enfermedad, es que los botones florales infectados no se desarrollan totalmente y no llegan a abrir.

Cuando se dejan estas flores en el campo se observó que a partir de los 7 días se evidenciaban la esporulación del hongo principalmente en la base

de capitulo, tomando cierta agresividad en el tejido infestado; sin embargo el peciolo no presentó daño total sino a medida que avanzaba la enfermedad (**Figura 10**).



Figura 10. Deformación de las flores. A: Aplanamiento del capítulo; B: Apertura des uniforme de los pétalos; C: Deformación de los sépalos; D: Expansión de los pétalos hacia atrás; E-H: Presencia del signo de la enfermedad a partir de los 7 días después de la identificación en campo.

Como regla común en las plantas donde se evidenció el síntoma de la deformación de la flor, se presentaba como característica principal el daño en una o dos inflorescencias a partir del 4^{to} mes del comienzo del proceso de producción (**Figura 11**), desde el momento que se podía identificar la presencia de la enfermedad, hasta que la flor presentaba el signo; la planta no producía ningún otro botón floral. La planta suprimió su sistema reproductivo, o para evitar el avance de la enfermedad tenia está respuesta, esto debe ser estudiado en investigaciones posteriores

con el fin de establecer si existe algún tipo de relación entre la parte bioquímica de la planta y la del patógeno.



Figura 11. Presencia de del síntoma de la deformación de la flor en el cultivo.
A: Síntoma inicial; B: Síntoma a los 7 días.

2.2.- Sintomatología foliar

En cuanto a las manchas foliares estas se diferencian de dos grupos: las pudriciones blandas y las manchas necróticas momificadas.

⇒ **Manchas blandas:**

Son manchas necróticas de 2 a 3 mm inicialmente, comienza con un punto necrótico y con la presencia de un halo amarillo, se encuentran dispersas en toda la lámina foliar (**Figura 12**) y en algunas ocasiones si

las condiciones ambientales son favorables estas llegan a coalescer y formar una gran mancha blanda o acuosa, siendo estas muy similares a las causadas por bacterias, diferenciándose en algunas ocasiones con la presencia del signo del hongo. Esta sintomatología se observó en aquellas unidades de producción donde se encontraban condiciones ambientales con mucha nubosidad; poca entrada de luz; o con la utilización de mallas sombras de color negro y temperaturas de 16 a 18° C, siendo en las hojas banderas y las cercanas a ellas las más afectadas. Estos síntomas concuerdan con lo señalado por Oszkinis y Lisiecka, (1990); Moorman, (1999) y Williams-Woodward, (2007).



Figura 12. Manchas blandas en hojas banderas.

⇒ Manchas Pardas:

Son manchas pardas momificadas con la presencia de un halo color violeta o púrpura, generalmente se forman en los bordes de las hojas y avanzan hasta la nervadura principal y se observa fácilmente el signo de la enfermedad (**Figura 13**). Este tipo de síntomas se evidenció en condiciones de estrés nutricional o por intoxicación de agroquímicos en el cultivo y si las temperaturas se encuentran entre los 18 – 20° C o existe una alta humedad relativa mayor del 90 % y/o diferencias de temperaturas entre el día y la noche de 10 – 15° C. Una característica observada en este tipo de sintomatología es la presencia de un aroma a podredumbre existente en el ambiente del invernadero.

Al tomar estas hojas y colocarlas en cámara húmeda, el patógeno se reproduce velozmente bajo estas condiciones (**Figura 14**), lo cual indica que al cambiar las condiciones ambientales en la unidad de producción la enfermedad se vuelve muy agresiva pudiendo causar grandes daños al cultivo en un corto periodo de tiempo, si no se realizan los controles adecuados tomando en cuenta los productos que puedan bajar la densidad o población del patógeno o efectuar prácticas culturales, tales como el deshoje del cultivo. Estos síntomas concuerdan con lo señalado por los siguientes autores: Bigre *et al.*, 1990; Oszkinis y Lisiecka, (1990); Bañon *et al.*, 1993; Hurtado *et al.*, 2001; Williams-Woodward, (2007).



Figura 13. Mancha parda foliar. A: Mancha momificada con el signo de la enfermedad sin halo; B: Mancha momificada con el signo de la enfermedad con el halo púrpura.

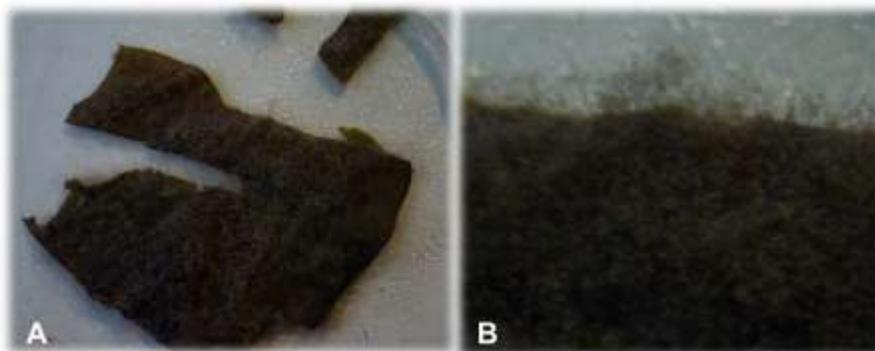


Figura 14. Hojas con mancha parda colocadas en cámara húmeda. A: Detalle general; B: Formación de estructuras reproductivas de *Botrytis*

2.3.- Marchitez de la planta

Hasta los momentos los únicos reportes señalados con marchitez causada por *Botrytis sp.* son los Oszkinis y Lisiecka, (1990); Moorman, (1999); Hurtado *et al.*, 2001 y Daugrey, (2011).

Al efectuar los muestreos era común encontrar plantas de gerbera de pote con presencia de deficiencias nutricionales que presentaban muerte o marchitamiento del ápice o cuello de la planta, generándose un aroma muy característico de pudrición, pero esta no presentaba flujo bacteriano (**Figura 15**). Dicha marchitez presentaba una coloración negra en los peciolos de las hojas, las cuales se extraen fácilmente y en algunas ocasiones se evidenciaba un color amarillento principalmente en hojas bajas o primeras hojas de la planta, las cuales al transcurrir unos 5 a 7 días se podía observar la presencia del signo típico de la enfermedad.



Figura 15. Síntomas de marchitez causada por *Botrytis sp.* en gerbera de pote. A: Síntoma de deficiencia y de la enfermedad; B: Planta con el signo en hojas bajas

En el caso de las gerbera de corte, se evidenció una marchitez repentina o violenta de la planta. En el ápice se encontró la presencia de un micelio blanco el cual se puede confundir fácilmente con los tricomas de la planta, solo cuando se manifestaban los conidióforos y las conidias es que éste cambia de color a gris claro o gris oscuro. Al extraer las flores se observó que los tejidos se encuentran blandos y con un leve hundimiento y al

efectuar los cortes longitudinales, se pudo ver un oscurecimiento del tejido (epidermis, parénquima y haces vasculares) **Figura 16.**

Este tipo de síntomas es el más severo, ya que cuando se logra divisar la marchitez, la planta se encuentra bastante afectada (**Figura 16 C**). De igual manera que en el caso de las gerberas de pote al entrar al invernadero se percibe un aroma que es característico de la enfermedad, tal como lo señala Jasen, (2009), siendo estos compuestos volátiles dentro del invernadero.



Figura 16. Síntoma de la marchitez causada por *Botrytis sp.* en gerbera. A: Presencia del signo en el ápice de la planta; B: Síntoma en los peciolo; C: Vista del cultivo

Las hojas inicialmente presentan un doblez y pérdida de turgencia, los peciolo varían de color dependiendo del avance de la enfermedad, siendo estos desde color púrpura, marrón claro hasta negro; generalmente comienzan con las hojas maduras y posteriormente se ven afectadas las hojas banderas, las cuales presentan una severa deshidratación. Los tallos florales pueden estar o no doblados o caídos, todo depende del avance de la enfermedad; ya que se observó en algunas ocasiones que se encontraban todas las hojas marchitas y los tallos erguidos, no perteneciendo estas plantas al mismo híbrido. Al extraer la planta se observó el daño en el rizoma y en las raíces, con la presencia de un

micelio blanco que rodea la rizodermis, y al efectuar el corte transversal se puede encontrar los tejidos de color gris claro, cuando lo general es de color blanco y con los vasos xilemáticos de color naranja en vez de amarillos (**Figura 17**). La enfermedad se logra controlar si el rizoma no se encuentra totalmente afectado y al igual que en el caso de las manchas foliares se percibe un aroma a podredumbre dentro del invernadero, el cual tiene unas características muy particulares, ya que se siente un fuerte olor a descomposición de alcoholes y/o azúcares; lo cual nos permite en un momento determinado detectar la enfermedad en el sistema productivo; esta característica del problema se le denominó por técnicos y productores como aroma a *Botrytis*.



Figura 17. Detalle de la marchitez causada por *Botrytis sp.* A: Síntoma más visible de la marchitez; B: Deterioro del tallo y raíces; C-D: Signo del patógeno en las raíces

3.- Características morfológicas de los aislamientos de *Botrytis sp.* Mediante observaciones macroscópicas y mediciones microscópicas.

Una vez que se seleccionaron las unidades de producción y se efectuó la identificación de las cepas, se procedió a efectuar muestreos y de allí se efectuaron las mediciones en el hospedante. Estas a su vez se corroboraron con las obtenidas en la patogenicidad.

Se encontramos con 2 cepas muy virulentas, siendo estas Bot 04 y Bot 05 (**Tabla 10**), mientras que las otras cepas mostraron otras características las cuales al efectuar la patogenicidad se comparó su agresividad frente al hospedante. Cada cepa presentaba las siguientes características:

⇒ **Bot 01**: Esta cepa se encontraba afectando principalmente flores, evidenciándose la mancha parda; deformación del capítulo y caída del capítulo, siendo este el síntoma más notorio en la plantación y el menos considerado como daño por el patógeno. Solo se observó la presencia del signo cuando la humedad relativa pasaba del 90 % o las temperaturas se encontraban entre los 16 y 18° C. Su micelio es liso, pigmentado y de septas cortas, mientras que el conidióforo es hialino y dicotómico (**Figura 18**), en la base se encuentran de 2 a 3 hifas o clavos de penetración y sin llegar a formar un estroma, generalmente se encuentran de 3 conidióforos germinando en un radio de 368 μ y nunca se encontró la emergencia de estos por estomas (**Tabla 10**).

Presenta 3 formas de conidios hialinos elipsoides; ovoides y piriformes (**Figura 18**). Las características anteriormente descritas concuerdan con las determinadas por Ellis, 1971 para *Botrytis cinerea* Pers; diferenciándose de *B. allii* por la presencia de pocos conidióforos y la no presencia de conidias con septas en los tejidos ni en medios de cultivos.

Tabla 10. Datos de las estructuras de las cepas evaluadas directamente en el Hospedante

Cepas	Micelio		Conidióforo					Conidios			Germinación de conidióforos		Obser.	
	Ancho µm	Septas µm	Tipo	Largos	Cortos	Pigmen	Ramifica_ ción	Células Conidia- les	Tamaño µm	Forma	Color	#/ punto		Estoma
Bot 01	6,09	35,45	Lisos	-	Si	-	Dicotómica -mente	Infladas	6,6 x 11,06	Elipsoides ; ovoides y piriformes	Hialinos	3	No	
Bot 02	6,29	40,72	Lisos	Si	-	-	Tricotómica -mente	Infladas	8,1 x 13,4	Ovoides y piriformes	Hialinas	3	No	
Bot 03	17,98	91,96	Lisos	-	No	Si	Dicotómica -mente	Infladas	6,8 x 12,6	Ovoides	Hialinas	1	No	
Bot 04	18,40	81,82	Lisos	Si	-	Si	Tricotómia- mente	Infladas	7,6 x 10,84	Elipsoides ; esféricas; sub esféricas; ovoides	Pigmen- -tados	3	Si	
Bot 05	20,57	88,31	Lisos	Si	-	Si	Tricotómia- mente	Infladas	7,8 x 12,20	Elipsoides ; esféricas	Hialinas	6	Si	Micelio con crecimiento interno

Pigmen: Pigmentación

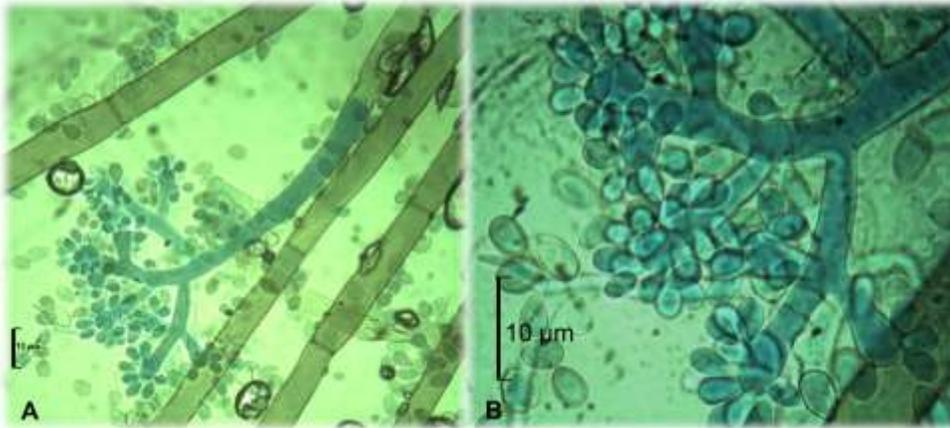


Figura 18. Cepa Bot 01. A: Micelio y Conidióforo; B: Formas de conidio

⇒ **Bot 02:** Esta cepa se obtuvo de flores con el capítulo caído y de manchas foliares sin halo púrpura, siendo estas últimas el síntoma típico de la enfermedad en el cultivo, pero para el desarrollo de la enfermedad es necesario una película de agua sobre los tejidos. Su micelio es pigmentado, con paredes lisas y septas cortas (**Tabla 10**); los conidióforos no forman estroma, son capaces de germinar desde la epidermis de la hoja con un promedio de 3 en un radio de 368μ y los tricomas no representan una barrera mecánica para estos (**Figura 19**); son largos con una ramificación tricotómica. Del grupo de cepas evaluadas estas son los conidios más grandes, siendo estas de $8,1 \times 13,4 \mu$, ovoides en su gran mayoría aunque se pueden encontrar algunas piriformes (**Figura 20**), son pigmentadas y de 3 - 5 por célula conidiogena, rara vez se encontraron más de 5.

En vista de que en la unidad de producción donde fue obtenida esta cepa se cultivan otros rubros de ornamentales y hortalizas es necesario efectuar la comparación entre diferentes especies del género *Botrytis*. Por las características anteriormente descritas nos encontramos con *B. cinerea* Pers (Ellis, 1971), diferenciándose de otras especies del género por presentar

pocos conidióforos y por la forma de los conidios como es en el caso de *B. allii*; y con *B. byssoidea* porque el micelio es densamente algodonoso en el hospedante y en la colonia. En el caso de *B. convulata* o *Sclerotinia convulata*, esta especie afecta solo los rizomas.

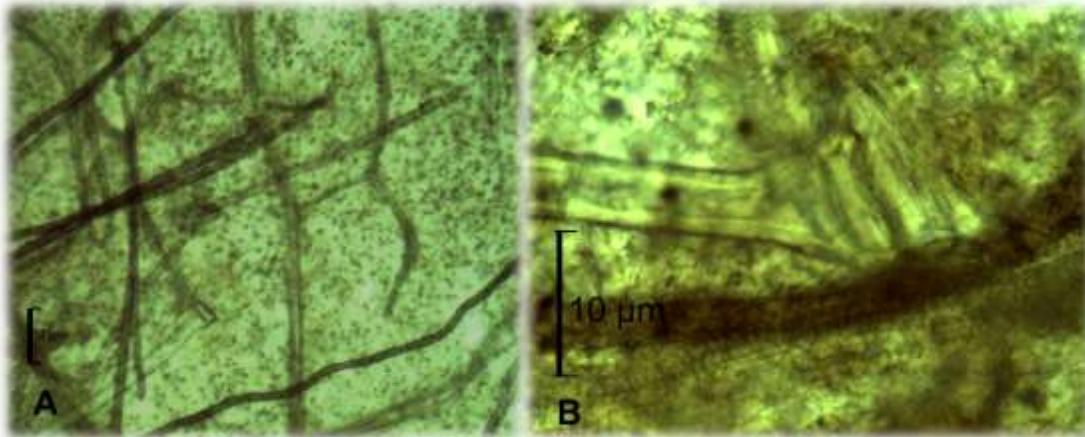


Figura 19. Cepa Bot 02. A: Conidióforos en el tejido vegetal; B: Detalles de los tricomas



Figura 20. Cepa Bot 02. A: Detalle de la ramificación del conidióforo; B: Conidias

⇒ **Bot 03:** esta cepa fue obtenida de las flores, específicamente de la formación de la tela en el centro del capítulo y de la mancha acuosa de los pétalos. Presenta un micelio liso, pigmentado y de septas largas (91,96 μm),

siendo éste el caso del valor más alto al compararlas con las otras cepas. Los conidióforos germinan en forma solitaria (**Figura 21**), no forma estroma, sobre de la epidermis; son hialinos en las células conidiales y pigmentados en la base; su ramificación es dicotómica (**Figura 22**). Sus conidios son hialinos y ovoides. Estas características corresponden al género de *Botrytis* y por las dimensiones de y forma de las conidias a la especie *B. cinerea* (Ellis, 1971).

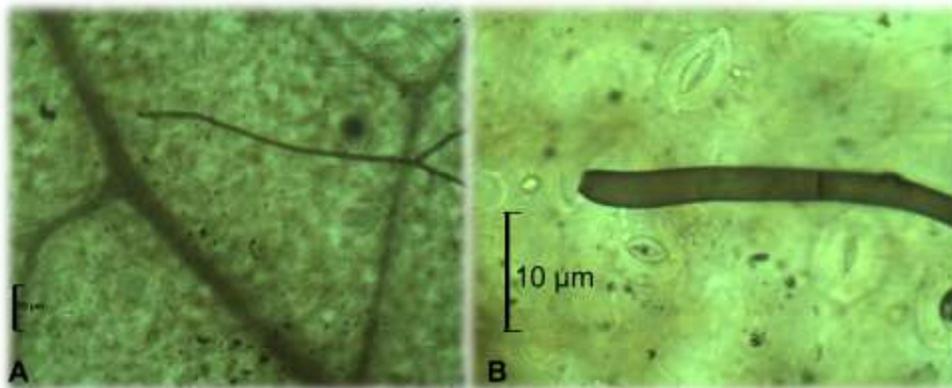


Figura 21. Cepa Bot 03. Germinación del conidióforo en el tejido vegetal

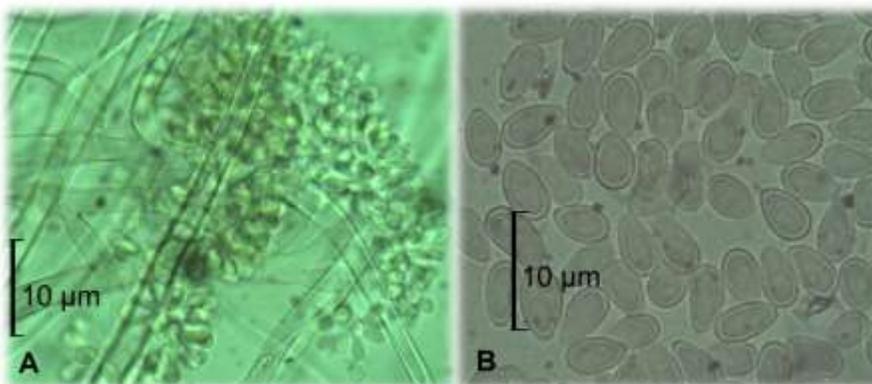


Figura 22. Cepa Bot 03. A: Ramificación del conidióforo; B: Conidios

⇒ **Bot 04:** Ésta es la única cepa que no fue obtenida de gerbera, sin embargo fue considerada para este estudio por su comportamiento en la zona agrícola de importancia para el estado Aragua. Las estructuras fueron tomadas de peciós y pétalos de rosas con el síntoma y signo característicos de la enfermedad. Donde se puede apreciar la presencia de un micelio pigmentado,

liso de septas largas; las hifas ocurren en grupos de 3 las cuales germinan por lo menos 1 de ellas de los estomas y de esta manera invaden el tejido (**Figura 23**). Los conidióforos son largos; pigmentados con una ramificación tricotómica (**Figura 24**); esta cepa es la que presenta la mayor variedad de conidios siendo estos elipsoides; esféricos; sub esféricos y ovoides, pero todas son pigmentadas. Por las características de las dimensiones de las conidias antes descritas se ubican en la clave de Ellis, (1971) con diversas especies entre ellas *cinerea*; *allii*; *bysoidea*; *porri*; *convoluta* y *narcissicola*. Pero al efectuar la comparación de otros parámetros se encontró que *B. allii* presenta conidios pyriformes o cuneiformes y ocasionalmente con septas; mientras que *B. porri* presenta un conidióforo muy largo e irregular lo cual no concuerda con lo encontrado en esta cepa. En cuanto a *B. bysoidea* presenta pocos conidióforos, pero *B. convoluta* parasita solo a los rizomas de iris y *B. narcissicola* en una enfermedad que ataca en forma repentina con micelio liso y gris, y con conidios pardo claro, a pesar que las características de los conidios concuerdan con la encontradas, el color del micelio en el hospedante no concuerda con esta especie; sin embargo por la cantidad de ramas presentes en los conidióforos, la diversidad en la forma de los conidios dentro de una misma cepa y el órgano afectado, se puede identificar como *B. cinerea*.

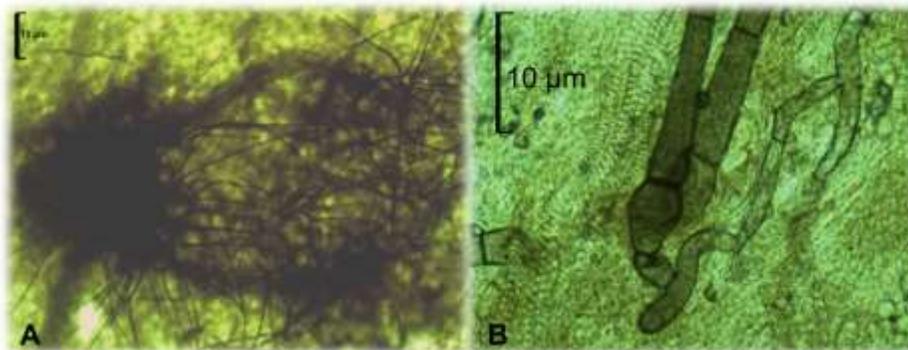


Figura 23. Cepa Bot 04. A: Grupo de micelios que conforman el estroma; B: Germinación del micelio

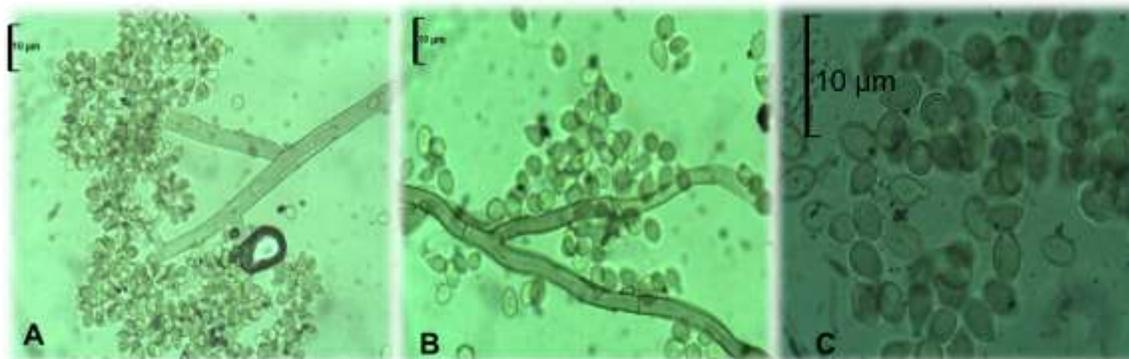


Figura 24. Cepa Bot 04. A: Conidióforos; B: Micelio; C: Diversidad de conidias presentes en la cepa

⇒ **Bot 05:** Esta cepa fue obtenida de la plantación donde se observaron como síntomas específicos la mancha acuosa de la flor y la marchitez de la planta. Su micelio es pigmentado y es la que presentó los mayores valores correspondientes al ancho ($20,57 \mu\text{m}$) y al largo de las septas ($88,31 \mu\text{m}$), se presenta en forma abundante en la lamina foliar y se puede observar su desarrollo dentro de la hoja (**Figura 25**). Los conidios al germinar lo pueden hacer directamente sobre la epidermis o por los estomas y generalmente se pueden observar 6 puntos en un radio de 368μ ; la base de estos micelios presentan formas distintas y de patrones de crecimiento diferentes.

Salinas y Verhoeff 1995, estudiaron la formación de lesiones en las flores liguladas de gerbera con dos cepas de *B. cinerea*, encontrado que no existe diferencias en la reacción después de la inoculación con los conidios de cualquiera de los aislamientos en cualquiera de cultivar. Se pudo observar que los conidios fueron capaces de producir entre 1 - 5 tubos germinativos menores a $10 \mu\text{m}$, no se evidenció la formación apresorios o otras estructuras especializadas antes de la penetración, y no se produjo la degradación de la cutícula.

Los tricomas no ejercieron ningún tipo de barrera física para el desarrollo de los tubos germinativos. Los conidióforos son largos; pigmentados y de ramificación tricotómicamente; los conidios son hialinos elipsoides; esféricas y ovoides y se pueden observar más de 10 por cada célula conidiales, lo que la hace muy virulenta (**Figura 26**). Todas las características antes descritas concuerdan con las mencionadas por Ellis, (1971) con *B. cinerea*.

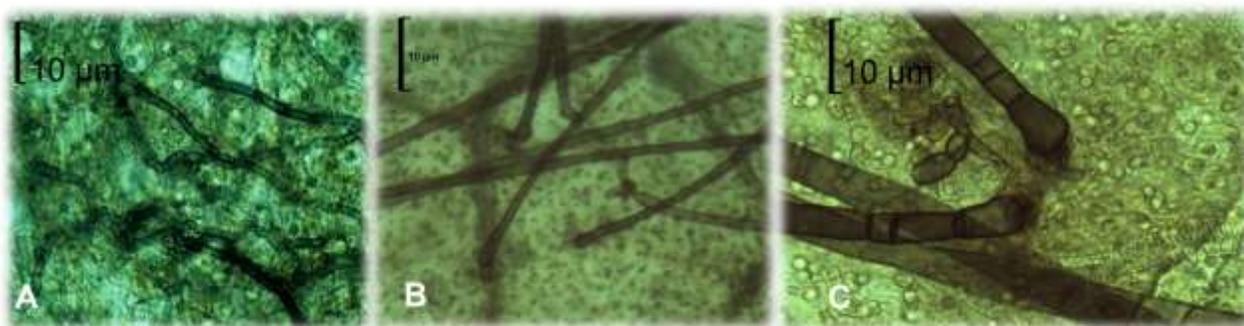


Figura 25. Cepa Bot 05. A: Micelio desarrollado internamente en el tejido; B: Germinación del micelio en un radio de 368 µ; C: Base de los conidióforos

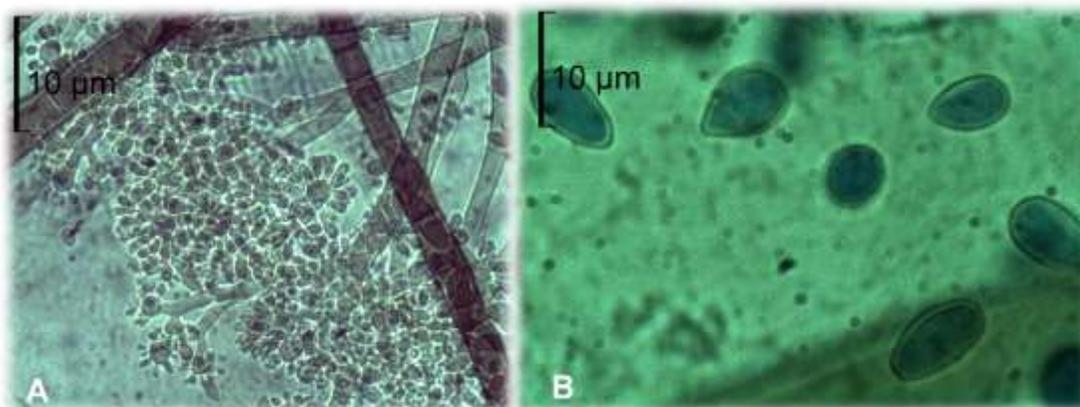


Figura 26. Cepa Bot 05. A: Conidióforos; B: Diversidad de formas de Conidios

Al efectuar las comparaciones entre las cepas, se pueden evidenciar las pequeñas diferencias que existen entre ellas, sobre todo en la ramificación de los conidióforos, sin embargo *Botrytis cinerea* es una especie agregada que podía corresponder a distintos telemórfos en *Botryotinia* (Smith *et al.*, 1992, Bigre *et al.*, 1990; Cabrera *et al.*, 2003), Mientras que Coley *et al.*, 1980 señalan que *Botrytis cinerea*, anamórfo o estado imperfecto, produce conidióforos rectos, ramificados, septados y engrosados en los ápices, sobre los cuales se producen conidios unicelulares, ovalados o elipsoides, hialinos a pardo claros.

Staats *et al.*, 2005 señalan que en el patógeno existen cuatro especies que afectan sólo las plantas de Eudicot y otro grupo que incluyen a 18 especies restantes que atacan solo a las plantas monocotiledóneas principalmente. Aparte del agente moho gris, la mayoría de las especies de *Botrytis* tienen una gama de huéspedes muy estrecho. Recientemente el estudio de las genealogías mostró que la especie *B. cinerea*, presenta grupos morfológicos los cuales fueron subdivididos en dos grupos de aislamientos genético, llamados el Grupo I y Grupo II, que fueron propuestos por ser especies filogenéticas. Las Cepas del Grupo I (también conocido como "*Botrytis pseudocinerea*") y Grupo II (*B. cinerea*), muestran diferencias en su ecología y su patrón de resistencia a los fungicidas (Fournier *et al.*, 2003, 2005).

En este caso en particular es necesario recurrir a los resultados de la evaluación de las cepas ante la sensibilidad a los fungicidas y efectuar los estudios moleculares para poder identificar el Grupo, al cual pueda pertenecer cada una de las cepas estudiadas en este trabajo.

4.- Colonias en medio de cultivo

Una de las mayores incógnitas presentadas en la obtención de cepas al efectuar los muestreos fue su comportamiento en medios de cultivo y condiciones de luz, en vista de que se podía observar diferencias entre ellas. En la **Tabla 11**, se evidenció la divergencia presente, entre el crecimiento en las distintas condiciones nutricionales y de luz, como en otras que no ocurre de esta manera a partir del primer día, tales como en Bot 02 y Bot 03 con AAv; Bot 04 con AAv con 12 horas luz y 12 horas oscuridad; mientras que Bot 05, obtuvo un crecimiento de 2,05 cm en PDA en oscuridad para ese día. En forma general en el medio de cultivo PDA, todas las cepas presentaron crecimiento miceliar en ambas condiciones de luz, sin embargo existen diferencias entre cepas y entre condiciones; siendo Bot 01, la que presentó el menor crecimiento durante los 7 días de evaluación con 7.41 cm; mientras que Bot 05 en oscuridad fue la cepa que presentó el mayor crecimiento y culminando con 8.96 cm, siendo esta la única cepa que presentó los mayores valores en el diámetro de la colonia entre el primer y el sexto día.

En el caso del medio de cultivo AAv el crecimiento entre las colonias fue muy diverso y heterogéneo entre las condiciones de luz, presentando poco o nulo desarrollo en los primeros días y a partir del 5^{to} y 6^{to} día se iguala al de PDA, llegando a obtener los valores más altos de diámetro (9 cm) para el último día, tal es el caso de Bot 02 y Bot 03, lo que nos indica que para estas cepas no es determinante las condiciones de luz, pero si la nutrición y el tiempo.

Al efectuar evaluaciones en la agresividad o virulencia del patógeno y el tipo de cultivo en el cual hospedaba, en el caso de las ornamentales, el crecimiento en el tiempo es de mucha importancia; ya que este parámetro es lo que nos va a indicar el método de control, siendo el día crítico el 3^{er} día después del establecimiento o aplicación de un estrategia o herramienta. Para este día el mayor valor del crecimiento se obtuvo en la cepa Bot 05 en PDA en oscuridad

con 5.04 cm de diámetro, seguida de Bot 02 y Bot 03 en el mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones de luz; mientras que el menor crecimiento se obtuvo en la cepa Bot 01 con alternancia de luz.

En cuanto a la producción de esclerocios (**Tabla 12**), todas las cepas presentaron formación de los mismos, siendo en su mayoría en el medio de cultivo PDA, sin embargo para las cepas Bot 01; 02 y 05, no fue relevante las condiciones de luz para la formación de los mismos. Pero Bot 05 presentó características muy particulares siendo estas la formación de los esclerocios en ambos medios de cultivos y condiciones de luz y en cantidades muy similares, presentando características de cepas de *Botryotinia* = *Sclerotinia*, forma sexual del patógeno, y la presentación de exudados en ambas condiciones, haciéndolo sumamente virulento, en comparación con Bot 02 y Bot 04.

Tabla 11. Comportamiento del crecimiento de las cepas en medio de cultivo P.D.A y A.Av. con dos condiciones de luminosidad.

Trata	Cepa	Medio de Cultivo	Condición de Luz	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1	Bot 01	PDA ac.	12 h luz/ 12 h Osc	0.40 fg	1.67 ef	1.00 fg	4.06 fgh	4.80 ghi	6.10 fg	7.41 f
2			Oscuridad	0.41 fg	1.75 ef	3.17 cd	4.29 def	5.70 cdef	7.07 bcde	8.70 ab
3		AAv	12 h luz/ 12 h Osc	0.10 g	0,66 g	2.51 ef	3.84 fgh	5.18 fgh	6.50 ef	8.50 abc
4			Oscuridad	0.10 g	0.50 g	2.80 de	3.86 fgh	5.15 fgh	6.53 ef	8.41 bc
5	Bot 02	PDA ac.	12 h luz/ 12 h Osc	0.95 de	2.63 b	4.45 b	5.86 b	6.55 b	7.52 bc	7.83 def
6			Oscuridad	0.83 ef	2.61 b	4.58 ab	5.82 b	6.71 b	7.63 bc	7.83 def
7		AAv	12 h luz/ 12 h Osc	0.03 g	1.62 ef	3.15 cd	4.11 efg	5.26 fgh	7.65 bc	9 a
8			Oscuridad	0.00 g	1.78 def	3.40 c	4.84 cde	6.10 bcde	7.44 bc	9 a
9	Bot 03	PDA ac.	12 h luz/ 12 h Osc	0.96 cde	2.63 b	4.45 b	5.86 b	6.55 b	7.52 bc	7.83 def
10			Oscuridad	0.83 ef	2.61 b	4.59 ab	5.82 b	6.63 b	7.59 bc	7.83 def
11		AAv	12 h luz/ 12 h Osc	0.00 g	1.62 ef	3.15 cd	4.17 efg	5.26 fgh	7.68 b	9 a
12			Oscuridad	0.00 g	1.80 def	3.44 c	4.92 cd	6.10 bcde	7.44 bc	9 a
13	Bot 04	PDA ac.	12 h luz/ 12 h Osc	1.55 b	2.43 bc	3.20 cd	5.24 bc	6.39 bc	7.36 bcd	8.30 bcd
14			Oscuridad	1.65 ab	2.53 bc	3.40 c	5.34 bc	6.27 bcd	7.42 bc	8.20 bcd
15		AAv	12 h luz/ 12 h Osc	0.00 g	1.76 ef	2.83 de	3.92 fgh	5.47 efg	6.73 def	8.01 cde
16			Oscuridad	0.91 de	1.32 f	2.52 ef	3.5 gh	4.48 hi	5.47 gh	6.81 g
17	Bot 05	PDA ac.	12 h luz/ 12 h Osc	1.41 bc	2.09 cde	3.14 cd	4.27 def	5.39 efg	6.58 ef	7.65 ef
18			Oscuridad	2.05 a	3.13 a	5.04 a	6.80 a	7.80 a	8.62 a	8.96 a
19		AAv	12 h luz/ 12 h Osc	1.3667 bc	2.26 bcd	3.25 cd	4.38 def	5.58 defg	7.00 cde	8.00 cde
20			Oscuridad	1.08fg	1.63 ef	2.25f	3.38 h	4.35 i	5.18 h	5.78 h

P.D.A.: Medio de Cultivo de Papa – Dextrosa –Agar; AAv.: Medio de Cultivo Agar Avena. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Tabla 12. Comportamiento de las colonias a los 20 días de crecimiento

Cepas	Condición de Luz	Pda	Aav	Esclerocios			Exudados	Apotecios	
				N°/ placa	Forma	Color		Presencia	Días
Bot 01	Luz	Si	-	130	Irregular	Negro	-	-	-
	Oscuridad	-	-	-	-	-	-	-	-
Bot 02	Luz	Si	-	73	Irregular	Negro	Si	-	-
	Oscuridad	-	-	-	-	-	-	-	-
Bot 03	Luz	Si	-	2	Irregular	Negro	-	-	-
	Oscuridad	-	-	-	-	-	-	-	-
Bot 04	Luz	-	Si	25	Irregular	Negro	-	Si	21
	Oscuridad	-	-	-	-	-	-	-	-
Bot 05	Luz	Si	Si	150	Irregular	Marrón y Negro	Si	-	-
	Oscuridad	si	si	148	Irregular	Marrón y Negro	Si	-	-

4.1.- Características de las colonias en los medios de cultivo a los 7 días.

En el medio de cultivo PDA, fue donde se observó el mayor crecimiento micelial en las diferentes condiciones de luz (**Figura 27**), las colonias variaron desde crema claro hasta marrón oscuro y gris, con diferentes patrones de crecimiento, siendo éstos desde muy ralo como en Bot 02 (oscuridad) hasta muy algodonoso como Bot 05 (oscuridad). En forma general las colonias presentaron diferencias en cuanto a la esporulación entre las condiciones de luz, y se observó en forma notoria fue en Bot 01, Bot 03, sobre todo en Bot 05, se evidenció un comportamiento muy similar al del tejido en cámara húmeda. Los exudados solo se observaron en Bot 02 con alternancia de luz y en Bot 05 en ambas condiciones de luz, pero la mayor aglomeración de micelio la presentó Bot 03 y Bot 04 en alternancia de luz, lo que nos indica la futura formación de esclerocios. Las colonias que presentaron formación de conidios

fueron Bot 01 en 12 h luz/12 h oscuridad, Bot 04 en oscuridad y Bot 05 en ambas condiciones.

En el medio de cultivo AAv, el crecimiento de las colonias fue muy irregular y heterogéneo entre las condiciones de luz (**Figura 28**), solo Bot 05 se presentó un patrón similar. Pero la mayor diferencia se observó en Bot 01, esta colonia en oscuridad fue totalmente rala y solo se podía observar en el punto de siembra una mayor cantidad de micelio en comparación con la alternancia de luz que el desarrollo fue compacto y de color crema. Las aglomeraciones de micelio fueron más evidentes en Bot 04 y Bot 05 con alternancia de luz; y en forma general no se observó la presencia de exudados. Las cepas que presentaron formación de conidios fueron Bot 03, Bot 04 y Bot 05 en oscuridad.

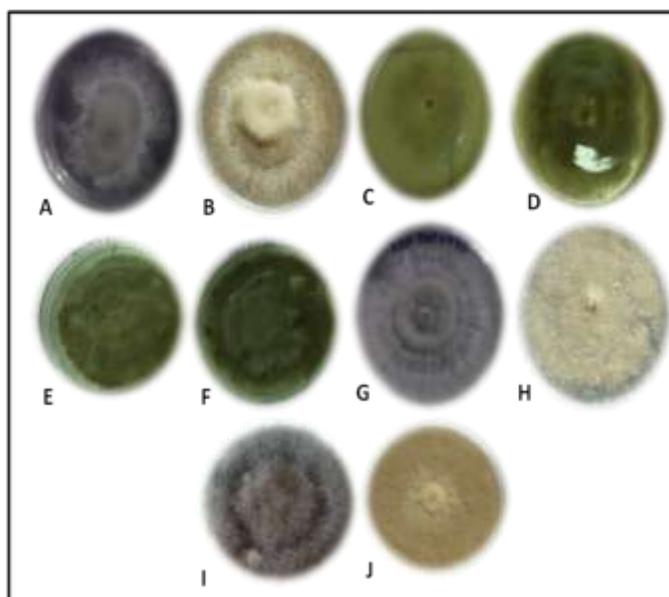


Figura 27. Crecimiento de las cepas en medio de cultivo PDA. A: Bot 01 en oscuridad; B: Bot 01 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; C: Bot 02 en oscuridad; D: Bot 02 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; E: Bot 03 en oscuridad; F: Bot 03 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; G: Bot 04 en oscuridad; H: Bot 04 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; I: Bot 05 en oscuridad; J: Bot 05 en 12 h luz/ 12 h oscuridad.

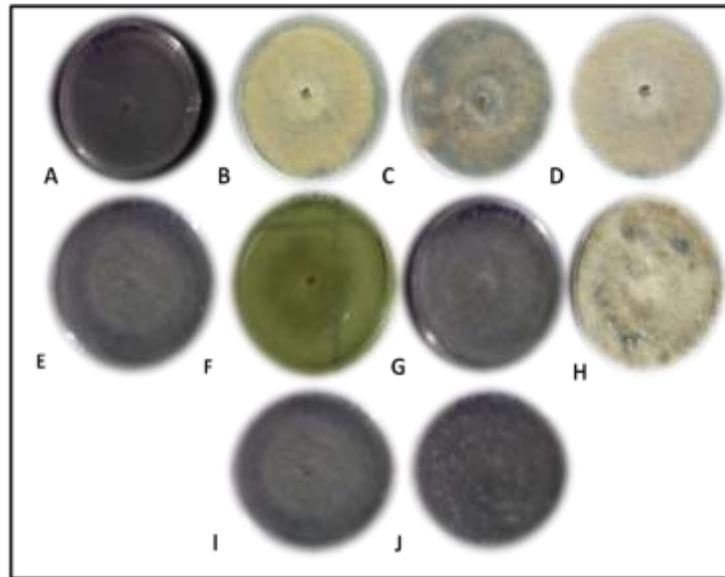


Figura 28. Crecimiento de las cepas en medio de cultivo AAV. A: Bot 01 en oscuridad; B: Bot 01 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; C: Bot 02 en oscuridad; D: Bot 02 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; E: Bot 03 en oscuridad; F: Bot 03 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; G: Bot 04 en oscuridad; H: Bot 04 en 12 h luz/ 12 h oscuridad; I: Bot 05 en oscuridad; J: Bot 05 en 12 h luz/ 12 h oscuridad.

4.2.- Crecimiento de las colonias a los 20 días.

Al evaluar la producción de esclerocios a partir del día 20, en la mayoría de las cepas se encontraba la aglomeración del micelio, pero no la compactación de los mismo ni el cambio de color, a partir del día 27 fue que se observó la coloración en algunas cepas y a partir del día 45 (**Figura 29**), fue cuando se pudo realizar el cálculo y la caracterización, observándose las siguientes diferencias:

⇒ **Bot 01**: Se presentaron aglomeraciones de micelio y esclerocios bien definidos, de tamaños variables y forma irregular, no existe un patrón de formación dentro del plato de Petri y se encuentran en la parte externa o aérea de la colonia. Al evaluar el reverso de la placa no se observan la presencia de éstos.

⇒ **Bot 02:** Se observaron aglomeraciones en el centro del plato de Petri y la formación de los esclerocios hacia los bordes de la colonia; estos son negros y de forma irregular y al observar el envés de la placa se evidencian fácilmente.

⇒ **Bot 03:** Se evidenció una colonia con abundante micelio y grandes aglomeraciones, los esclerocios se encuentran dispersos en la placa pero son pocos visibles ya que están debajo del micelio. Al observar la placa en el envés se puede ver un crecimiento radial de la colonia y poca apreciación de los esclerocios.

⇒ **Bot 04:** En este caso se apreció un comportamiento distinto entre los medio de cultivo. En AAV se observó prácticamente la ausencia de micelio aéreo y los esclerocios de diversos tamaños, pero inmersos en el medio de cultivo; al evaluar el reverso de la placa se evidenció la presencia de abundantes micro esclerocios. En el medio de cultivo PDA, se observó una colonia compacta, con un anillo donde se encontraban los conidios, pero al hacer la evaluación en el dorso de la placa se encontró la formación de micro esclerocios justo en el borde de la colonia.

⇒ **Bot 05:** Esta cepa también mostró diferencias entre los medios de cultivo y condiciones de luz. En AAV en oscuridad el micelio fue ralo y escaso, pero los esclerocios fueron grandes, irregulares y marrón oscuro - negros, siendo estos muy similares a los *Sclerotinia sclerotiorum*, mientras que en el mismo medio pero con alternancia de luz se observaron varias aglomeraciones del micelio y la formación de micro esclerocios y esclerocios pequeños generalmente de color marrón oscuro. En el caso de PDA se evidenció un comportamiento similar entre las condiciones de luz, presentándose una compactación de la colonia, formación de aglomerados en el borde de la placa y un cambio de color en el centro de la misma, al efectuar la evaluación en el reverso se

evidenció fácilmente la presencia de esclerocios de color negro y marrón oscuro y en el centro de la placa la formación de microesclerocios.

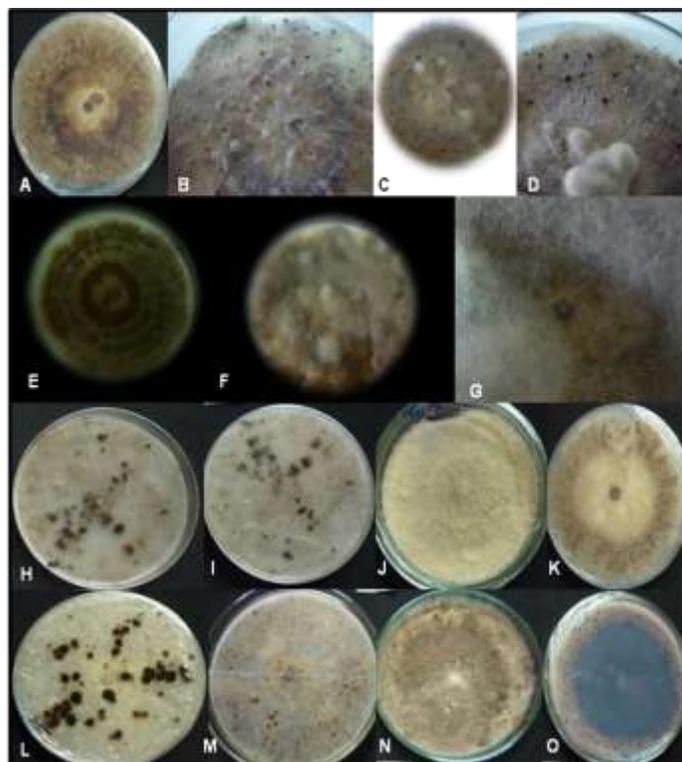


Figura 29. Colonias a los 45 días. A: Bot 01 envés de la capsula; B: Bot 01 detalle de los esclerocios; C: Bot 02 crecimiento de la colonia; D: Bot 02 detalle de los esclerocios; E -F: Bot 03 en PDA; G: Bot 03 forma de los esclerocios; H - I: Bot 04 en AAV; J-K: Bot 04 en PDA; L-M; Bot 05 en AAV; N-O: Bot 05 en PDA.

Al efectuar los ensayos preliminares para la determinación de la metodología en este trabajo, no se obtuvo la presencia de los esclerocios en las colonias, es por ello que no se estableció ningún método para su estudio. Sin embargo en las referencias bibliográficas donde se menciona la etiología de la enfermedad, así como la patogénesis se menciona solo la forma y las dimensiones de los mismos, pero no así un procedimiento específico para su estudio en ornamentales, es por ello la necesidad de efectuar un estudio para la determinación de los mismos en los medios de cultivo; condiciones de luz; formación en los tejidos afectados y su viabilidad en laboratorio y campo; y el papel en la patogénesis y ciclo de la enfermedad en las unidades de producción donde se obtuvieron dichas cepas.

5.- PRUEBA DE PATOGENICIDAD

5.1.- Inoculación de sustratos

⇒ **Bot 01:** Una vez transcurrido 7 días de la inoculación, las plantas comenzaron a presentar los primeros síntomas de la enfermedad, siendo éstos: la decoloración de las flores, el ápice de las hojas basales presentando una pudrición blanda con tonalidades verde - marrón y en las hojas banderas se evidencia una pequeña clorosis en la base (**Figura 30**). Al llegar a los días 15 - 18 de incubación las plantas presentaban un mayor deterioro de la misma, siendo evidente la deshidratación de los tejidos y mal formación de las hojas. Al efectuar los cortes longitudinales y transversales de los tallos, se encontró que estaban necrosados, sobre todo cercano al cuello de la planta. Al realizar la comparación con el testigo y con otra cepa (**Figura 30 B-C**), los síntomas aéreos se pueden confundir fácilmente con estrés hídrico. A partir del día 25 fue cuando se observó la muerte total de las plantas y sólo el tallo presentó síntomas de putrefacción.



Figura 30. Plantas de gerbera de maceta inoculadas con Bot 01. A: Síntoma a los 7 días; B: Planta a los 15 días; C: Planta inoculada y el Testigo.

⇒ **Bot 02:** Una vez transcurrido 8 días después de la inoculación (ddi), las plantas comenzaron a presentar un amarillamiento en las hojas bajas y cambio en el ángulo de la disposición foliar (**Figura 31**). Al seguir la

evaluación, solo a partir del día 13 se evidenció el doblez en el ápice de las hojas y el peciolo; pero la planta nunca llegó a manifestar otro tipo de síntomas así como tampoco, al transcurrir un mes de la inoculación, esta llegó a morir; pero al efectuar el aislamiento se obtuvo la colonia del patógeno. Esto nos indica que cuando el patógeno se encuentra en el sustrato no es capaz de ocasionar la muerte de las plantas; pero si puede ser una fuente de inóculo primario.

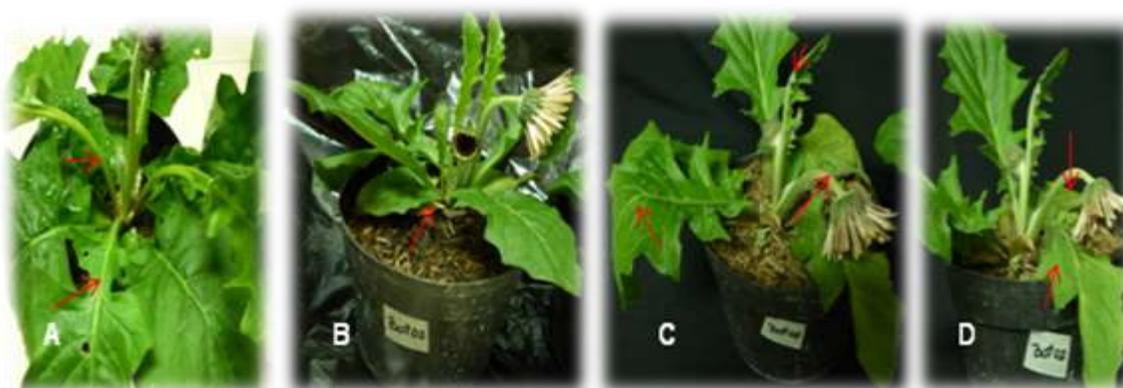


Figura 31. Plantas de gerbera de maceta inoculadas con Bot 02. **A:** Cambio del ángulo en la inserción de la hoja; **B:** Necrosamiento en la hojas bajas; **C-D:** Dobleza de los ápices y tallo floral.

⇒ **Bot 03:** En este caso la planta solo presentó amarillamiento y un leve cambio en el ángulo de inserción al tallo de las hojas bajas a partir del día 13 ddi (**Figura 32**). A partir del día 18 al 21, se notó un leve doblez en el ápice de algunas hojas, y una leve clorosis en las hojas banderas. Al igual que la cepa anterior no produjo la muerte de la plantas. Pero al efectuar el aislamiento de tejido del tallo (con necrosamiento), se pudo aislar el patógeno.



Figura 32. Plantas de gerbera de maceta inoculadas con Bot 03. A: Plata a los 7 ddi; B-D: Planta a los 18 ddi.

⇒ **Bot 04:** Esta es una cepa que se comportó totalmente atípica a las otras, a pesar de que se esperaba que no ocurriera la enfermedad, en vista de que fue obtenida de flores de rosas; los síntomas de marchitez se comenzaron a evidenciar a partir del día 5 ddi y se presentaron 2 tipos de síntomas muy diferentes entre ellos (**Figura 33**), siendo el más evidente una necrosis en el pecíolo de las hojas bajas, mientras que en las otras plantas se encontró una necrosis total de las hojas bajas y en el ápice de las hojas superiores un doblez y pudrición blanda (**Figura 33-C**). Al llegar al día 10, se encontraron gran parte de las plantas inoculadas muertas y solo 1 de ellas con los síntomas en proceso intermedio, pero al efectuar el corte de los tallos se evidenció la necrosis total de estos en todas las plantas. Esta fue la cepa que presentó mayor agresividad en comparación con las otras y demuestra que el origen de la misma no influye en la susceptibilidad del hospedante a la enfermedad. Al efectuar los aislamientos de los distintos tejidos de la planta (raíz; tallo; hojas y pecíolo floral) se encontró al patógeno en cada uno de ellos, demostrando de esta manera que *Botrytis*, es uno de los causantes de la marchitez de la gerbera, así como su movimiento en forma sistémica en la planta.



Figura 33. Plantas de gerbera en maceta inoculadas con Bot 04. A - B: Necrosis en hojas bajas; C: Dobleces del ápice de las hojas y presencia de la pudrición blanda; D: Planta inoculada a los 10 días; E: Comparación entre las plantas inoculadas y el testigo.

⇒ **Bot 05:** En este caso en particular se comenzaron a observar los primeros síntomas a partir del día 6 ddi, siendo estos un amarillamiento bien significativo de las primeras hojas de las plantas, a partir del día 8 se comenzó a observar una leve necrosis del peciolo de las hojas maduras (**Figura 34-B**), para el día 12 se evidenció un doblez en los ápices de las hojas y para el día 15 todas las plantas se encontraban muertas (**Figura 34-D**). De la misma manera que la cepa anterior al efectuar los aislamientos de todos los órganos de la planta se encontró el patógeno, confirmando así que este es capaz de producir

la marchitez y muerte en gerbera por medio de sustratos contaminados y su agresividad va a depender de la virulencia del patógeno y no de la zona geográfica de donde este se obtenga.



Figura 34. Plantas de gerbera en maceta inoculadas con Bot 05. A: Amarillamiento de las hojas; B: Necrosis de los peciolos; C: Doble de las hojas; D: Muerte de las plantas.

Los estudios realizados por diversos autores entre ellos Oszkinis y Lisiecka, (1990); Bigre *et al.*, 1990; Bañón *et al.*, 1993; Hurtado *et al.*, 2001; Hurtado y Subero, (2003); Hurtado, (2004) y Daughtrey, (2011); señalan como la principal enfermedad del sustrato o suelo a la marchitez repentina causada por *Phytophthora cryptogea* (*Phytophthora* de la Gerbera, enfermedad limitante del cultivo); sin embargo con este ensayo se demuestra que una cepa virulenta de *Botrytis cinerea*, es capaz de causar la marchitez en la planta de gerbera de una forma repentina y con síntomas muy similares a los causados por *P. cryptogea*. Al efectuar las comparaciones entre ambas enfermedades, encontramos que las cepas Bot 04 y Bot 05, presentaron los primeros síntomas a 5 y 6 ddi, y las plantas se encontraron muertas para los días 10 y 15 respectivamente; al igual que en el caso del otro patógeno para gerbera. Demostrando que esta ***B. cinerea***, puede causar más pérdidas económicas en menor tiempo, cuando se presentan las condiciones ideales para una epidemia.

5.2.- Inoculación foliar

Al efectuar las pruebas de patogenicidad usando inoculación foliar, se obtuvieron resultados iguales a los obtenidos y observados en campo en los muestreo realizados. De igual manera que en la prueba anterior cada cepa presentó síntomas muy particulares que nos permiten identificar la presencia de la enfermedad en el cultivo, tal como se puede ver a continuación:

⇒ **Bot 01**: El primer síntoma y signo se evidenció en la inflorescencia con la esporulación en las flores verdaderas y la caída del capítulo a los 6 ddi, (**Figura 35**). A partir del día 8, se comenzaron a evidenciar las manchas foliares necróticas y momificadas, sin la presencia de halo a partir del borde de las hojas maduras y una vez que esta fue avanzando se observó la presencia del signo en ellas.

A partir del día 15, las inflorescencias colapsaron sobre las hojas y ápice de las plantas y para el día 18, se encontró la esporulación del patógeno y un amarillamiento en las hojas bajas, y luego en el día 20, los daños eran notables en las hojas banderas y de allí comenzó la marchitez y putrefacción de la planta generando un aroma muy similar al que se presentó en la unidad de producción. Dicho aroma es notable desde el momento en que comienza la caída del capítulo. A los 25 ddi, se comenzó a ver un micelio blanco algodonoso sobre los tejidos y para el día 32 escasamente se evidenciaba el comienzo de la formación de esclerocios e innumerables exudados hialinos y blanquecinos sobre las hojas casi desintegradas. Los primeros síntomas fueron identificados en la unidad de producción donde se obtuvo la cepa; y muy difícilmente se puede encontrar un estado avanzado de la enfermedad (**Figura 35 G-F**), por

el manejo integrado de enfermedades, siendo la labor cultural una de las herramientas prioritarias en la unidad de producción.

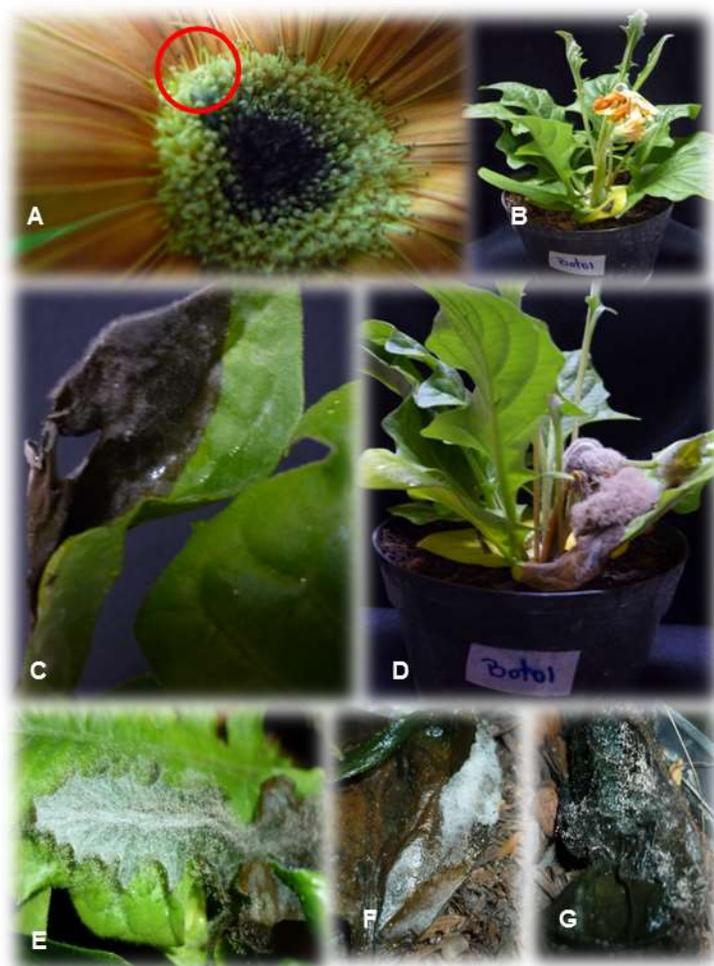


Figura 35: Plantas de gerbera de maceta con inoculación foliar de Bot 01. A: Presencia de micelio en el capítulo. B: Caída del capítulo; C-D: Manchas foliares; E-F: Signo de la enfermedad.

⇒ **Bot 02:** Los primeros síntomas se evidenciaron a los 7 ddi, con la caída y deformación de la flor (**Figura 36**), a partir del día 12, se observó que las hojas de las plantas presentaban un doblez en las hojas, siendo generalmente el envés el que estaba en la cara superior de la planta, luego del día 15, comenzó una podredumbre de color castaño claro en las hojas la cual

avanzaba por la nervadura principal, y los tejidos ya dañados comenzó a emerger el signo de la enfermedad.

A partir del día 22 ddi, se observó el colapso de la planta y el micelio gris sobre los tejidos totalmente degradados. La formación de los esclerocios comenzó en las hojas bajas y en los botones florales (**Figura 36 F-G**). De los síntomas observados, sólo la deformación y caída del capítulo; así como la mancha acuosa son iguales a los obtenidos en la unidad de producción en el muestreo, lo que corrobora que nos encontramos en presencia del mismo patógeno.



Figura 36. Plantas de gerbera de maceta con inoculación foliar de Bot 02. A-B: Síntoma en la flor; C-D: Síntoma en la hoja; E-F: Presencia del signo en los tejidos vegetales en putrefacción.

⇒ **Bot 03**: El primer síntoma que se manifestó fue el micelio blanco algodonoso en el centro de la flor a los 7 ddi (**Figura 37**). A partir del día 10, se comenzó a presentar una pudrición en las hojas bajas de color pardo claro con un fuerte halo amarillo, y en las hojas banderas se evidenciaba la presencia del signo de la enfermedad.

Para el día 15 ddi, se mostró en los tejidos foliares con una necrosis húmeda, doblez en el ápice de las hojas superiores y la presencia de un halo verde claro, mostrando claramente el avance de la enfermedad. Para el día 18 ddi, la presencia del signo típico se encontraba afectando las hojas banderas, flores y el ápice de la planta, y en este momento la pudrición era blanda y acuosa con el micelio gris (**Figura 37-F**). A partir del mes se evidenció la pudrición total de la planta y un micelio negro abarcando todos los tejidos, y posteriormente a los 2 meses fue cuando se presentó un micelio blanco con numerosos agregados y exudados hialinos.



Figura 37. Plantas de gerbera de maceta con inoculación foliar de Bot 03. A: Síntoma en la flor; B: Pudrición de hojas bajas; C-D: Manchas foliares necróticas con halo verde claro; E-F: pudrición blanda con el signo de la enfermedad; G-H: Presencia del micelio en tejidos en putrefacción.

⇒ **Bot 04**: En este caso en particular no se sabía que síntomas se podían presentar en el cultivo y si éstos a su vez eran similares a los observados en los muestreos realizados. La primera manifestación de una anomalía en las

plantas inoculadas, fue a partir del 4 ddi con una decoloración en los pétalos de las flores abiertas (**Figura 38-A**). Luego del 6^{to} ddi, se evidenció la caída del capítulo, el aroma a putrefacción, cambio en el ángulo en la inserción de la hoja, doblamiento del ápice de las hojas maduras y la presencia de puntos cloróticos con pequeñas manchas foliares las cuales comienzan a partir de los bordes. Para el día 10 ddi, se encontraron 2 tipos de pudriciones blandas, las cuales comienzan desde el peciolo de las hojas hacia el ápice de la misma. La primera mancha es pardo oscuro en el haz y pardo claro en el envés con presencia de micelio blanco. La otra es de pardo oscuro pero con la presencia de un halo amarillo claro bien demarcado y la hoja se torna verde claro o verde manzana.

Para el día 15 ddi, las plantas se encontraban en gran estado de descomposición con la presencia bien evidente del micelio gris (**Figura 38**). Al terminar el mes el micelio formó agregados; esclerocios y exudados. Y a partir del 2^{do} mes ddi, se encontró la presencia de los apotecios sobre los tejidos (**Figura 38-H**). Demostrando de esta manera que sobre el hospedante se pueden encontrar la forma sexual y asexual de la enfermedad y que las cepas provenientes de otros hospederos y/o localidades pueden ser infectivas.

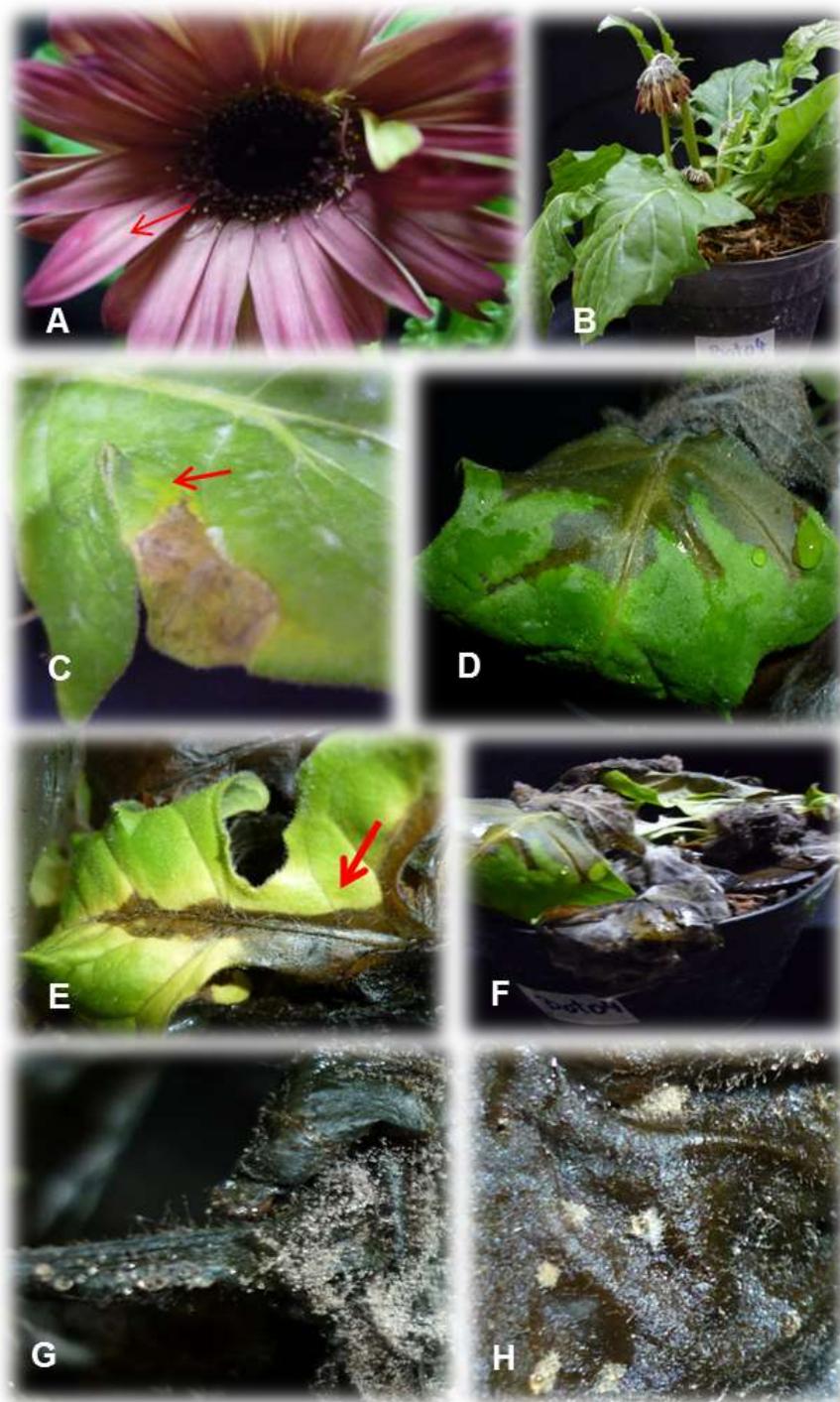


Figura 38. Plantas de gerbera de maceta con inoculación foliar de Bot 04. A: Decoloración en los pétalos de la flor; B: Dobleza del ápice y cambio del ángulo de inserción de la hoja; C: Mancha foliar desde el borde de la hoja; D: Mancha parda acuosa desde la base del peciolo; E: Mancha parda con halo amarillento; F: Síntomas a los 15 ddi; G: Formación de esclerocios y presencia de exudados en tejidos en putrefacción; H: Presencia de apotecios.

⇒ **Bot 05:** En esta cepa la patogénesis fue muy virulenta. Al 3^{er} ddi, al retirar la cámara húmeda se encontró con varias hojas que presentaban puntos necróticos y micelio esporulado sobre la lesión (**Figura 39-A**), También se observaron daños en algunas lígulas y la presencia del signo en el capítulo de la flor, demostrando de esta manera que el patógeno es sumamente agresivo y para su control los monitoreos deben ser muy consecutivos. Al 4^{to} ddi, se observó la caída del capítulo y la presencia de un amarillamiento en las hojas bajas, mientras que el 6^{to} día ya se evidenciaba fácilmente la presencia del micelio gris sobre los tejidos dañados (**Figura 39-C**); para este mismo día algunas plantas presentaron el ataque en las hojas banderas; la presencia de una mancha pardo claro acuosa y el aroma característico de la enfermedad; para el 8^{vo} ddi se pudo observar que las manchas acuosas se tornaron marrón oscuro, con presencia de un pequeño halo verde claro y en la parte posterior de los tejidos el micelio gris (**Figura 39-D**). Al día 10 ddi, se evidenció el deterioro total de la planta y para el día 14 ddi, existió la presencia de esclerocios y numerosos exudados en lo que quedó de los tejidos (**Figura 39 E**). A pesar de que se evaluó por 4 meses, en esta cepa no se produjeron los apotecios. Los síntomas obtenidos y la rapidez de estos concuerdan con los obtenidos en campo, demostrando de esta manera que la forma de diseminación; perpetuación y manifestación de la enfermedad es principalmente por vía foliar o aérea.



Figura 39. Plantas de gerbera en maceta con inoculación foliar de Bot 05. A: Primer síntoma foliar; B-C: Síntoma en los capítulos; D: Evidencia del signo de la enfermedad; E: Formación de agregados.

Al efectuar los aislamientos en P.D.A., en oscuridad de hojas, flores y tallos se evidenció al patógeno con las mismas características a las estudiadas anteriormente e igualmente las dimensiones de las estructuras medidas, tomada de los tejidos, lo cual indica que se cumplen los postulados de Köch, comprobando que el patógeno aislado es el causante de la enfermedad.

Es de importancia resaltar que las flores son el primer órgano afectado en la mayoría de los casos y en esta oportunidad se presentaron todos los síntomas encontrados en los muestreos. Al efectuar la comparación entre las cepas y los días de aparición de los síntomas en las plantas, se demuestra que este patógeno es capaz de causar una marchitez blanda de la planta, siempre y cuando se tome en consideración la virulencia de la cepa y no así su hospedante fijo o alterno. Al efectuar la comparación con *P. cryptogea*, este patógeno fue capaz de producir los puntos cloróticos a los 3,5 ddi y la formación de las manchas holonecroticas a partir del 5^{to} día (Hurtado, 2004); mientras que en **Bot 05** al 3^{er} día presentó el daño necrótico en la hoja y el signo del patógeno, confirmando de esta manera lo anteriormente obtenido con la inoculación en sustrato, con respecto a la importancia de la enfermedad en el cultivo.

La humedad relativa y la temperatura jugaron un papel muy importante en la patogénesis manteniéndose en 90 % y 17 °C respectivamente; pudiéndose observar las diferencias entre las cepas; sin embargo Salinas *et al.*, 1989 efectuaron estudios sobre los efectos de la temperatura, la humedad relativa y la edad de los conidios sobre la incidencia de manchas en las flores de gerbera causada por *Botrytis cinerea*; encontrando que el patógeno se pudo aislar fácilmente de las lesiones encontradas y al efectuar la inoculación dió las típicas manchas necróticas, cuando conidias se espolvorearon sobre las flores, en un corto período (5 horas) y una alta humedad relativa con temperaturas de 18 - 25 ° C, y observaron la descomposición de flores liguladas. Al igual

mencionan que un conidio podría dar lugar a una lesión necrótica después de la germinación y la formación de lesiones visibles, lo cual ocurrió en 1 día a 18 y 25 ° C. Y los conidios de *B. cinerea*, almacenados en seco, fueron capaces de sobrevivir durante 14 meses, siendo capaces de germinar *In vitro* y en las flores liguladas.

Con respecto a los resultados obtenidos por Salinas *et al.*, 1989 encontraron que las temperaturas de 18 a 25 ° C, se observó la lesión dos a cuatro células en el sitio de la penetración siendo éste del tipo necrótico, pero cuando las flores se incubaron a 4° C, las lesiones se hicieron visibles a los 3 días después de la inoculación con un grupo de 10 a 14 células y una vez que el micelio se extiende se observa la muerte de 40 a 50 células a los 18 ddi. Esto no concuerda que lo obtenido en los ensayos, ya que el patógeno fue capaz de invadir los tejidos hasta causar la muerte total de la planta. Por otra parte se corroboró lo obtenido por Raposo *et al.*, 2008 quienes señalan que el micelio puede ser infectivo y comenzar el ciclo de la enfermedad como fue en el caso de Bot 03.

Igualmente, los resultados obtenidos con Bot 03 y Bot 04, reflejaron lo descrito por Garcés y Orozco, (2007) con respecto a que *Botrytis*, es capaz de secretar enzimas pectolíticas y otras enzimas que degradan los tejidos, facilitando de esta manera la invasión del patógeno a los tejidos de la planta. Mientras que Jansen, (2010) señala que en estudios preliminares a encontrado que las plantas de tomate bajo el ataque del hongo *Botrytis cinerea*, liberan una sustancia aromática que puede ser medida en los viveros, esta sustancia en forma general son salicilato de metilo, lo cual explica la presencia de la emisión del aroma en las cepas Bot 01; Bot 02; Bot 03.

6.- Evaluación de la sensibilidad de las cepas de *Botrytis* a los principales fungicidas químicos utilizados por los productores.

Por la complejidad de esta prueba y los resultados obtenidos en ella, se efectuó el análisis por cepa, lo cual permitió evaluar la agresividad de cada una de ellas y buscar nuevas alternativas de control. Es fundamental recordar que al realizar los cálculos de las partes por millón de los ingredientes activos, se considero la concentración del mismo, es por ello que para el caso del Clorotalonil la prueba que correspondería a la dosis comercial es de 0,75 ppm. En el caso del resto de los fungicidas corresponden a 5 ppm.

Todas las cepas no presentaron sensibilidad al Azoxystrobin, siendo su característica principal un antiesporulante y erradicante; producto que se utiliza en los cultivos desde que salió al mercado a pesar de que su registro en el país es para el control del patógeno en fresa (*Fragaria linneo*); el otro fungicida que no fue tan eficaz, fue Clorotalonil y sobre todo en aquellas unidades de producción donde se encuentra muy cercano lotes de crisantemos por el uso permanente de estos fungicidas para el control de la roya (*Puccinia oriana*) y de la misma *Botrytis sp.* Los detalles de este ensayo se pueden ver a continuación:

⇒ **Bot 01:** Esta es una de las cepas donde claramente se observó la falta de sensibilidad del patógeno a los fungicidas seleccionados, presentándose en el caso de Azoxystrobin (Az), Benomilo (Ben) y Clorotalonil (Cl), crecimiento micelial en todas las dosis (**Figura 40**), mientras que en el caso de Iprodione (Ipr) solo a la dosis de 1000 ppm y los tratamientos con Carbendazim (Car) se mantiene la sensibilidad. En los primeros 3 días no se manifestaron diferencias estadísticamente significativas (**Anexo 4**), pero en el caso de algunos tratamientos de Az; Ben; Ipr y Cl, claramente manifestaban un comportamiento similar al del testigo, marcándose una diferencia estadística a partir del 5^{to} día, y para el 6^{to} día se encontraron tratamientos con dosis

comerciales y superiores a esta en el primer grupo. En este caso para el grupo de los Benzimidazoles, posiblemente se presenta una resistencia adquirida al Benomilo y no cruzada, a pesar de que ambos fungicidas presenten el mismo modo de acción. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kimura *et al.*, 2001 quienes encontraron que Iprodione permitió el crecimiento micelial a 1000 ppm; una baja sensibilidad a Benomilo con crecimiento en 10 y 50 ppm.

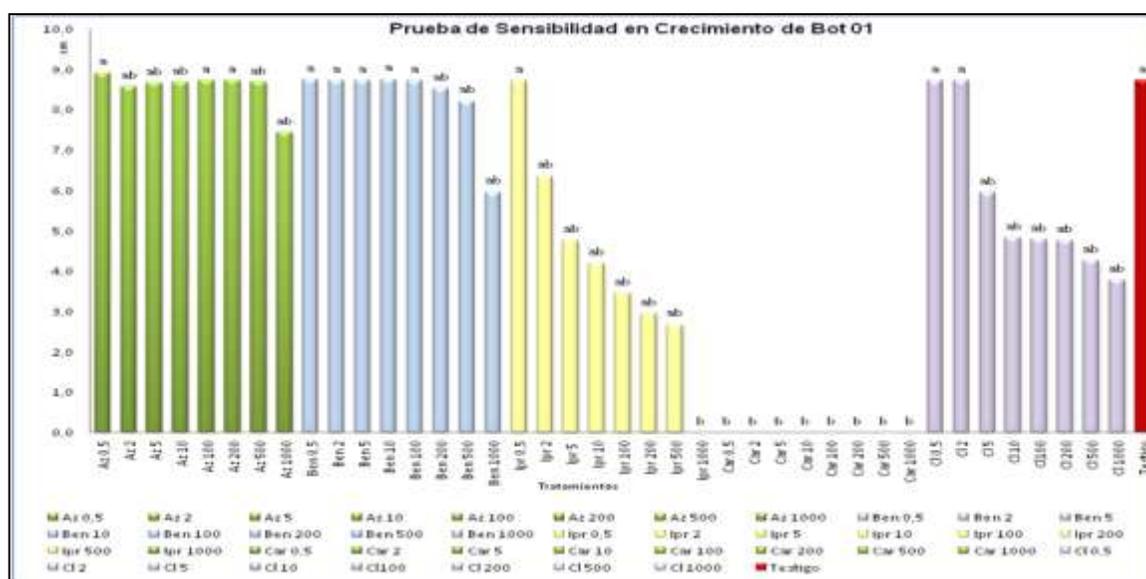


Figura 40. Evaluación del crecimiento micelial de Bot 01 a los fungicidas: Azoxyestrobil; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Fue evidente que la cepa presentó variaciones en las características, mediante la presencia de los fungicidas, así como se puede evidenciar en la **Figura 41**, donde los tratamientos con Ipr y Cl se formó una compactación del micelio sobre el medio del cultivo y mucho micelio aéreo, esto se debe probablemente a que el fungicidas tienen como principal función la inhibición del crecimiento y el metabolismo energético; al vencer esta barrera el hongo ha sido capaz de seguir su desarrollo en menos de 7 días, lapso necesario para la utilización de productos sistémicos en el cultivo. Mientras que el caso de Az y Ben a pesar

que las dosis eran muy altas se podía observar la formación de conidios o esporulación del hongo en el centro de la placa de petri, al igual que el testigo; demostrando que el hongo tiene la propiedad de vencer las barreras fungistáticas de algunos productos y seguir con su reproducción.

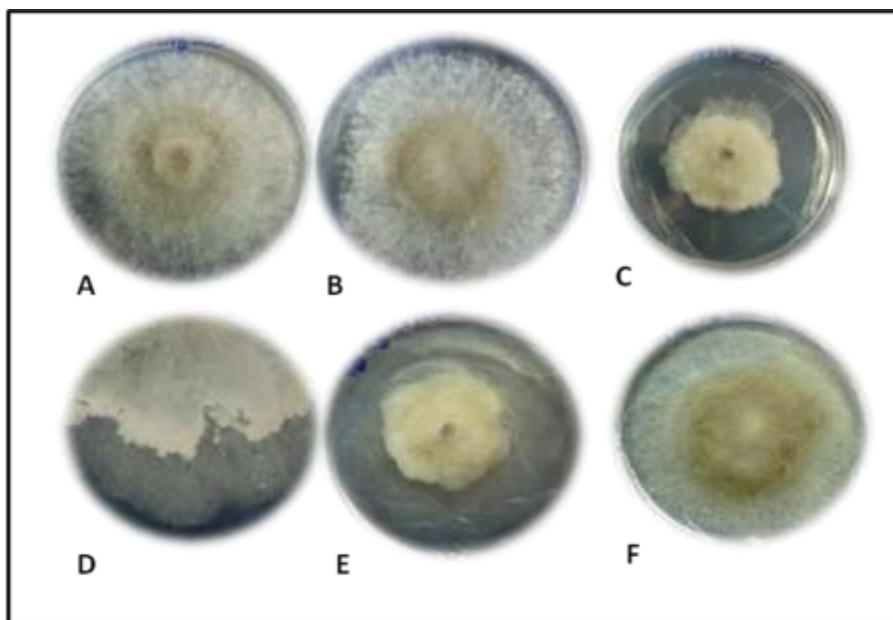


Figura 41. Características de la colonia Bot 01 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 200 ppm; B: Benomilo a 100 ppm; C-D: Iprodione a 5 ppm; E: Clorotalonil a 100 ppm; F: Testigo

En cuanto a la germinación de conidios el comportamiento no fue similar, los tratamientos con Ipr 0,5 - 2 ppm, fueron los que presentaron el mayor número de conidios germinados en comparación con el testigo (**Figura 42**), se presentó un segundo grupo estadístico donde se encontraban todas las dosis comerciales de Az, Ben, Ipr y Cl, demostrando de esta manera que no se está ejerciendo ningún tipo de control con las aplicaciones efectuadas. También se observó una germinación en Car 0,5 la cual se podría presumir que si se realizan continuas aplicaciones de este fungicida se encontrará en un futuro con problemas de poca sensibilidad en el control. Los resultados obtenidos por Carrero *et al.*, 2003 quienes encontraron una inhibición de la esporulación con

Cl y Ben, mientras que en Az y Myclóbutanil hubo germinación de conidios; producción de conidióforos y conidios.

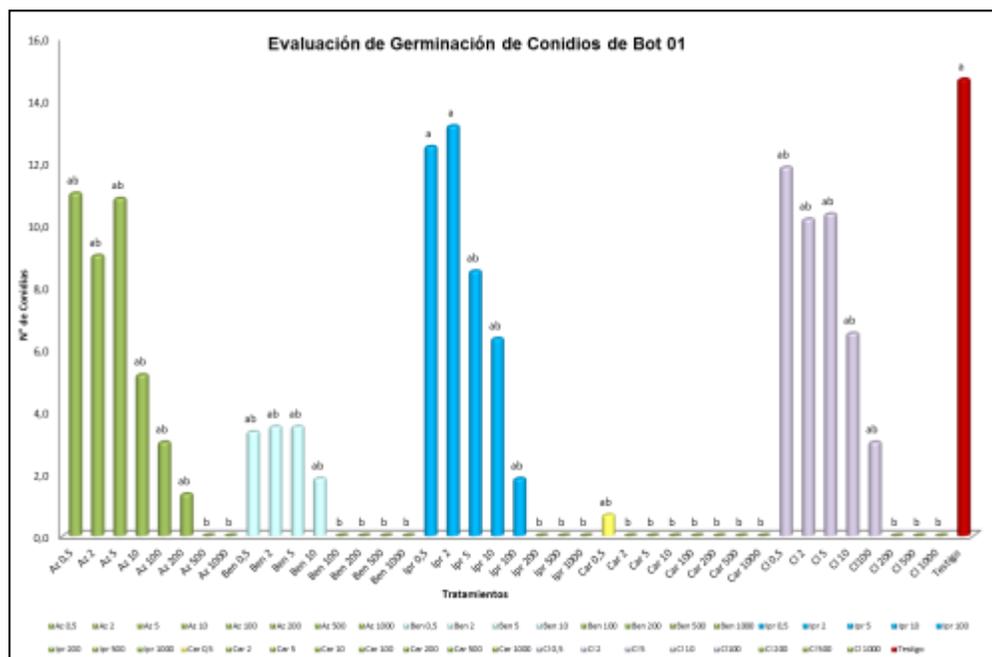


Figura 42. Evaluación de la germinación de conidios de Bot 01 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

⇒ **Bot 02:** En esta cepa es donde mayor sensibilidad se obtuvo en los fungicidas; posiblemente porque no se encontraba dentro del grupo un Propiconazol; Tebuconazol o Captan, que son de uso frecuente en el sistema de producción. Se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, siendo Az 0,5- 2; Cl 0,5 y el testigo, fueron los que presentaron el mayor crecimiento micelial (**Figura 43**), un segundo grupo donde se encuentra el resto de los tratamientos de Cl; Az 5 - 10; Ipr 0,5 - 2 ppm. Siendo Az 5, la dosis comercial que presentó el mayor valor de crecimiento en comparación con el resto de los tratamientos.

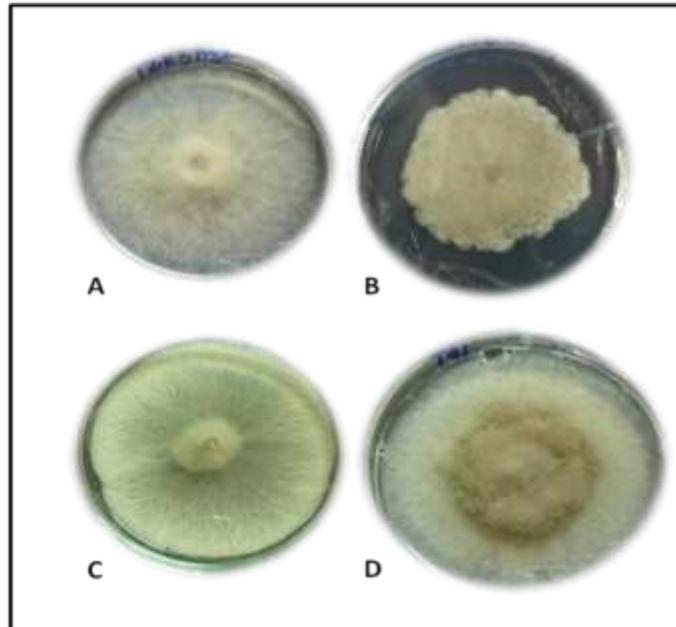


Figura 44. Características de la colonia Bot 02 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 5 ppm; B: Iprodione 2 ppm; C: Clorotalonil a 5 ppm; D: Testigo

En cuanto a la germinación de las conidias (**Figura 45**), presentó el mismo patrón de tratamiento del crecimiento, presentándose diferencias estadísticamente significativas; donde Az 0,5 - 2; Cl 0,5 - 5 y el testigo, fueron los mayores valores de germinación, sobre todo a partir de las 48 horas. En este caso la selección de los fungicidas para la evaluación de sensibilidad del patógeno es el mismo en ambas pruebas, pudiéndose incorporar al Ben; Car e Ipr en el método químico para el control de la enfermedad en un lapso de 7 días.

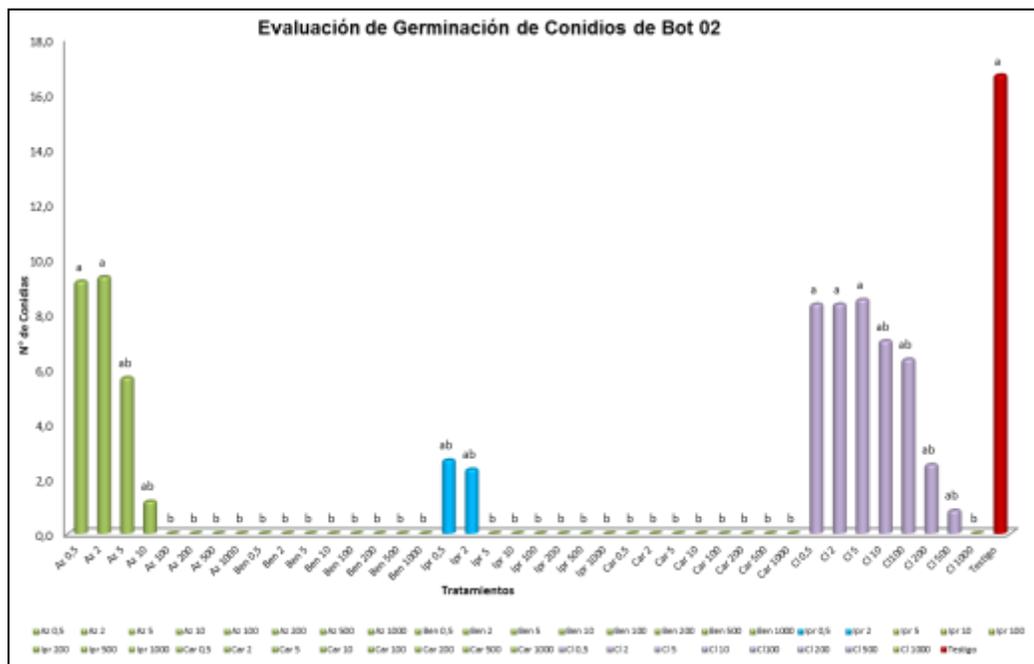


Figura 45. Evaluación de la germinación de conidios de Bot 02 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

⇒ **Bot 03:** En esta cepa se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo Az 0,5 - 10 ppm, Cl 0,5 ppm y el testigo, son los que obtuvieron los mayores valores; pero todos los tratamientos con Cl presentaron crecimiento micelial, demostrando de esta manera la poca sensibilidad que presenta este fungicida. Nuevamente se encontró con el desarrollo del hongo en uno de los fungicidas Dicarboximidás (Iprodione), hasta la dosis comercial; demostrando en este caso que es necesario efectuar pruebas más específicas para determinar que tipo de resistencia se puede presentar y verificar de esta manera si es al ingrediente activo o al grupo (**Figura 46**).

Al evaluar el diámetro de la colonia, se pueden observar (**Anexo 6**), las diferencias estadísticamente significativas desde el primer día de evaluación y en el caso específico del Ipr, hubo dosis donde el patógeno comenzó su

crecimiento a partir del 5^{to} día y finalizó con 3 dosis incluyendo la comercial, las cuales presentaron poca sensibilidad en el tiempo, indicando que el hongo es capaz de permanecer sobre un medio de crecimiento hasta obtener las condiciones adecuadas para su desarrollo. Pero al evaluar la germinación se encontró con la existencia de tratamientos que presentaron una pequeña cantidad de valores, en comparación con el testigo; sin embargo no dejan de ser importantes en vista, de que si se presentan las condiciones ambientales óptimas para la enfermedad, no sería adecuada la aplicación de estos fungicidas en el campo.

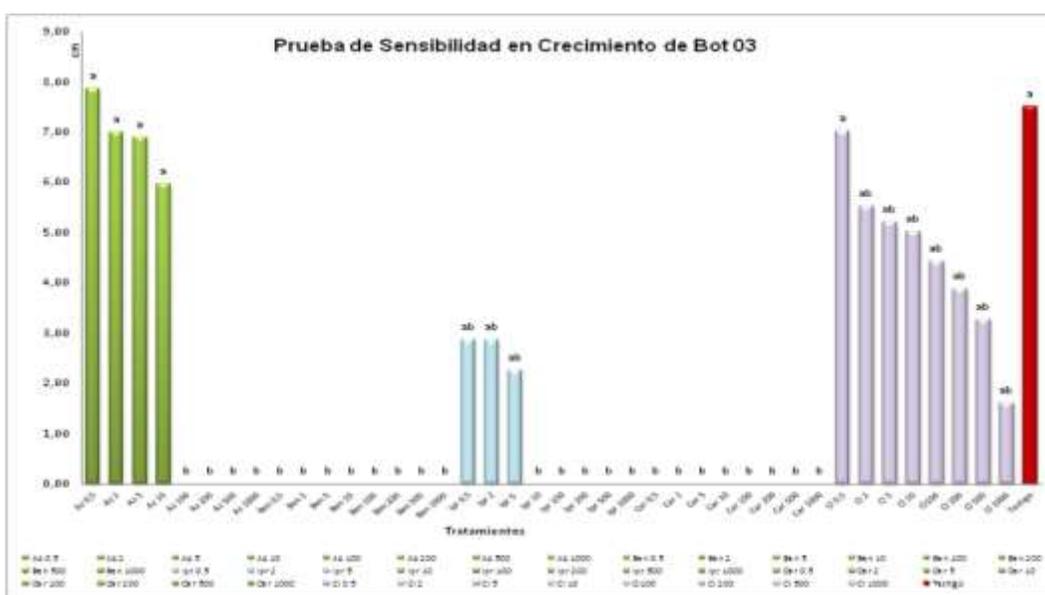


Figura 46. Evaluación del crecimiento micelial de Bot 03 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

La colonia presentó diferencias en sus características morfológicas al compararla con el testigo, pero en forma general se presentó un micelio algodonoso de color gris claro con bordes blancos (**Figura 47**), con crecimiento en forma irregular y asimétrica.

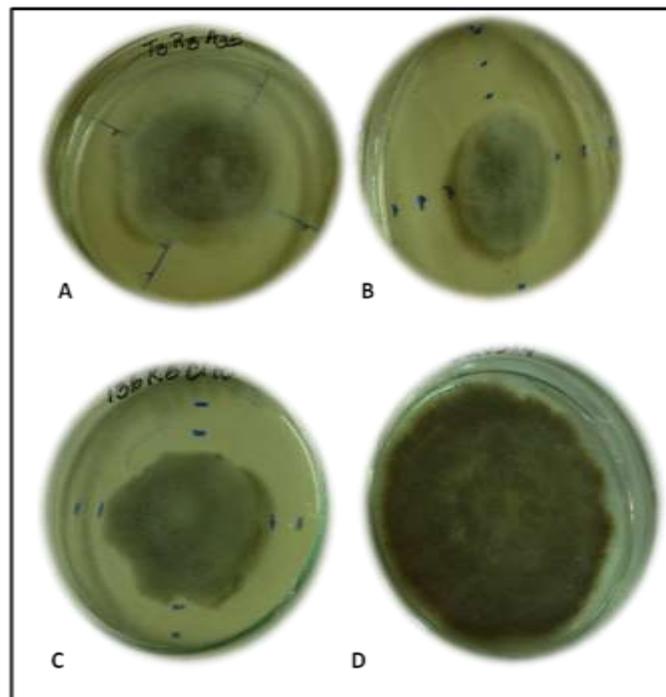


Figura 47. Características de la colonia Bot 03 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 5 ppm; B: Iprodione 5 ppm; C: Clorotalonil a 10 ppm; D: Testigo

Por otra parte en la prueba del comportamiento de la germinación de conidios, se efectuó con micelio, en vista de que esta cepa no presentó estas estructuras, sin embargo se obtuvo resultados en los fungicidas muy distinto al crecimiento, presentándose de igual manera diferencias significativas (**Figura 48**), pero en este caso la germinación ocurrió en todos los tratamientos de Az, y Ipr 10 - 500 ppm, siendo la principal función de estos productos evitar la esporulación y germinación de los conidios. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kimura *et al.*, 2001 quienes reportan a *B. cinerea*, fue capaz de crecer y germinar en Iprodione en altas concentraciones y una adaptación; selección y presión de los aislamientos en 1.000 ppm. Mientras que Montealegre y Vásquez, (1996) mencionan que la germinación de las conidias en Iprodione y Vinclozolin se obtuvo hasta en 200 ppm.

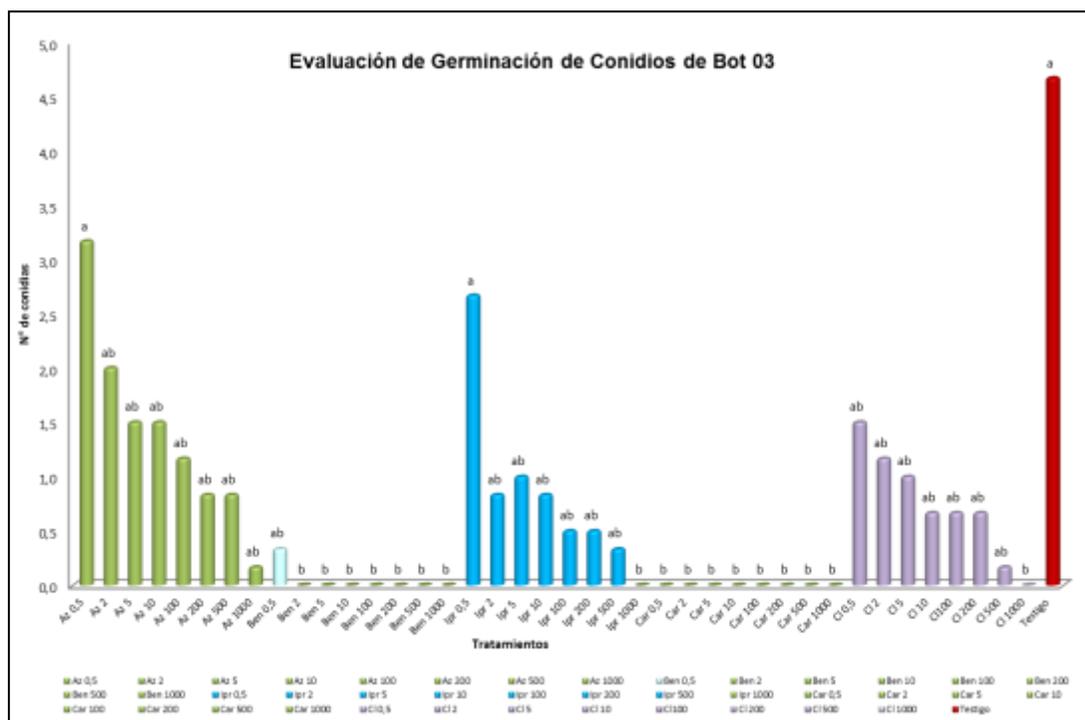


Figura 48. Evaluación de la germinación de conidios de Bot 03 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

⇒ **Bot 04:** En esta cepa en particular existe una clara diferencia estadística entre los tratamientos, siendo todos los tratamientos con Az, Ben 0,5; CI 0,5 - 200 ppm y el testigo son los que presentaron el mayor diámetro de crecimiento de las colonias del hongo bajo esta metodología, demostrando de esta manera la poca sensibilidad que presenta esta cepa a los fungicidas seleccionados. En cuanto a los otros productos se encontró desarrollo en Ben 2 - 10 ppm; Ipr 0,5 - 10 ppm y Car 0,5; minimizando de esta manera las posibilidades de control bajo el método químico (**Figura 49**). Los resultados obtenidos por O'Neill y Mc Quilken, (2.005) demostraron la resistencia del hongo al Iprodione, el cual proporciona un control incompleto; sin embargo en el caso de Azoxystrobin, Cuprodimil, Funcloraz, Tebuconazol y Clorotalonil presentan un control completo sobre *B. cinerea*.

Al hacer el detalle en el diámetro de las colonias diariamente, se encontró que en los primeros días no se presentan diferencias estadísticamente significativas (**Anexo 7**), sin embargo existen tratamientos como Az 2 - 5; Ben 0,5; Cl 0,5-2 ppm que presentan un leve crecimiento, igual o muy similar al del testigo; ya para el 4^{to} día se puede visualizar la tendencia clara de la poca sensibilidad de todas las dosis de los tratamientos de Az y Cl, aunado a las dosis comerciales de Ben e Ipr; mostrando de esta manera que el patógeno es muy agresivo y dificulta su control por lo menos con el método químico; haciendo necesario el estudio de la resistencia del patógeno a estos fungicidas y evaluar que tipo se puede presentar; así como se puede evidenciar en el estudio realizado por Gepp *et al.*, 2012 quienes evaluaron la resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay, encontraron 6 aislamientos obtenidos de cultivos de rosas y encontraron un alto nivel de resistencia a todos los fungicidas evaluados (Boscalid; Pirimetanil; Iprodione y Carbendazim).

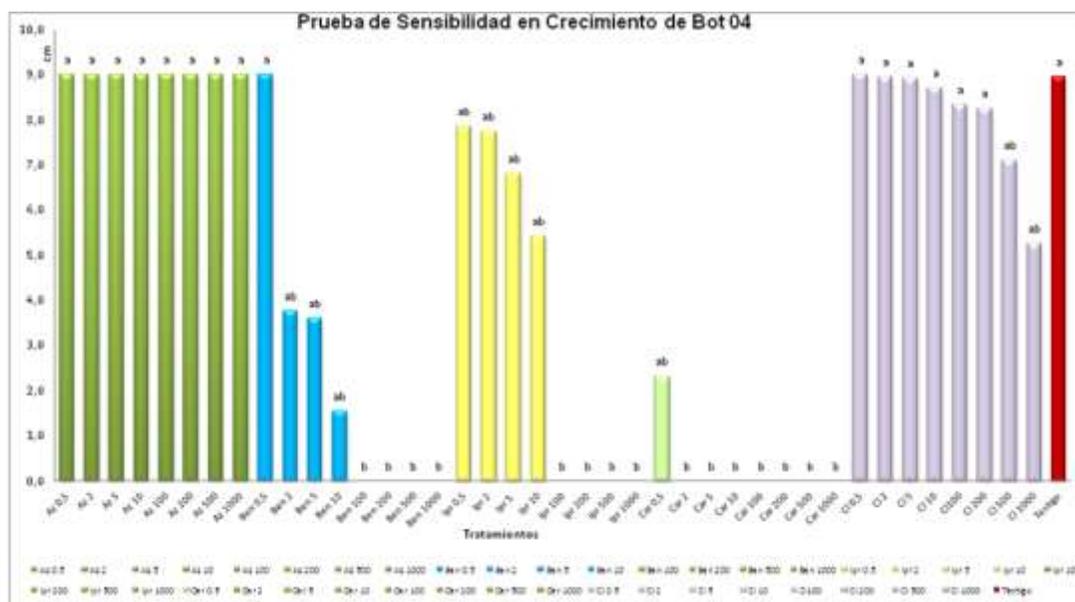


Figura 49. Evaluación del crecimiento micelial de Bot 04 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Las características morfológicas de la colonia fueron muy diversas en comparación con el testigo (**Figura 50**); en los tratamientos con Az hubo formación de anillos concéntricos marrón claro y marrón oscuro con un borde blanco y esporulación en el centro de la placa, en el caso de Ben fue una colonia gris algodonosa, con Car es una colonia con micelio ralo; y con Cl la colonia fue marrón clara y con micelio ralo y algodonoso en el borde de la placa, y en la dosis comercial se encontró en el envés del plato de Petri la formación de abundantes microesclerocios; para Ipr el micelio fue algodonoso en el punto de siembra de la placa y luego se tornó ralo y blanco.

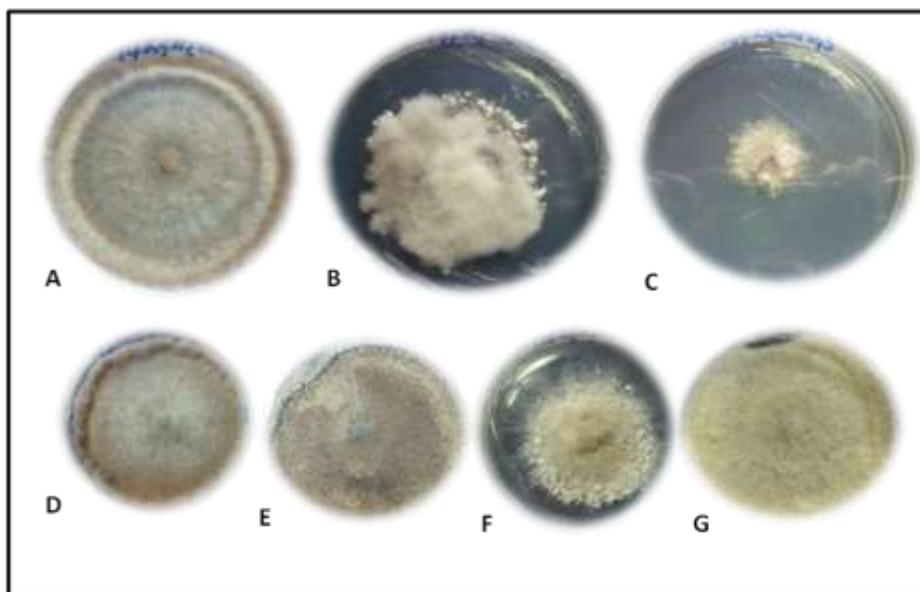


Figura 50. Características de la colonia Bot 04 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 10 ppm; B: Benomilo 5 ppm; C: Carbendazim a 0,5 ppm; D -E: Clorotalonil 5 ppm; F: Iprodione; G: Testigo

En cuanto a la evaluación de la germinación de conidios el resultado no fue similar al de crecimiento; se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, pero en el caso de Az y Cl a 0,5 ppm son los que resultaron mayores que el testigo; y en estos fungicidas la germinación solo ocurrió desde las concentraciones de 0,5 hasta 10 ppm (**Figura 51**). En Ipr solo hubo germinación en las dosis por debajo de la comercial, lo que nos indica que

todavía el hongo presenta sensibilidad al fungicida en esta prueba. Al igual que en el caso de los Benzimidazoles, pudiéndose incorporar estos productos en la rotación, solo y cuando se realice la evaluación de la incidencia y el patógeno se encuentre con las estructuras reproductivas y las condiciones ambientales estén dadas para su diseminación.

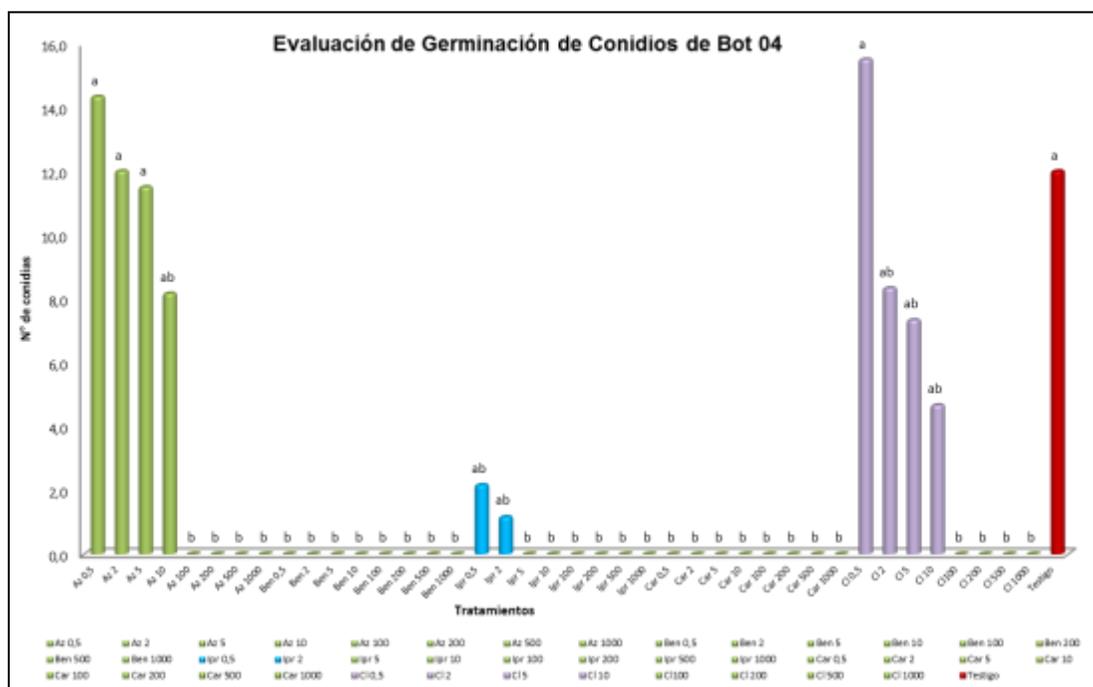


Figura 51. Evaluación de la germinación de conidios de Bot 04 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

⇒ **Bot 05:** Los resultados presentaron las mayores diferencias estadísticas, siendo Az 0,5 - 2; Ben 0,5 - 10 ppm y el testigo son los que presentaron el mayor diámetro de crecimiento de la colonia en este tipo de ensayos (**Figura 52**), como segundo grupo están Az 5 - 10 ppm; Ben 100 - 200 ppm e Ipr 0,5 ppm; un tercer grupo con Ben 500 e Ipr 2ppm y un cuarto grupo significativo comprendido por Az 100-200 ppm. En este caso en particular nuevamente se obtuvo que no había sensibilidad al Ben; pero es la única que no presentó crecimiento en ninguno de los tratamientos con Cl, lo cual nos permite seguir incorporándolo en la rotación de productos para el control. Carrero *et al.*,

2.003 encontraron diversos grupos de fungicidas para el control de la enfermedad; siendo un grupo conformado por Clorotalonil y Mancozeb, *Botrytis* fue capaz de crecer 0,94 y 2,5 cm, otro grupo de fungicidas conformado por Azoxystrobin y Benomilo donde el hongo creció 6,84 y 7,22 cm demostrando de esta manera la resistencia al control de la enfermedad.

Al realizar la comparación de los tratamientos por el día de crecimiento, se pudo observar que a partir del primer día existen diferencias significativas entre los tratamiento (**Anexo 8**) y es solo a partir del 2^{do} día donde se obtuvo que el hongo no fue sensible a Ben, incluyendo su dosis comercial; obteniendo el mayor diámetro (9 cm), a partir del 5^{to} día de evaluación, siendo este el único caso donde se presentó este nivel, presumiendo que el fungicida estimuló el crecimiento del patógeno.

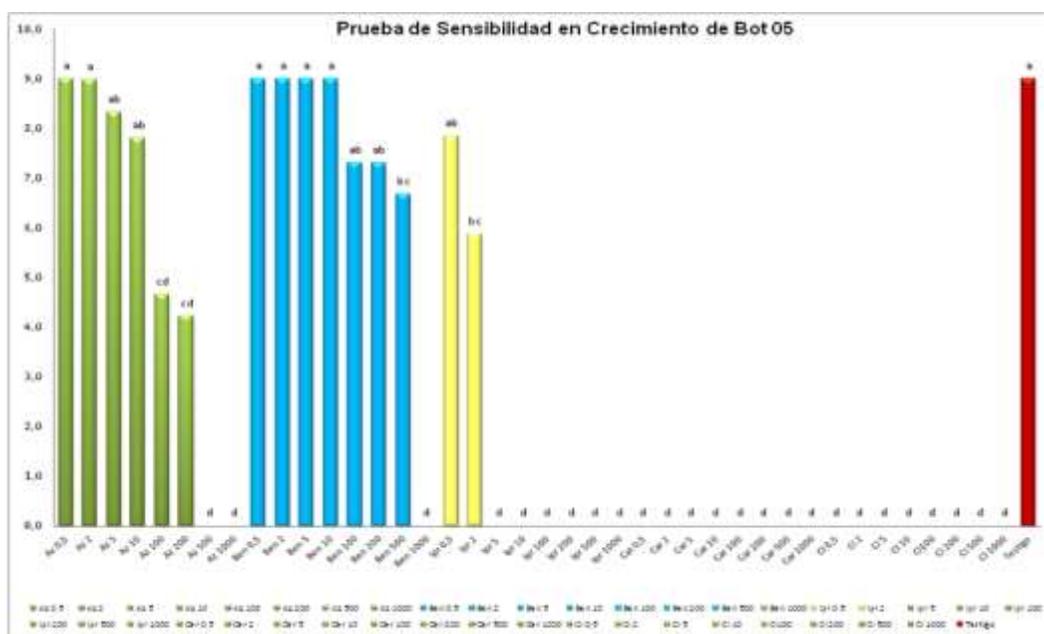


Figura 52. Evaluación del crecimiento micelial de Bot 05 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

En cuanto a las características morfológicas de la colonia en los tratamientos con fungicidas, se observó modificada en comparación con el testigo (**Figura 53**); con Az el crecimiento tuvo un patrón floral de color crema con un micelio ralo en los bordes y una leve esporulación en el punto de siembra; en el caso del Ben se formaron 2 anillos concéntricos y la coloración fue crema y marrón claro, con esporulación hasta los 5 cm de diámetro; con Ipr también el patrón de crecimiento fue floral, pero con un micelio algodonoso de color crema y marrón claro.

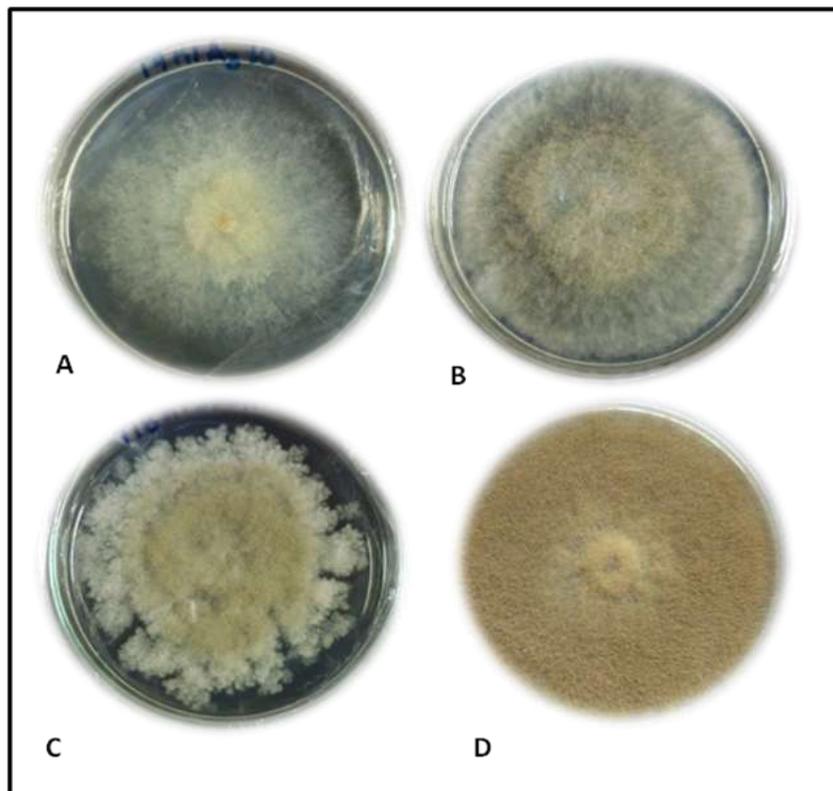


Figura 53. Características de la colonia Bot 05 en la prueba de sensibilidad a fungicidas. A: Azoxystrobin a 10 ppm; B: Benomilo 200 ppm; C: Iprodione 2 ppm; D: Testigo

Al evaluar la germinación de los conidios se presentaron diferencias estadísticamente significativas con la conformación de seis grupos; siendo Ipr 0,5 el que presentó la mayor cantidad de conidias germinadas y solo en Ben

de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) utilizado por Gepp *et al.*, 2012; con la finalidad de conocer cuál es la metodología que mejor se adapta a nuestras cepas.

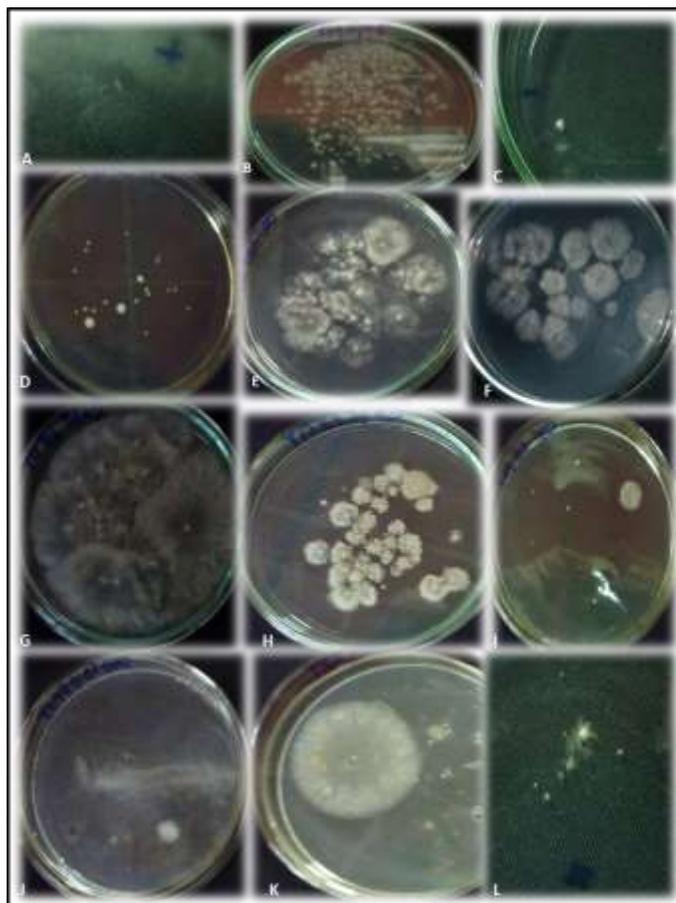


Figura 55. Evaluación de la germinación de conidios de las cepas de *Botrytis cinerea* a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.

Se puede determinar que la falta de sensibilidad o resistencia adquirida a un determinado fungicida se debe al uso continuo en la unidad producción; así como lo señalan diversos autores citados por Kimura *et al.*, 2001 quienes mencionan que existe una correlación de la resistencia de *B. cinerea*, a los fungicidas utilizados en invernaderos de ornamentales; pero en el caso de uva

se logró encontrar una correspondencia entre la resistencia o sensibilidad de los aislamientos y del predio del cual se obtuvieron. FLORVERDE, (2011) realizaron un estudio de la eficacia de fungicidas en rosas en la Sabana de Bogotá utilizando Captan, Mancozeb, y Propineb. En el laboratorio Captan fue quien mostró el mejor control contra *Botrytis*, pero al efectuar las aplicaciones en el campo en espolvoreo y evaluando sobre flores cosechadas e incubadas en cámara húmeda, se encontró que no ejerció ningún control sobre el patógeno.

En el trabajo realizado por Modino, (2001); señala que la resistencia del moho gris de la vid causado por *Botrytis cinerea* a los Dicarbiximidias se presentó desde 1982, y por los resultados obtenidos en este trabajo se debe considerar la posibilidad de efectuar un estudio de resistencia cuantitativa con el fin de establecer la disminución de sensibilidad del patógeno en función del tiempo, para establecer si es continua; direccional o progresiva. Si se toma en cuenta las diversas variables que nos hacen perder la sensibilidad de las cepas ante los fungicidas se puede inferir que la alta frecuencia de aplicaciones de los tratamientos en los distintos cultivos en las unidades de producción y el aumento progresivo de las dosis por parte de los productores, la alta población permanente del patógeno en el ecosistema teniendo hospedantes principales y secundarios (malezas), en el caso específico de Bot 04 - Bot 05 y con una alta producción de propágulos en un tiempo menor de formación de cada generación; hacen que las posibilidades de la creación de una resistencia adquirida y en un futuro se llegue a formar una resistencia cruzada. La utilización de Triazoles para el control del oídio causado por *Erysiphe sp.* en el cultivo, puede controlar también a *B. cinerea*, es por ello la importancia de incluir a estos fungicidas en futuros estudios en ornamentales en el país.

Por lo anteriormente descrito, y por lo reportado por Stehman y De Waard, (1996); Hilber *et al.*, 1995; es necesario efectuar un monitoreo de la

resistencia, con el fin de determinar cuáles son los genotipos resistentes que puedan incrementar su frecuencia en la población, hasta hacer inefectivo el control. Para ello es necesario obtener por lo menos 300 aislamientos y de ellos detectar por lo menos el 1 % con resistencia a un determinado fungicida; así como la incorporación en los ensayos de una cepa donde se haya demostrado la resistencia, preferiblemente en forma molecular, para que sirva de patrón o referencia. Es de importancia efectuar muestreos en los estados Mérida; Táchira; Trujillo y Vargas en los distintos cultivos ornamentales e incluir a las hortalizas en dicho estudio, en vista de que en esos cultivos se presentan pérdidas por el patógeno y de igual manera se utilizan los mismos fungicidas de forma permanente.

7.- Ensayo de control *In vitro* de *Botrytis cinerea*, cepa Bot 05 aislada de gerbera (*Gerbera jamesonii*) con inductores de resistencia.

Para este ensayo se efectuó la selección de una cepa, la cual fue **Bot 05** tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- ⇒ Al efectuar los muestreos se encontró afectando flores, hojas y marchitez de la planta en gerbera de corte y de pote.
- ⇒ Fue la cepa que presentó mayor esporulación en las diferentes condiciones de luz y formación de esclerocios en ambos medios de cultivo.
- ⇒ Presentó un mayor número de conidióforos por área, así como el micelio es capaz de crecer internamente en la hoja.
- ⇒ En las pruebas de patogenicidad fue capaz de causar daño necrótico y el signo se presentó en 72 horas.
- ⇒ Presentó una alta sensibilidad a algunos fungicidas en cuanto al crecimiento de la colonia, pero una baja sensibilidad en cuanto a la germinación de los conidios.

Se observaron diferencias significativas en cada uno de los días de evaluación resultando algunos con diámetros de crecimiento micelial muy similar al del testigo (**Tabla 13**). El tratamiento que presentó menor diámetro de crecimiento fue con Silicio (Qs) 3 ml/l + *Trichoderma* (Tr), sin embargo si se considera el 3^{er} día, por los resultados obtenidos en la patogenicidad observamos que Tr tiene 1,58 cm siendo sólo 0,34 cm menor que el Testigo (Ts), y a pesar de que pertenecen a grupos distintos encontramos a Qs 3 ml/l con 1,66 cm; Ácido Fosfórico (Ag) 3 ml/l + Mezcla de *Trichoderma* (TPA), con 1,81 cm y Quitosano (Bd) 8 ml/l + Tr con 1,86 cm, todos ellos de igual manera fueron de menor valor que el testigo; pero en Ag 7 ml/l y Bd 10 ml/l hallándolo como el mayor crecimiento con 3,73 y 2,78 cm respectivamente, indicando de esta manera que estos tratamientos son los menos indicados para efectuar un control efectivo en lapsos de tiempos cortos.

Para el 7^{mo} día, se obtuvo 3 grupos estadísticos; en el primero de ellos con mayor crecimiento están todas las dosis de Ag, Bd y Qs como inductor solamente, al igual que el testigo con 9 cm de diámetro; el segundo grupo se encuentra conformado por Bd + Tr a 10 - 12 ml/l; Qs 5 ml/l + Tr y Bd 12 ml/l + TPA, indicando que las altas dosis del quitosano y silicio pueden estimular el crecimiento del patógeno. En el tercer grupo se encuentra a Tr, el cual fue el tratamiento que presentó menor crecimiento de Bot 05 con 5,33 cm; seguido por Ag 3 ml/l + TPA con 5,43 cm; Qs 3 ml/l + Tr con 5,48 cm y Bd 8 ml/l + Tr con 5,66 cm, considerándose como tratamientos con un buen control sobre el patógeno.

Tabla 13. Control *In vitro* de Bot 05 con los inductores de resistencia

Tratamientos			Evaluaciones								
			1	2	3	4	5	6	7	PIC	
	1	Agrifos 3 ml/lts	Ag 3	0,73ab	1,22 bcd	2,50 bcd	4,38 bcd	6,89 ab	7,94 abc	9,00 a	0,00 b
Acido Fosfórico	2	Agrifos 5 ml/lts	Ag 5	0,76 ab	1,19 bcd	2,46 bcd	4,35 cd	6,96 ab	7,73 abcd	9,00 a	0,00 b
	3	Agrifos 7 ml/lts	Ag 7	0,74 ab	2,09 a	3,73 a	5,64 a	8,03 ab	8,65 ab	9,00 a	0,00 b
	Quitosano	4	Biorend 8 ml/lts	Bd 8	0,74 ab	1,27 bcd	2,11 bcd	6,02 a	7,84 ab	8,88 a	9,00 a
5		Biorend 10 ml/lts	Bd 10	0,75 ab	1,66 ab	2,78 ab	5,99 a	7,59 ab	8,54 ab	9,00 a	0,00 b
6		Biorend 12 ml/lts	Bd 12	0,73 ab	1,37 bcd	2,42 bcd	5,74 a	7,79 ab	8,73 ab	9,00 a	0,00 b
Silicio	7	Quick sol 2 ml/lts	Qs 2	0,74 ab	1,30 bcd	2,39 bcd	5,65 a	7,84 ab	8,75 a	9,00 a	0,00 b
	8	Quick sol 3 ml/lts	Qs 3	0,75 ab	1,28 bcd	2,18 bcd	5,53 ab	7,73 ab	8,72 ab	9,00 a	0,00 b
	9	Quick sol 5 ml/lts	Qs 5	0,75 ab	1,31 bcd	2,26 bcd	5,59 a	7,54 ab	8,56 ab	9,00 a	0,00 b
Trichoderma harzianum	10	Tricobiol	Tr	0,65 ab	1,01 cd	1,58 d	2,46 hijk	3,93 b	4,78 gh	5,33 b	40,74 a
Mezcla de Trichoderma	11	Tricho Plus A	TPA	0,90^a	1,14 bcd	2,37 bcd	3,78 def	5,23 ab	5,79 defgh	6,58 b	26,85 ab
Ácido Fosfórico + Trichoderma harziaunm	12	Agrifos 3 ml/lts + Tricobiol	Ag 3 + Tr	0,93^a	1,18 bcd	2,37 bcd	3,67 defg	4,95 a	5,87 defgh	6,61 b	26,57 ab
	13	Agrifos 5 ml/lts + Tricobiol	Ag 5 + Tr	0,80 ab	1,18 bcd	2,23 bcd	2,75 fghijk	5,12 ab	5,66 efgh	6,48 b	27,96 ab
	14	Agrifos 7 ml/lts + Tricobiol	Ag 7 + Tr	0,79 ab	1,13 bcd	2,09 bcd	2,75 fghijk	4,88 ab	5,78 defgh	6,58 b	26,94 ab
Quitosano + Trichoderma harziaunm	15	Biorend 8 ml/lts + Tricobiol	Bd 8 + Tr	0,75 ab	1,54 abcd	1,86 bcd	2,60 ghijk	4,13 b	5,03 fgh	5,66 b	37,13 ab
	16	Biorend 10 ml/lts + Tricobiol	Bd + Tr	0,92^a	1,13 bcd	2,23 bcd	3,46 defghi	5,01 ab	6,95 abcdef	7,58 ab	15,83 ab
	17	Biorend 12 ml/lts + Tricobiol	Bd + Tr	0,79 ab	1,22 bcd	2,06 bcd	2,71 fghijk	4,65 ab	6,06 cdefgh	7,03 ab	21,85 ab

Continuación...

Tratamientos				Evaluaciones							
				1	2	3	4	5	6	7	PIC
Silicio + Trichoderma harzianum	18	Quick sol 2 ml/lts + Tricobiol	Qs 2 + Tr	0,80 ab	1,38 bcd	2,02 bcd	3,53 defgh	4,72 ab	5,45 efgh	6,33 b	29,63 ab
	19	Quick sol 3 ml/lts + Tricobiol	Qs 3 + Tr	0,64 ab	0,98 d	1,66 cd	1,73 k	3,74 b	4,47 h	5,48 b	39,17 a
	20	Quick sol 5 ml/lts + Tricobiol	Qs + Tr	0,94^a	1,18 bcd	2,24 bcd	3,73 defg	4,45 ab	5,75 defgh	6,84 ab	23,98 ab
Ácido Fosfórico + Mezcla de Trichoderma	21	Agrifos 3 ml/lts + Tricho Plus A	Ag 3 + TPA	0,73 ab	0,96 d	1,81 bcd	2,34 ijk	3,95 b	4,85 gh	5,43 b	39,72 a
	22	Agrifos 5 ml/lts + Tricho Plus A	Ag 5 + TPA	0,71 ab	1,03 cd	1,96 bcd	2,74 fghijk	4,59 ab	5,53 efgh	6,52 b	27,59 ab
	23	Agrifos 7 ml/lts + Tricho Plus A	Ag 7 + TPA	0,77 ab	1,15 bcd	2,05 bcd	2,69 fghijk	4,73 ab	5,40 efgh	6,54 b	27,31 ab
Quitosano + Mezcla de Trichodermas	24	Biorend 8 ml/lts + Tricho Plus A	Bd 8 + TPA	0,76 ab	1,12 bcd	2,33 bcd	2,68 fghijk	4,52 ab	5,13 fgh	6,29 b	30,09 ab
	25	Biorend 10 ml/lt + Tricho Plus A	Bd 10 + TPA	0,51 b	1,18 bcd	2,35 bcd	3,26 defghij	4,93 ab	5,74 defgh	6,43 b	28,61 ab
	26	Biorend 12 ml/lt + Tricho Plus A	Bd 12 + TPA	0,89^a	1,08 bcd	2,14 bcd	2,72 fghijk	4,69 ab	6,68 bcdefg	6,68 ab	25,74 ab
	27	Quick sol 2 ml/lt + Tricho Plus A	Qs 2 + TPA	0,75 ab	1,58 abc	1,99 bcd	2,14 jk	4,58 ab	5,59 efgh	6,58 b	26,85 ab
Silicio + Mezcla de Trichoderma	28	Quick sol 3 ml/lt + Tricho Plus A	Qs 3 + TPA	0,77 ab	1,38 bcd	2,19 bcd	3,13 efghij	4,54 ab	5,49 efgh	6,48 b	28,06 ab
	29	Quick sol 5 ml/lt + Tricho Plus A	Qs 5 + TPA	0,87^a	1,28 bcd	2,13 bcd	3,14 efghij	4,32 b	5,11 fgh	6,50 b	27,78 ab
Testigo	30	Testigo	Ts	0,83 ab	1,22 bcd	1,92 bcd	4,03 de	7,19 ab	7,23 abcde	9,00 a	0,00 b

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Tukey (P<0,05).

En cuanto al Porcentaje de Inhibición de Crecimiento (PIC), los mejores tratamientos fueron Tr con 40,74 %; seguido de Ag 3 ml/l + TPA con 39,72 % y QS 3 ml/l + Tr con 39, 17%.

Al evaluar las características fungistáticas de este ensayo, se pudieron observar diferencias entre los tratamientos a partir del 3^{er} día. En el caso de los enfrentamientos con *Trichoderma* (**Figura 56**), se evidenció el poco crecimiento que presenta Bot 05 en el tratamiento con *Trichoderma harzianum* (Tr), en comparación con la mezcla de *Trichoderma* (TPA), pero al hacer énfasis en los controladores la colonia de TPA, es más compacta y con mayor evidencia de esporulación. En la combinación de los tratamientos los que demostraron una mejor tendencia al control estadísticamente, de igual manera lo mostraron fúngicamente (**Figura 57**), resaltándose los cambios de color en la colonia y el medio de cultivo por parte de TPA con Ácido Fosfórico (Ag) a 3 - 5 ml/l, Silicio (Qs) a 2 ml/l y Quitosano (Bd) a 10 m/l y la alta formación de conidias. Pero en el caso de Qs 3 ml/l + Tr, es el único el cual la cepa de *Trichoderma* presenta una marcada esporulación. Un resultado que debe ser tomado en cuenta es el obtenido por Bd, es uno de los productos de mayor uso en la unidad de producción y por recomendación del fabricante se pueden utilizar dosis mayores a las comerciales, sin embargo por lo observado en la **Figura 58**, se evidencia un favorecimiento en el crecimiento del patógeno y no así en los *Trichodermas*.

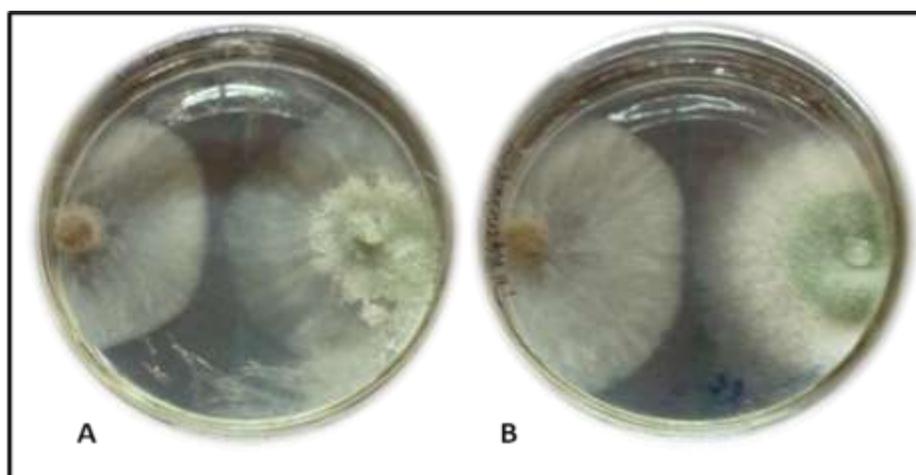


Figura 56. Evaluación *In vitro* al 3^{er} día. A: Enfrentamiento con Tricobiol; B: Enfrentamiento con Trico Plus A

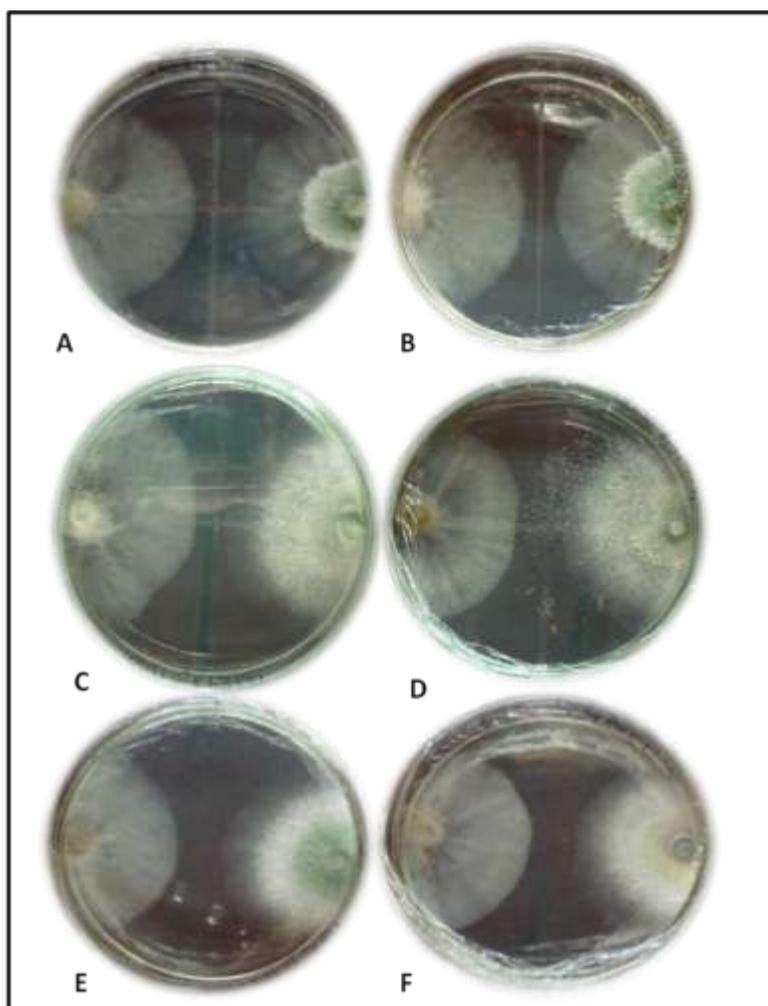


Figura 57. Ensayo *In vitro* al 3^{er} día. A: Biorend 8 ml + Tricobiol; B: Quick sol 3 ml + Tricobiol; C: Agrifos 5 ml+ Trico Plus A; D: Agrifos 3 ml + Trico Plus A; E: Quick sol 2 ml + Trico Plus A; F: Biorend 10 ml + Trico Plus A



Figura 58. Comportamiento del patógeno ante la dosis más alta de Biorend y el enfrentamiento con las cepas comerciales de *Trichoderma*. A: Enfrentamiento con Tricobiol; B: Enfrentamiento con Trico Plus A

A los 7 días se encontró que los enfrentamientos con *Trichoderma*, que a pesar de que Tr, fue el mejor tratamiento en el PIC, se produjo una alta esporulación por parte del patógeno (**Figura 59**), en comparación con TPA, el cual produjo cambios de color en la colonia, invasión del espacio logrando un micelio ralo y con esporulación solo en el punto de crecimiento por parte de Bot 05. Mientras que Ponce, (2002) obtuvo que la mezcla de las cepas nativas de *Trichoderma* fueron la más eficaces en el control de *Botrytis cinerea* en Frutilla (*Fragaria chiloensis* y *F. Ananassa*) a nivel *In vitro* e *In vivo*. Mientras que Arco, (2011) en la evaluación de 17 cepas nativas, seleccionó una cepa promisorio (10B *Trichoderma atroviridae*), la cual mostró características biocontroladoras, crecimiento y capacidad de formación *In vitro* en *Botrytis cinerea* aislada de rosa.

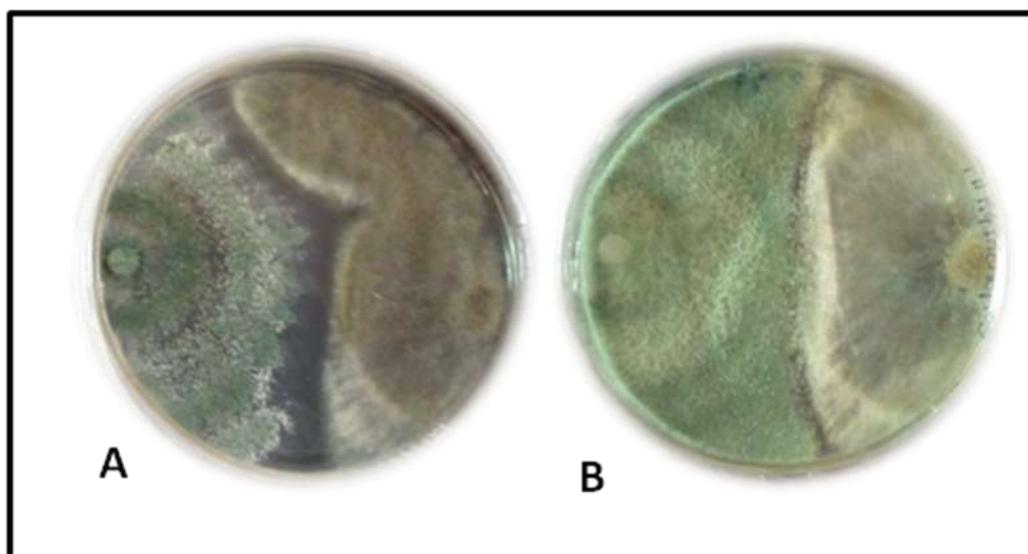


Figura 59. Comparación del enfrentamiento de *Trichoderma* con Bot 05. A: Bot 05 + Tricobiol; B: Bot 05 + Trico Plus A

Al comparar los 4 mejores tratamiento, en los cuales se obtuvo el menor crecimiento del patógeno, encontramos que Qs 3 ml + Tr, fue el tratamiento que no presentó esporulación de Bot 05 (**Figura 60**). Y cuando se evaluó el comportamiento de los *Trichodermas* y su pudo observar la alta esporulación por parte del patógeno, pero en el caso de TPA se evidencia la mezcla de las cepas, predominando una de ellas en el centro de la colonia. Sin embargo Bautista *et al.*, 2006 reportan que la disminución en el crecimiento a nivel *In vitro* con quitosano a 0,75 mg/l de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*, sin embargo se puede estimular la esporulación en *P. digitatum*, en concentraciones de 0,5 y 1,5 %.

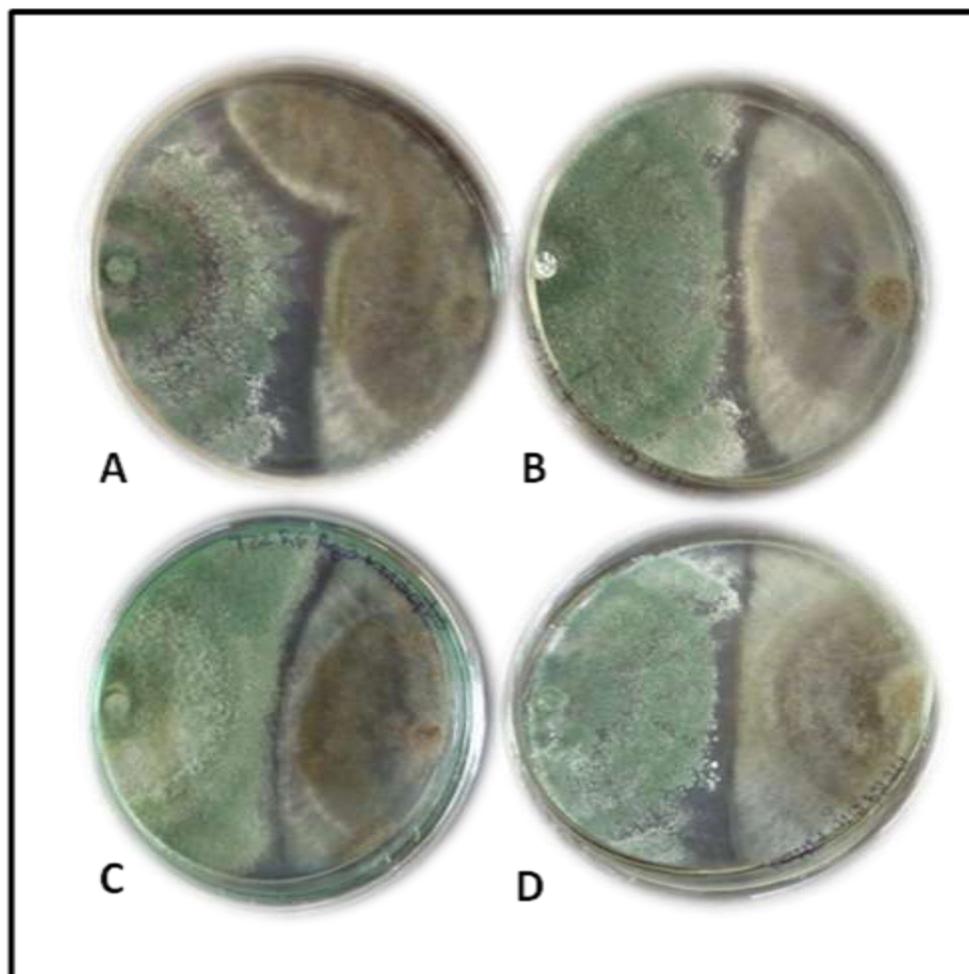


Figura 60. Los mejores tratamientos en el control *In vitro* de Bot 05. A: Bot 05 + Tricobiol; B: Bot 05 + Quick sol 3 ml/l + Tricobiol; C: Bot 05 + Agrifos 3 ml/l + Trico Plus A; D: Bot 05 + Biorend 8 ml/l + Tricobiol

Algunos autores, tales como Bautista y Bravo (2004); Hernández *et al.*, 2005 y Bautista *et al.*, 2006, señalan la capacidad de algunos inductores los cuales, son capaces de controlar o cambiar las características de *B. cinerea*. En nuestro caso se evidencian diferencias en las colonias con Ag (**Anexo 8**), observándose una menor esporulación en Ag 7 ml/l y deformación del micelio; mientras que en el caso de Bd, se mostró la formación de anillos concéntricos (**Anexo 9**). En el caso de Qs, la colonia no presentó esporulación, y se formaron mayor cantidad de anillos concéntricos en comparación con Bd, pero

en las dosis de 2 - 3 ml/l hubo una degeneración del micelio, siendo esta una buena estrategia de control.

Si evaluamos las características del resto de los tratamientos, estos se caracterizaron de la siguiente manera:

⇒ Ácido Fosfórico (Ag) + *Trichoderma harzianum* (Tr): Al aumentar la dosis del Ag aumenta la esporulación del patógeno (**Anexo 11**), lo que demuestra que la combinación de estos tratamientos pudiera no ser el más indicado.

⇒ Quitosano (Bd) + *Trichoderma harzianum* (Tr): En las dosis menores se formó una barrera entre ambos microorganismos marcaron su delimitación, sin embargo esta barrera sufrió una ruptura por parte de **Bot 05** invadiendo a Tr (**Anexo 12**).

⇒ Silicio (Qs) + *Trichoderma harzianum* (Tr): A medida que aumento la dosis de Qs disminuyó el tamaño de Tr y su esporulación, sin embargo a 3 ml/l no se obtuvo esporulación del patógeno (**Anexo 13**).

⇒ Ácido Fosfórico (Ag) + Mezcla de *Trichoderma* (TPA): En los tratamientos con 3 y 5 ml/l, en la dosis de 5 ml fue la única donde el patógeno no formó esporulación a medida que creció (**Anexo 14**), siendo esta una buena alternativa para el control de la enfermedad.

⇒ Quitosano (Bd) + Mezcla de *Trichoderma* (TPA): El patógeno llegó a esporular y formar una barrera para impedir el avance del TPA. (**Anexo 15**).

⇒ Silicio (Qs) + Mezcla de *Trichoderma* (TPA): En este caso solo en la dosis mayor de Qs, fue el que presentó esporulación del patógeno (**Anexo 16**), y observándose una mayor inhibición en Qs 3 ml/l.

8.- Ensayo de control *In vivo* de *Botrytis cinerea* (Bot 05) aislada de gerbera (*Gerbera jamesonii*) con inductores de resistencia

Al efectuar este ensayo se tomó en cuenta lo reportado por Garcés y Orozco, (2007), en un ensayo montado en la sabana de Bogotá con *Botrytis cinerea*, la cual fue capaz de atacar a diversos cultivos de ornamentales, bajo las condiciones ambientales, donde la alta humedad relativa tanto diurna como nocturna, sumada a las temperaturas relativamente altas durante el día, provocan la germinación de las esporas y un desarrollo rápido del hongo el cual puede ser de muy difícil control. Es por ello que se consideraron estas condiciones para efectuar el ensayo en Experta – UCV – FAGRO en el mes de febrero de 2012, y se obtuvo dentro del invernadero variaciones de temperaturas de 10 ± 2 °C entre el día y la noche, logrando una humedad relativa mayor del 90 % con humedecimiento constante de papel periódico, el cual se colocó alrededor de las plantas de gerbera; garantizando de esta manera la patogénesis o la acción del patógeno ante el hospedante como se pudo observar en el tratamiento testigo.

Uno de los principales objetivos de la ejecución de este ensayo además de corroborar los resultados obtenidos en el ensayo *In vitro*; es evaluar la factibilidad de la aplicación de estos tratamientos con fines de rentabilidad del cultivo, y si las plantas pueden ser o no comerciales, si estas son afectadas por la enfermedad, de tal forma de darle alternativas viables al productor en función de resolver un problema en la unidad de producción. Al evaluar las variables agronómicas (**Tabla 14**), en el control *In vivo* del patógeno, encontramos diferencias en el comportamiento de los tratamientos con respecto al ensayo *In vitro*; siendo sólo el ácido fosfórico 3 ml/l (Ag 3) + Mezcla de *Trichoderma* (TPA), el que resultó como uno de los mejores tratamientos en ambos ensayos. Al evaluar el porcentaje de calcio en las hojas, encontramos que el ácido fosfórico + mezcla de *Trichoderma* (Ag 5 + TPA) y el silicio +

Trichoderma (Qs 2 + Tr) con 0.94 - 0.98 %, respectivamente fueron los tratamientos donde hubo mayor consumo, sin embargo al realizar la comparación con el testigo nos encontramos que en todos los tratamiento se presentó un consumo de calcio, sin llegar a bajar los niveles críticos en el cultivo.

Diversos autores señalan la importancia del calcio en el cultivo, entre ellos estan Albino *et al.*, 2003, quienes señalan la importancia del calcio en el cultivo cuando son flores de corte, logrando disminuir los tiempos de corte y mayor numero de inflorescencias en los tratamientos cuando se suministro 9 y 12 meq Ca^{2+} / L y una vida en postcosecha de 18 días. Mientras que Bernal y Ballen, (2007) mencionan que el nivel bajo de calcio en los tejidos vegetales ocasiona un incremento en la permeabilidad de la membrana celular, haciendo que la susceptibilidad a las infecciones aumenten. Los iones de calcio también inhiben las enzimas pectolíticas producidas por los hongos al germinar sus esporas y empleadas para penetrar la superficie foliar lo cual concuerda con lo dicho por Garcés y Orozco, (2007). Las aplicaciones de calcio efectuadas por Rojas *et al.*, 2009 lograron una tendencia de mayor grosor de pared de las células de la rizodermis de ajo (*Allium sativum*), en aquellos tratamientos donde se aplicó nitrato de calcio, y la triple combinación (Brócoli-Calcio-*Trichoderma*), en comparación con el tratamiento control. El suministro de calcio es importante en el control integrado de enfermedades ya sea por efecto directo, por su acción protectora (resistencia de los tejidos) o por la inhibición de la poligalacturonasa (enzima relacionada con la desintegración de tejidos). El calcio cumple un papel enzimático indirecto a través de la calmodulina, enzima que se encuentra en la pared celular y actúa como segundo mensajero regulando procesos como la mitosis, crecimiento del ápice, germinación de esporas, formación de yemas, secreción de alfa amilasa y el transporte polar del ácido indol acético (García y Giraldo, 2009).

En cuanto al potasio no se presentó un consumo significativo, en comparación con el rango establecido por Coliap, 1989. En el caso de la aparición de las hojas banderas, después del comienzo de la aplicación de los tratamientos, Ag5 + Tr fue el que obtuvo el menor tiempo con 3.6 días, siendo esta una variable agronómica de importancia en las labores culturales del cultivo como es el deshoje, el cual permite la eliminación de las hojas viejas de la planta, las cuales frecuentemente son reservorios del patógeno; y en algunas épocas del año esta práctica se pospone por la generación de nuevas hojas en las plantas. Otras de las variables de relevancia es el número de hojas y el largo de las mismas; en este caso el mejor tratamiento fue Qs 5 ml/l + TPA con 4.6 hojas y 11.5 cm valores que se duplicaron en comparación con el testigo; demostrándonos de esta manera la capacidad del producto en el control de la enfermedad y justificando su aplicación en un mejoramiento de la calidad de la planta, y haciendo que esta salga al mercado en menor tiempo.

Por otra parte la formación de barreras estructurales, es uno de los mecanismos de defensa más evidentes es la producción y deposición de sustancias que actúan como barreras físicas evitando el avance del patógeno; estas pueden ser la lignificación. Estos mecanismos incluyen principalmente la muerte celular por reacción hipersensible, y la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno, entre otros. La reacción hipersensible además esta asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR, que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida o SAR. El fenómeno de *muerte*

celular programada o PCD este mediado por una explosión oxidativa que libera agentes altamente oxidantes llamados AOS (especies activadoras de oxígeno)", tales como el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [Bernal y Ballen, 2007; Madriz, 2002], con esta investigación queda comprobado que este tipo de respuestas se presentan en el cultivo; sin embargo es necesario efectuar estudios anatómicos para corroborar las estructuras que se formaron para la limitación de del avance del patógeno en los distintos tratamientos sobre todo en aquellos donde se utilizó silicio y ácido fósforo, como se observa más adelante. Sin embargo por la virulencia que presenta el patógeno es necesario conocer cuáles son las rutas metabólicas que presentaron las plantas a las 48 y 72 horas después de la inoculación, que fue cuando ocurrió la mayoría de la presencia de los síntomas.

Tabla 14. Evaluación de las variables agronómicas en el ensayo de control *In vivo* de Bot 05 con inductores de resistencia.

	Tratamientos			Calcio (%)	Potasio (%)	Aparición de Hojas Banderas (*)	Número de Hojas Banderas	Largo de las Hojas Banderas
	Descripción	Dosis						
T1	<i>Trichoderma</i> (Tricobiol)	0.25 g/l	Tr	1	4.11	5.4 bcd	2.8 def	7.8 ef
T2	Ácido Fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Trico Plus A)	3 ml/l + 0.25 g/l	Ag 3 + TPA	1.1	4.19	3,8 f	3,4 bcd	8,8 cd
T3	Silicio + <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Tricobiol)	3 ml/l + 0.25 g/l	Qs 3 + Tr	1.22	4.63	5.4 bcd	2.5 ef	7.4 f
T4	Quitosano + <i>Trichoderma</i> (Biorend + Tricobiol)	8 ml/l + 0.25 g/l	Bd 8 + Tr	1.03	3.45	4.6 de	4.0 abc	10.4 b
T5	Ácido Fosfórico + <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Tricobiol)	5 ml/l + 0.25 g/l	Ag 5 + Tr	1	3.68	3.6 f	4.5 a	7.4 f
T6	Quitosano + <i>Trichoderma</i> (Biorend + Tricobiol)	10 ml/l + 0.25 g/l	Bd 10 + Tr	1.06	4.22	4.8 cd	4.4 a	8.0 ef
T7	Silicio + <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Tricobiol)	2 ml/l + 0.25 g/l	Qs 2 + Tr	0.98	4.61	5.4 bcd	2.4 f	6.0 g
T8	Ácido Fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Trico Plus A)	5 ml/l + 0.25 g/l	Ag 5 + TPA	0.94	3.66	5.6 bc	3.3 cde	7.5 f
T9	Ácido Fosfórico + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Agrifos + Trico Plus A)	7 ml/l + 0.25 g/l	Ag 7 + TPA	1.09	3.94	5.4 bcd	4.5 a	9.1 c
T10	Quitosano + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Biorend + Trico Plus A)	8 ml/l + 0.25 g/l	Bd 8 + TPA	1.1	4.45	6.0 ab	2.4 f	7.8 ef
T11	Quitosano + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Biorend + Trico Plus A)	10 ml/l + 0.25 g/l	Bd 10 + TPA	1.08	4.37	5.6 bc	4.1 ab	9.4 c
T12	Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Trico Plus A)	0.25 g/l	TPA	1.03	4.54	6.1 ab	2.5 ef	8.2 de
T13	Silicio + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Trico Plus A)	3 ml/l + 0.25 g/l	Qs 3 + TPA	1.01	4.12	5.9 b	3.4 bcd	9.0 c
T14	Silicio + Mezcla de <i>Trichoderma</i> (Quick sol + Trico Plus A)	5 ml/l + 0.25 g/l	Qs 5 + TPA	1.14	3.62	5.6 bc	4.6 a	11.5 a
T15	Testigo	ADE	Ts	1.23	3.77	6.9 a	2.6 def	5.5 g

NIVELES MEDIOS EN GERBERA (COLJAP*, 1989). Potasio %= 2.20-3.20; Calcio %= 1.00-1.40; (*) = Días después de la aplicación de los tratamientos. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Tukey (P<0,05).

Al evaluar las características de las plantas en cuanto al control de calidad para el mercadeo, se observó diferencias significativas entre los tratamientos en comparación con el testigo; sin embargo a la hora de seleccionar un tratamiento con fines del control en las diversas épocas del año y la eficacia de estos, así como su posible combinación con otros métodos de control es de importancia considerar los siguientes resultados:

⇒ **T1 (Tr):** Se observó poco desarrollo general de la planta; las hojas bajas presentaron amarillamiento y cambio en el ángulo de inclinación a los 4 ddi (**Figura 61**); las manchas foliares se comenzaron a evidenciar a las 48 h después de la inoculación con pequeños puntos cloróticos, las cuales avanzaron hasta las 96 h, y se comenzó a formar un borde púrpura y manteniéndose el halo amarillo. A pesar de que hubo humedad sobre la lámina foliar no se observó el signo de la enfermedad.



Figura 61. Control de Bot 05 con *Trichoderma harzianum* (Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Hojas bajas y bandera con los síntomas; C: Detalle de las manchas foliares.

⇒ **T2 (Ag 3 + TPA):** Las plantas presentaron buenas características comerciales, fácilmente se distinguen las hojas banderas que emergieron después de la aplicación del tratamiento (**Figura 62**). El primer síntoma de la presencia de la enfermedad se evidenció en el amarillamiento de las hojas viejas y bajas a las 48 horas después de la inoculación. En este tratamiento no se observaron manchas foliares, resultando un control efectivo de la enfermedad en el cultivo.



Figura 62. Control de Bot 05 con Ácido Fosfórico + Mezcla de *Trichoderma* (Agrifos 3 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de Gerbera culminado el ensayo; B: Hojas bajas y bandera

⇒ **T3 (Qs 3 + Tr):** Las plantas no presentaron características agronómicas apropiadas para la comercialización, las hojas banderas se mantuvieron erguidas, mientras que las maduras y bajas cambiaron el ángulo de inclinación y su coloración, demostrando de esta manera la presencia de la enfermedad (**Figura 63**). Las manchas foliares fueron necróticas, de color marrón e irregulares y de diversos tamaños, pero en forma general presentaron un halo amarillo y un borde impidiendo el avance de la enfermedad. No se observó el signo del patógeno.

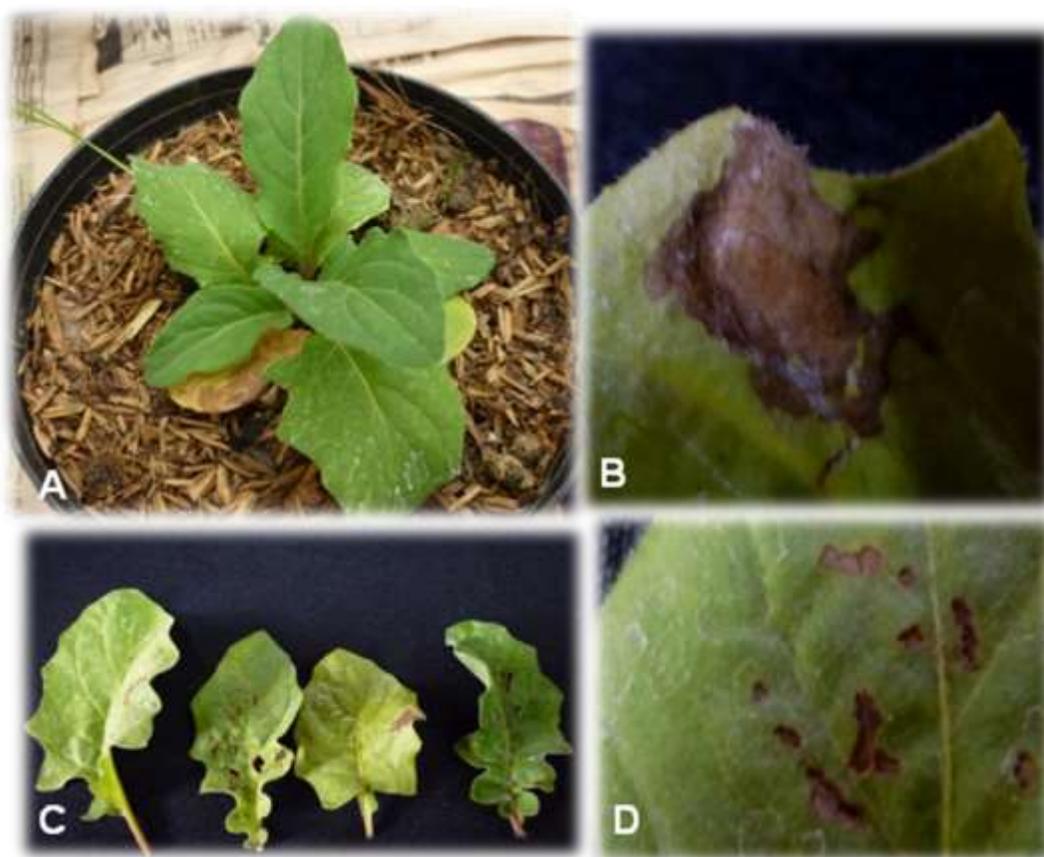


Figura 63. Control de Bot 05 con Silicio + *Trichoderma* (Quick sol 3 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Mancha foliar con halo amarillento; C: Vista de hojas bajas; C: mancha necrótica

⇒ **T4 (Bd 8 + Tr)**: Las plantas presentaron síntomas de marchitez a partir del 4^{to} ddi, las hojas maduras y bajas hubo cambios en el ángulo de inserción y la hoja tiene un aspecto de deshidratación, y las hojas banderas presentan un doblez del borde hacia el centro de la planta (**Figura 64**). Las manchas foliares se formaron en el borde de las hojas a las 48 h después de la inoculación. Estas eran irregulares, necróticas de color marrón claro, pequeñas y fácilmente pasan desapercibidas.

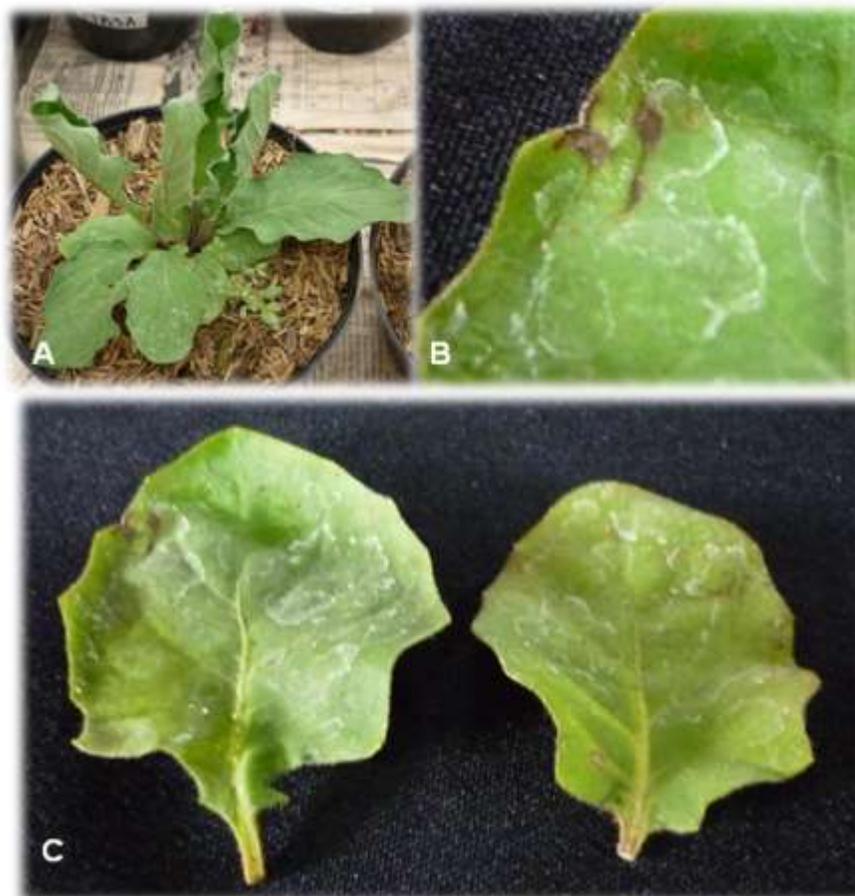


Figura 64. Control de Bot 05 con Quitosano + *Trichoderma* (Biorend 8 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Mancha foliar; C: Vista de hojas bajas

⇒ **T5 (Ag 5 + Tr)**: Las plantas presentaron poco desarrollo vegetativo, lo cual las hizo no comerciales. Los primeros síntomas se evidenciaron con pequeños puntos necróticos a las 48 horas después de la inoculación en diferentes partes de la lámina foliar, y estas se desarrollaron hasta formar manchas de 0,9 a 1,5 cm, las cuales fueron creciendo en el borde de la hoja (**Figura 65**), con la presencia de un fuerte halo amarillo y evidencia del signo de la enfermedad. También se evidenció la presencia de la enfermedad por la necrosis en la base del pecíolo de las hojas bajas, cambio en la inclinación del ángulo de inserción de las hojas, así como la deformación del limbo foliar en las hojas banderas, en forma general se comenzó a presentar los síntomas de marchitez a partir del 4^{to} ddi.

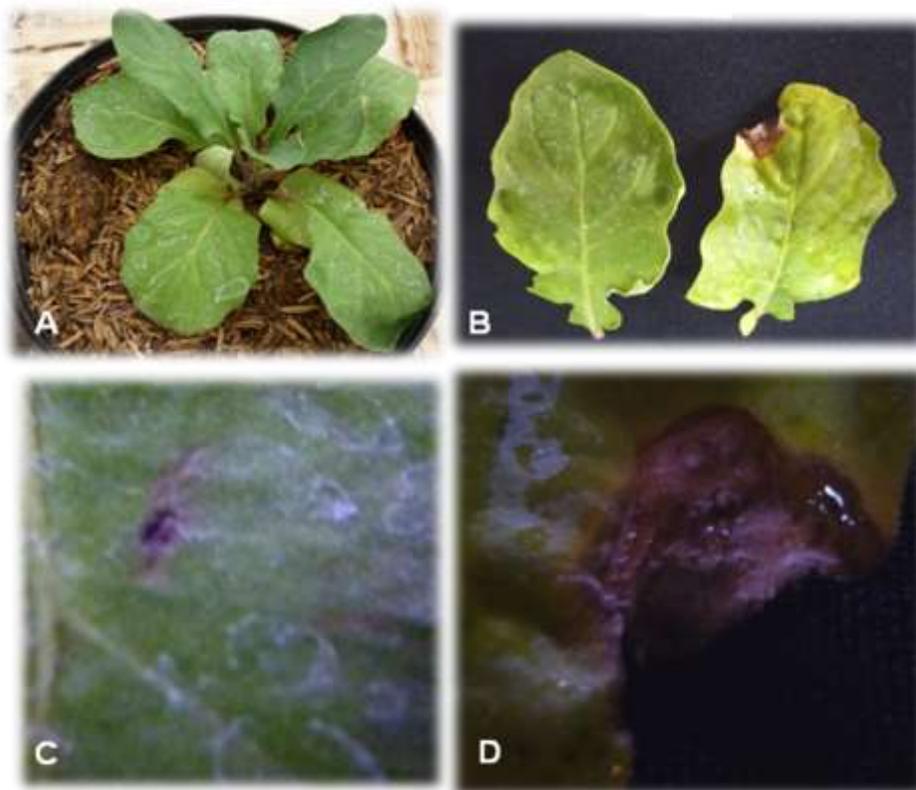


Figura 65. Control de Bot 05 con Ácido Fosfórico + *Trichoderma* (Agrifos 5 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Vista de hojas bajas; C: Mancha foliar necrótica; D: Mancha foliar con halo amarillento y signo de la enfermedad

⇒ **T6 (Bd 10 + Tr):** Las plantas presentaron excelentes características agronómicas, haciéndolas aptas para la comercialización. El síntoma de la enfermedad se presentó a las 24 h después de la inoculación con el amarillamiento de las hojas bajas y manchas necróticas en las mismas (**Figura 66**), las cuales se formaron en el borde de las hojas, siendo de color marrón claro y con la presencia de un halo amarillo claro. Solo en 1 hoja se logró ver el signo de la enfermedad. Y en forma general estas plantas presentaron mayor cantidad de riego en vista de que fueron muy susceptibles a la deshidratación de los tejidos.

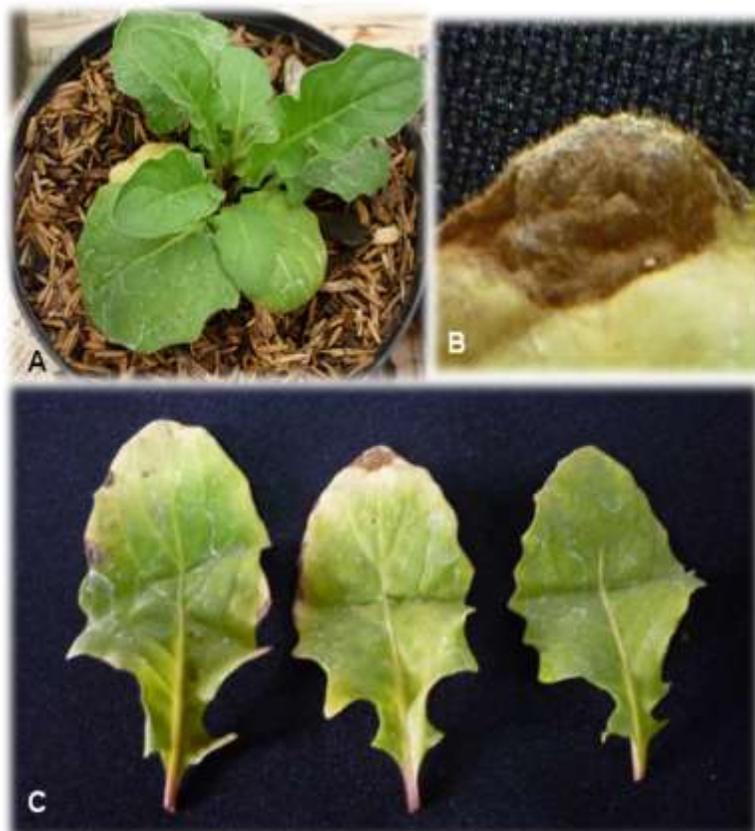


Figura 66. Control de Bot 05 con Quitosano + *Trichoderma* (Biorend 10 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Mancha foliar con halo amarillento y signo de la enfermedad; C: Vista de hojas bajas

⇒ **T7 (Qs 2 + Tr)**: Las plantas presentaron características apropiadas para la comercialización, a pesar de tener hojas pequeñas (**Figura 67**), En las cuales se formaron puntos necróticos a las 48 h después de la inoculación, estos fueron de color negro y marrón oscuro, y a partir de las 72 h se evidenció un hundimiento en el tejido afectado y la formación de un borde delimitatorio de la misma.

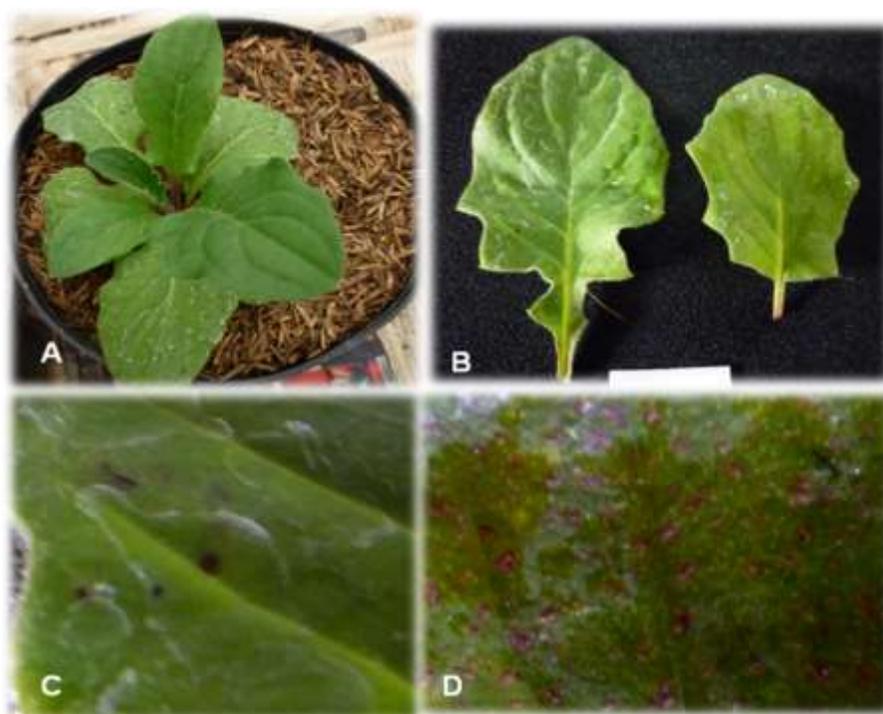


Figura 67. Control de Bot 05 con Silicio + *Trichoderma* (Quick sol 2 ml/l + Tricobiol). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Vista de hojas bajas; C-D: Detalle de las manchas foliares

⇒ **T8 (Ag 5 + TPA)**: Las plantas presentaron poco desarrollo foliar; aunque se evidencia una diferencia entre las hojas banderas después de la primera aplicación del tratamiento, siendo estas con mayor vigor pudiéndose observar la manifestación de los tricomas en la nervadura principal de las hojas, siendo una característica de evaluación del vigor del cultivo (**Figura 68**). A las 24 h después de la inoculación se presentó la formación de pequeñas manchas

necróticas en diferentes zonas de las hojas y un amarillamiento desde la base de las hojas hacia el ápice, el cual no avanzó a partir de las 48 h. Demostrando de esta manera un efectivo control de la enfermedad.

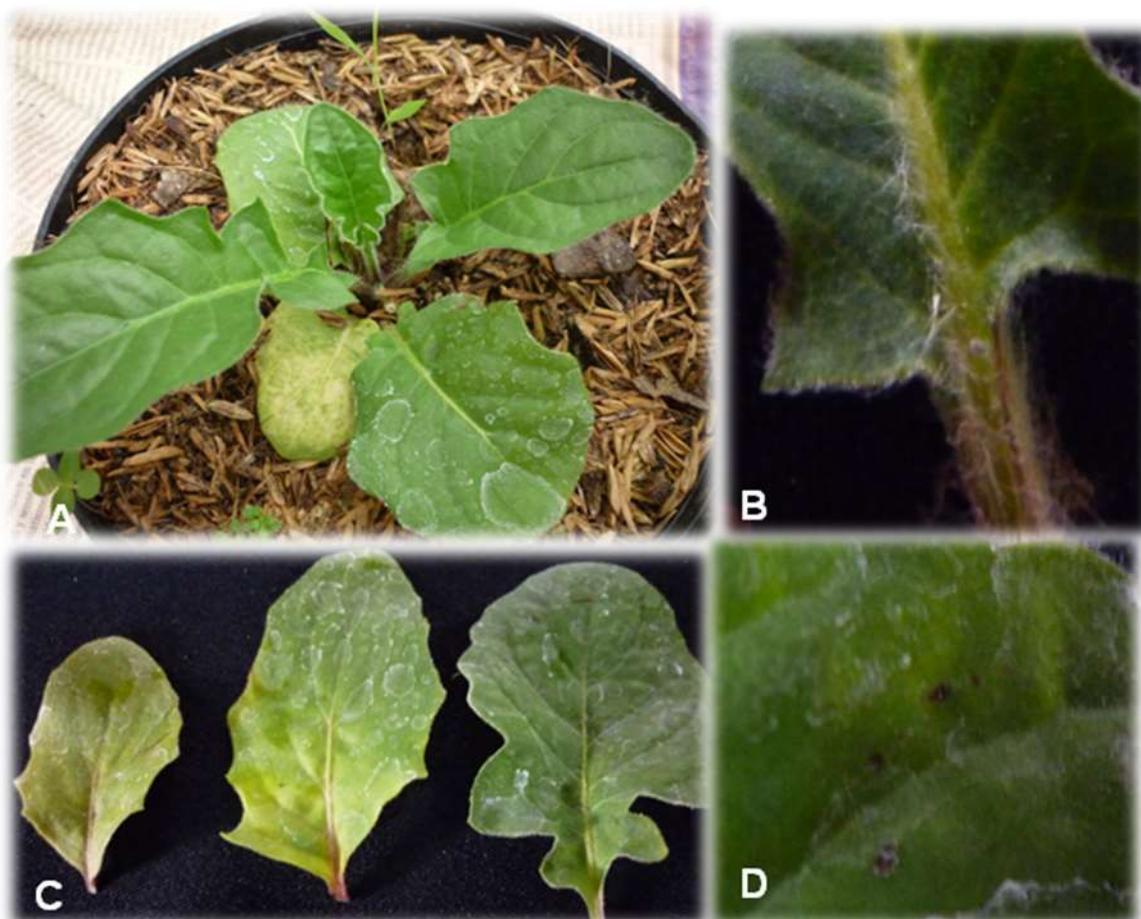


Figura 68. Control de Bot 05 con Ácido Fosfórico + Mezcla de *Trichoderma* (Agrifos 5 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de los tricomas en las hojas; C: Vista de hojas bajas; D: Manchas foliares

⇒ **T9 (Ag 7 + TPA)**: Las plantas presentaron buenas características agronómicas para su comercialización, no existieron diferencias entre las hojas banderas y las hojas bajas en cuanto al color y forma (**Figura 69**), solo 5 plantas presentaron amarillamiento en las hojas más viejas luego de la

inoculación y solo en 2 hojas se evidenció un daño necrótico con halo amarillento a las 48 h ddi, el cual no tuvo avance.

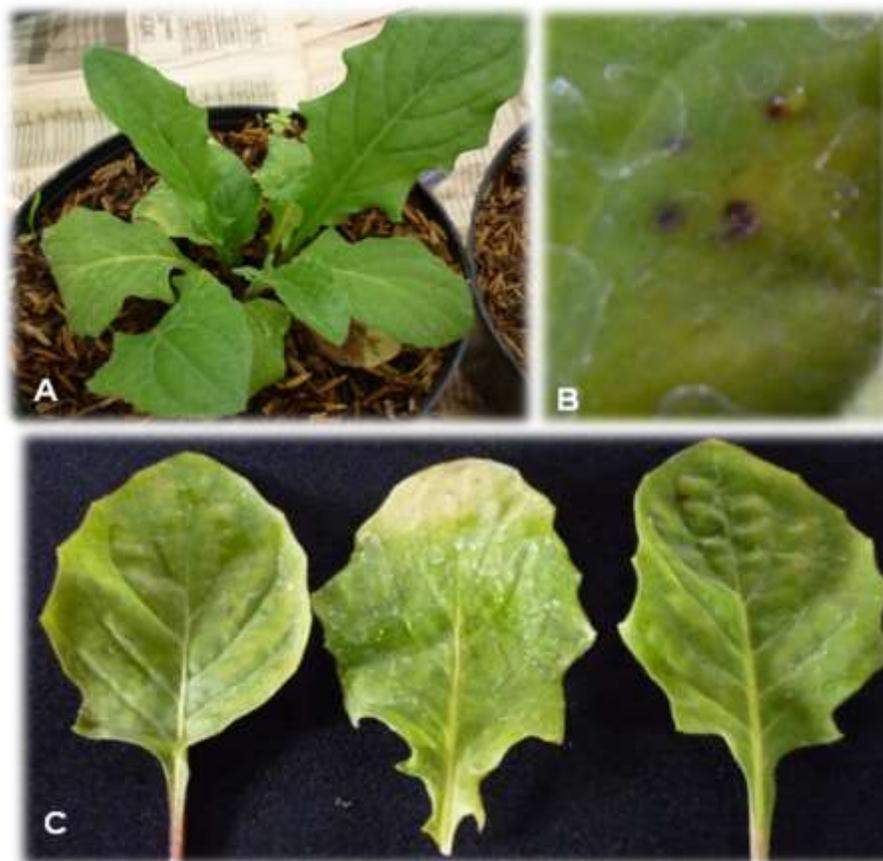


Figura 69. Control de Bot 05 con Ácido Fosóroso + Mezcla de *Trichoderma* (Agrifos 7 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas bajas

⇒ **T10 (Bd 8 + TPA):** El 60 % de las plantas presentaron síntomas de marchitez, en el otro 40 % solo llegaron a formar 2 hojas banderas y estas se estaban amarillentas, también se encontraron varias hojas con el borde necrosado (**Figura 70**). Las manchas necróticas se evidenciaron a las 48 h después de la inoculación, estas se formaron en el borde de las hojas y cerca de este, a las 96 h se observó la formación de un borde púrpura, disminuyendo el halo clorótico. Las manchas formadas en el borde presentaron

el signo del patógeno a partir del 6^{to} ddi, demostrando de esta manera que este tratamiento no es lo suficientemente efectivo en el control de la enfermedad. En este caso, al igual que los anteriores presentó problemas de deshidratación de los tejidos, requiriendo riegos adicionales.



Figura 70. Control de Bot 05 con Quitosano + Mezcla de *Trichoderma* (Biorend 8 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas bajas

⇒ **T11 (Bd 10 + TPA):** Las plantas presentaron poco desarrollo, sin embargo se evidenció una diferencia entre color, tamaño y turgides entre las hojas viejas y las hojas banderas formadas después de la aplicación del tratamiento, sin embargo estas no obtuvieron características comerciales (**Figura 71**). Después de la inoculación, se presentaron los primeros síntomas a las 48 h,

con manchas necróticas sin formación de halo. Estas manchas presentaron avance hasta las 96 h, posteriormente tomaron aspecto acuoso. Este tratamiento al igual que los anteriores presentó problemas de deshidratación de los tejidos, requiriendo riegos adicionales.

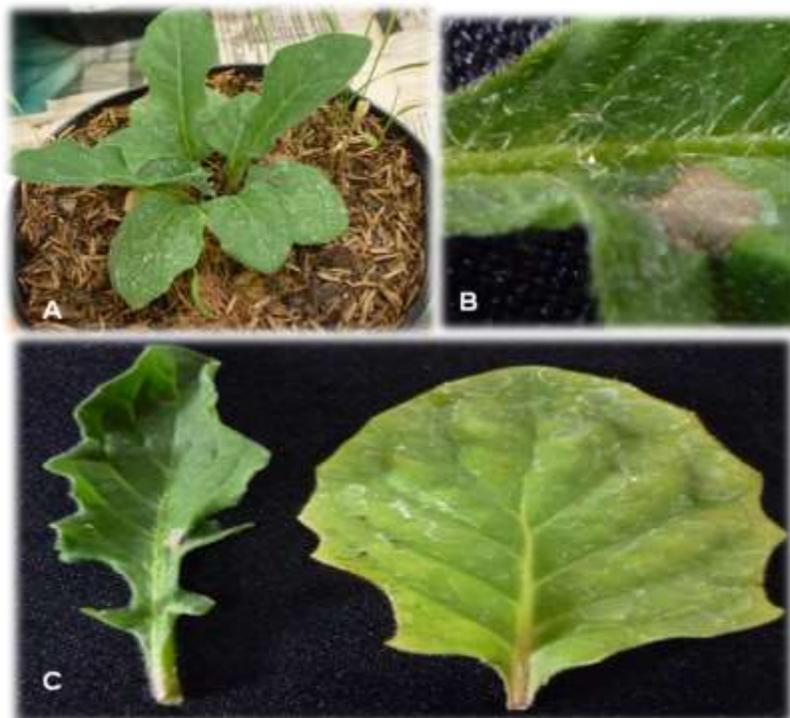


Figura 71. Control de Bot 05 con Quitosano + Mezcla de *Trichoderma* (Biorend 10 ml/l + Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas afectadas

⇒ **T12 (TPA)**: Las plantas no presentaron características comerciales óptimas, sin embargo se puede evidenciar la diferencia entre las hojas banderas y las hojas viejas de la planta, en las cuales se manifestaron los síntomas de la enfermedad, con el cambio del ángulo de inserción, necrosamiento en el pecíolo (**Figura 72**). Las manchas foliares se evidenciaron a las 24 h ddi, con puntos cloróticos en diferentes partes de la lamina foliar. A las 72 h ya se evidenciaba el daño necrótico y su avance fue hasta las 96 h, posteriormente se momificaron, paralizando de esta manera su avance.

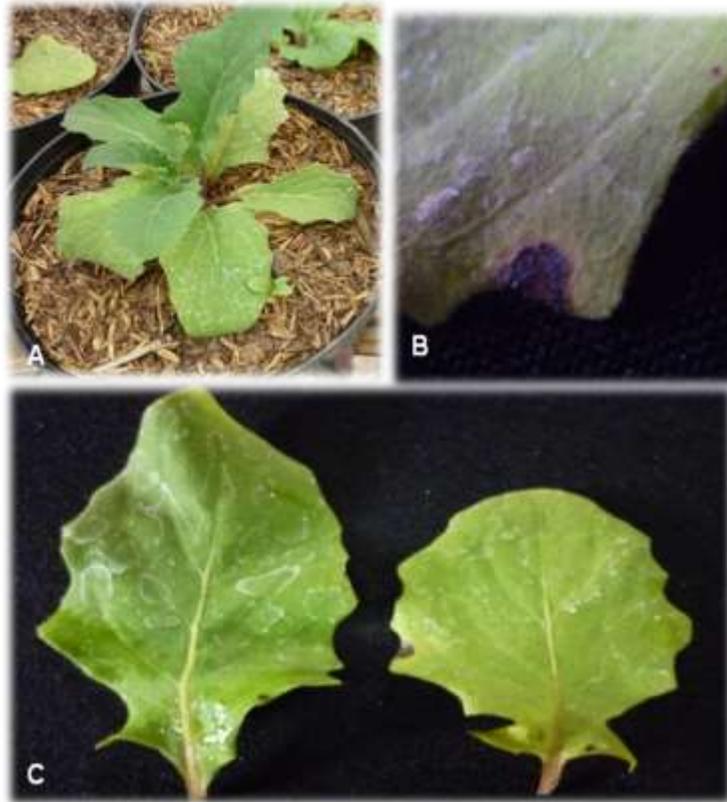


Figura 72. Control de Bot 05 con Mezcla de *Trichoderma* (Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas afectadas

⇒ **T13 (Qs 3 + TPA):** Las plantas se mantuvieron pequeñas y no presentan características comerciales, en algunos casos se observó un aspecto de marchitez. Las hojas banderas no presentaron un crecimiento, pero si se evidenció fácilmente la presencia de los tricomas (**Figura 73**). Las manchas foliares solo se observaron en las hojas bajas, las cuales comenzaron con gran agresividad a las 24 h con una mancha necrótica en el limbo foliar. A las 72 h después de la inoculación se formó un borde y hundimiento de los tejidos afectados, sin formación de halo y desde ese momento se detuvo el crecimiento de la enfermedad.

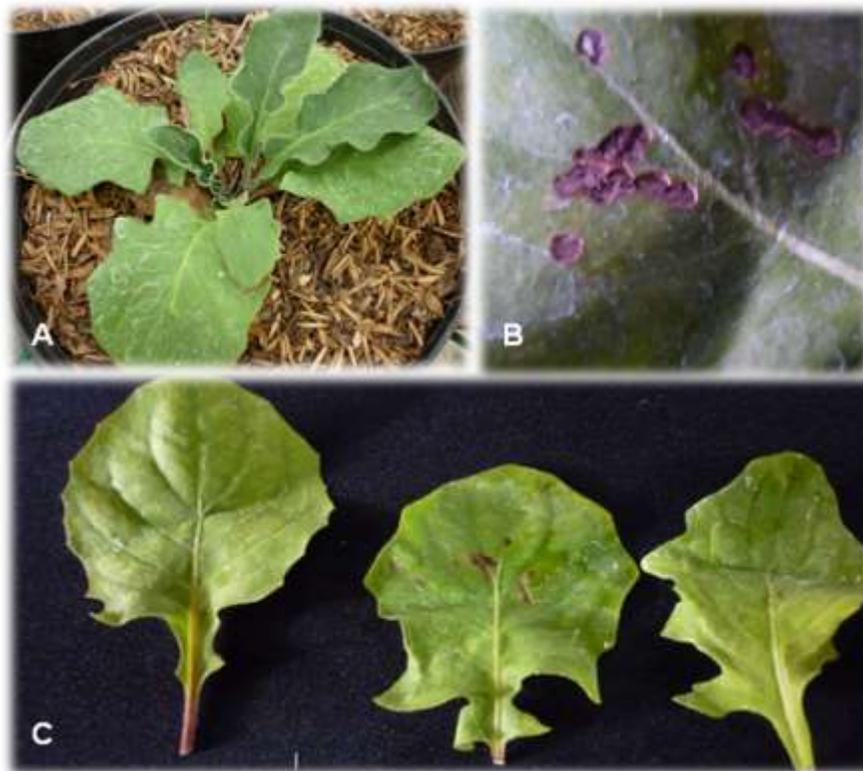


Figura 73. Control de Bot 05 con Silicio + Mezcla de *Trichoderma* (Quick sol 3 ml/l +Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas afectadas

⇒ **T14 (Qs 5 + TPA):** Las plantas presentaron un buen desarrollo y características comerciales óptimas, solo en 1 planta se evidenciaron diferencias entre las hojas bajas y las banderas (**Figura 74**). Se pudo ver fácilmente el desarrollo de los tricomas; las manchas foliares se observaron en distintas partes de la lamina foliar, con puntos necróticos a las 24 h ddi, pero al igual que el tratamiento anterior a las 72 h se formó un borde y hundimiento del tejido afectado y se detuvo el avance de la enfermedad. Estas manchas son casi imperceptibles; haciendo de este tratamiento uno de los mejores para el control de la enfermedad.



Figura 74. Control de Bot 05 con Silicio + Mezcla de *Trichoderma* (Quick sol 5 ml/l +Trico Plus A). A: Plantas de gerbera culminado el ensayo; B: Detalle de las manchas; C: Vista de hojas afectadas

⇒ **T15 (ADE - Testigo):** las plantas presentaron síntomas evidentes de marchitez, necrosis en la base del pecíolo, cambio en el ángulo de inserción de las hojas, doblamiento del limbo foliar y el aroma característico de la enfermedad. Las manchas foliares se comenzaron a formar a partir de las 24 h ddi, siendo los bordes donde se manifestó en un 80 %, estas avanzaron en el transcurso de los días hasta abarcar más del 50 % de la hoja (**Figura 75**). En algunos casos se presentó el fuerte halo amarillo claro y en otras un borde púrpura. Al colocar estas hojas en cámara húmeda se manifestó el signo de la enfermedad, demostrando de esta manera que el patógeno fue capaz de afectar a las plantas en el lugar donde montó el ensayo y bajo las condiciones que se le dieron al cultivo.



Figura 75. Testigo del ensayo de Control *In vivo* de Bot 05. A -B: Plantas de gerbera culminado el ensayo; C: Vista de hojas afectadas

Al realizar el análisis de los tratamientos que sólo eran de *Trichodermas*; encontramos que estos no fueron tan eficientes como se esperaba. Sin embargo estos resultados concuerdan con los obtenidos por Garcés, (1997) quien obtuvo como resultado que las pruebas de antagonismo sobre flores de rosas con *T. hamatum* y *B. subtilis*, no fueron efectivos en ninguno de los tratamientos utilizados. Lisboa, (2003) el cual encontró que la cepa de *Trichoderma harzianum* sólo fue capaz de reducir significativamente la incidencia de *B. cinerea* en racimos de uva, cuando fue aplicada en floración y apriete, demostrando que esta cepa era efectiva solo en determinados momentos del manejo agronómico del cultivo. Cuando se ha trabajado con otros microorganismos en el control de la enfermedad esta el trabajo realizado por Herrera y Naranjo, (2007), los cuales no encontraron diferencias

significativas entre los tratamientos de *Polyversum* y *Pseudomonas fluorescens* utilizados en como inductores de resistencia en el control de *Mycosphaerella fijiesis*, pero *P. Fluorescens* promovió un mayor vigor en las plantas según el grosor del pseudotallo, área foliar y biomasa foliar.

En el trabajo realizado por Navazio *et al.*, (2007), mencionan que la presencia de exudados de muchas clases de *Trichoderma*, presentan componentes químicos que potencialmente pueden actuar como elicitores y de esta manera se explica la capacidad de este hongo para activar la resistencia sistémica inducida (ISR) en cualquier especie vegetal. También señalan que la concentración de Ca^{2+} presente en la planta trabaja como un transductor de señales en la interacción planta-patógeno, donde el calcio inicia una cadena de reacciones en cascada activando la respuesta de defensa de las plantas. A pesar de que la mayor absorción de calcio se obtuvo en determinados tratamientos, estos se mantuvieron bajo los parámetros requeridos por la planta y solo en Qs 5 + TPA, fue donde hubo mayor evidencia de la defensa de la planta ante el ataque de *Botrytis cinerea*.

Los aislados de *T. harzianum* han sido previamente demostrado que reducen la actividad de las enzimas hidrolíticas producidos por *B. cinerea*; por otra parte, *Trichoderma* presentan actividad enzimática libera gradualmente oligosacáridos de la pared celular *Botrytis*, que se acumulan en el medio de cultivo (Navazio *et al.*, 2007). Sin embargo por los resultados obtenido por otros autores han encontrado que existen otras especies de *Trichoderma*, tales como *hamatum* y *viridae*, los cuales han sido efectivos en el control de *B. cinerea*, lo cual nos indica que la utilización de mezclas comerciales de especies de *Trichoderma* o de cepas nativas del hongo provenientes de las unidades de producción donde se obtuvo la cepa del patógeno.

La utilización de mezclas de *Trichoderma* (TPA), y la combinación con los otros inductores sobre todo con silicio fueron los más efectivos en el control de la enfermedad, posiblemente por la producción de metabolitos por parte de las cepas de *Trichoderma*, lo cual debe ser estudiado en un futuro (**Anexos 14; 15; 16**), y en combinación con el calcio se emite una señal a la planta, la cual es capaz en 5 a 10 minutos de enviar una respuesta a nivel celular de la infección del patógeno y de esta manera iniciar las respuestas fisiológicas como la muerte programada de células para detener el avance de la enfermedad (Navazio *et al.*, 2007).

En el trabajo realizado por Delgado *et al.*, (2006), quienes efectuaron aplicaciones foliares de calcio y silicio en la incidencia de mildiú en lechuga y en la evaluación del porcentaje de área foliar infectada donde el metasilicato de sodio a 4 mg/l, presentaron menor porcentaje de área foliar infectada, en comparación con la alta dosis de nitrato de calcio el cual no presentó disminución en el porcentaje del área foliar infectada. Sin embargo la concentración del silicio en el tejido vegetal fue muy baja lo que potencialmente no ayudó a favorecer la silificación de la pared celular y por lo tanto la resistencia mecánica de la lechuga al ataque del mildiú. El estudio reciente efectuado por Frantz y Locke, (2011), señalan varios beneficios en la incorporación del silicio en cultivos ornamentales como gerberas, rosas, áster, impatiens, zinnias, girasol, poinsettias y orquídeas; siendo uno de los más destacados la baja incidencia del mildiú polvoriento con aplicaciones de silicato de potasio a 30 y 60 ppm observándose que se activaron las defensas de las plantas, existiendo una supresión del patógeno con el estímulo de barreras físicas con silicio.

En cuanto al quitosano queda demostrado que la dosis más adecuada es la 10 ml/l con la mezcla de *Trichodermas*, a pesar de presentar manchas foliares de

considerable tamaño, las cuales pueden servir de foco de diseminación de la enfermedad. En este tratamiento se esperaba que se evidenciaran fácilmente barreras que impidieran el avance de la enfermedad a las 48 horas; pero Bautista *et al.*, 2006, reportan una lignificación moderada en las paredes celulares de tomate a las 48 y 72 h después de la inoculación con *B. Cinerea*.

Los reportes de algunos trabajos en cuanto a los fosfitos, los señalan el uso como alternativas externas en el manejo preventivo de enfermedades, siendo el fosetil-Al como el ácido fósfórico fungicidas capaces de estimular la formación de las fitoalexinas que al entrar en el tejido de la planta es reconocido como metabolitos del hongo invasor, siendo estos del grupo de los Oomicetos. Así cuando el ácido fosforoso es absorbido por el hongo, produce un efecto primario interfiriendo con la estructura y la función de la membrana del hongo evitando el avance de la enfermedad (HORTITEC, 2011). En los ensayos efectuados por COLINAGRO, (2007) reportan el fosfito como potencia el sistema natural de defensa de la planta, tiene acción antifúngica sobre hongos del genero *Peronosporales* y poder preventivo-curativo perturbando el metabolismo de los hongos mediante la acumulación masiva de polifosfatos y pirofosfatos.

Gómez y Reis, (2011), Mencionan a los fosfitos de potasio o de calcio como controladores de *Pseudoperonospora*, *Phytophthora*, *Albugo*, *Peronospora*, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia* y *Colletotrichum*, mientras que al Fosetil Al y Acibenzolar s-metilico como controlador de *Botrytis spp.*, al quitosano controlando a *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Pyricularia grisea*, *Fusarium verticillioides* y *Sarocladium oryzae*; en cuanto a los silicatos y silicio controlando *Fusarium oxysporum* y *Cercospora coffeicola*. También señalan que los fosfitos registrados como fungicidas en el mundo son para el control de Oomycetes, sin embargo el efecto primario de los fosfitos sobre los patógenos no está bien determinado, su acción como fungicida se

basa en su influencia en la fosforilación enzimática y en el metabolismo del fósforo en general. Por esto es considerado hasta el momento como el mejor promotor de fitoalexinas, tóxicas para los patógenos y su uso es principalmente para los cultivos de papa, cítricos, cerezos, durazno, uval, peral, tomate y coliflor.

Por los resultados obtenidos en este ensayo queda demostrada la capacidad de los inductores de resistencia en el control de *Botrytis cinerea* aislada de gerbera (*Gerbera jamesonii*) y su rentabilidad en cuanto a la calidad de las plantas una vez aplicado los tratamientos; sin embargo se debe considerar la ejecución de estudios posteriores en cuanto al comportamiento anatómico de las células de las hojas o flores con los tratamientos de silicio y ácido fosforoso con la mezcla de *Trichodermas*; y se debe incluir una cepa de *T. viridae* o *T. hamatum*; de igual manera conocer cual o cuales tipos y cantidad de fitoalexinas que intervienen en este proceso y la gran necesidad de repetir este ensayo en plantas de corte con el fin de evaluar los parámetros agronómicos tales como diámetro de la flor, alto del tallo, tipo de respuesta de las plantas o flores al ataque del patógeno y evaluar la rentabilidad del o los tratamientos.

También es importante señalar, la necesidad de efectuar otros ensayos de control, pero en esta oportunidad utilizando las curvas progresiva de la enfermedad como patrón de evaluación y comparar con los distintos métodos de control (químico y con la utilización de inductores de resistencia) bajo el esquema de Van Der Planck (1963), y a su vez realizar el monitoreo de dispersión de la enfermedad dentro del invernadero, establecido por Kerssies, (1993) en flores de gerbera.

CONCLUSIONES

Al finalizar el estudio del *Botrytis cinerea* en gerbera (*Gerbera jamesonii*), se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- * La metodología empleada en el muestreo, proporciono suficiente información para el estudio epidemiológico en los estados Aragua y Miranda.
- * Se pudo identificar diferentes síntomas de la enfermedad de la enfermedad presentes en flores; manchas foliares y marchitez o podredumbre de la planta.
- * Las cepas obtenidas presentaron diferentes características morfológicas en cuanto al micelio; conidióforo; conidias y germinación de los conidióforos en el tejido.
- * El patógeno encontrado corresponde a *Botrytis cinerea* Pers; el cual se demostró que es el causante de la enfermedad en el cultivo, lo cual se corroboró mediante las pruebas de patogenicidad.
- * La inoculación foliar es la metodología más apropiada, para la obtención de síntomas similares a los obtenidos en campo.
- * Existe diversidad en el comportamiento de las distintas cepas estudiadas en cuanto a su desarrollo en condiciones de laboratorio; patogenicidad y sensibilidad a los fungicidas seleccionados. Pero deben efectuarse pruebas moleculares para determinar el Grupo al cual pertenecen.
- * La cepa Bot 05 resultó ser la más agresiva con necrosamiento de tejido y signo del patógeno a las 72 h después de la inoculación, mientras que la cepa Bot 03 fue la menos virulenta.

- * Todas las cepas presentaron poca sensibilidad a Azoxystrobin, mientras que en el caso de los otros fungicidas hubo sensibilidad dependiendo del origen de la cepa.
- * En el control *In vitro* los mejores tratamientos fueron Tricobiol (Tr) 40,74 %; Agrifos 3 ml/l + Trico Plus A (Ag 3 + TPA) 39,72 % y Quick sol a 3 ml/l + Tricobiol (Qs3 + Tr) 39,17 del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC).
- * En el control *In vivo* el mejor tratamiento fue Quick sol 5 ml/l + Trico Plus A (Qs5 + TPA), con inhibición del avance de la enfermedad; mayor número de hojas banderas y largo de las hojas después de la primera aplicación.

RECOMENDACIONES

Al culminar esta investigación, y por los resultados obtenidos se pueden hacer las siguientes recomendaciones para estudios posteriores:

- * Efectuar muestreos en los estados Aragua; Mérida; Miranda; Táchira; Trujillo y Vargas, considerando todos aquellos cultivos afectados por el patógeno con el fin de establecer los parámetros epidemiológicos en función de un manejo integrado de la enfermedad.
- * Efectuar las curvas de progreso de la enfermedad para cada zona del país.
- * Hacer un estudio comparativo entre la metodología utilizada en este trabajo y la de Gepp *et al.*, 2012, en el procesamiento de las muestras obtenidas en campo.
- * Efectuar el estudio molecular para determinar la presencia de poblaciones de *B. cinerea* o *Botrytis pseudocinerea*.
- * Efectuar un estudio sobre los esclerocios en cuanto forma; tamaño y su papel en el ciclo de la enfermedad, bajo las distintas condiciones ambientales y manejos agronómicos.
- * Efectuar estudios anatómicos para determinar el daño en los tejidos causados por el hongo en los diferentes órganos de la planta.
- * Efectuar ensayos de sensibilidad utilizando una mayor gama de fungicidas de uso común en las unidades de producción de hortalizas y ornamentales.
- * Realizar las pruebas de resistencia y determinar que tipos existen según los fungicidas evaluados.

- * Realizar un estudio económico con el fin de determinar cuál de los tratamientos del control *In vivo*, es el más rentable y adaptable a los sistemas de producción.
- * Realizar un estudio anatómico y enzimático de las plantas ante el ataque del patógeno.
- * Realizar un ensayo *In vivo*, en flores de corte con la enfermedad y los tratamientos utilizados, y evaluar parámetros agronómicos bajo ese sistema, con el fin de determinar cuales son las mejores alternativas de control.

BIBLIOGRAFÍA

- ACEVEDO, R. y MORENO, B.** 2001. **Repercusión de los problemas fitosanitarios en la producción de flores de clavel y pompón, en el estado Táchira – Venezuela.** XVII Congreso de Fitopatología. Maracay 14-16 noviembre.
- AGRIOS, G.** 1997. **Fitopatología.** Editorial Limusa, S. A. UTEHA. México. 2^{da}. Edición. 838 p.
- ALBINO, R.; ZAVALA, H.; RUIZ, L.; SANDOVAL, M. y CASTILLO, A.** 2003. **El Ca²⁺ en la calidad, producción y senescencia de dos variedades de gerbera (*Gerbera jamesonii*) en cultivos hidropónicos.** [On line]. http://www.colpos.mx/IRENAT/bot/bot_resumen.htm.
- ALVAREZ, R.** 1995. **Marchitez, pudrición y necrosis de raíces en cala (*Anthurium andreanum*) causado por *Fusarium solani*.** Memorias de la Cátedra de Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.
- ALVAREZ, R.; CABRERA, M. y SOSA, N.** 2003. **Patógeno de *Lillium spp.* En cultivos de corrientes, Argentina.** Cátedra de fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE.
- ANZOLA, L.** 2009. **Índice Agropecuario.** 34^{ed}. A: 85 - A:208
- ARCO, M.** 2011. **Obtención y evaluación de cepas nativas de *Trichoderma spp.* en el biocontrol de *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosas.** Tesis de grado para optar al Título de Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí - Ecuador. 147 p.

- ASCOFLORES, 2003. Utilización de Bioinsumos en Colombia, Estudio de Caso en flores de corte.** Rev. Acopaflor -ISBN 33-6215-8. 60 p.
- ASOFLORMI. 2009. Informe Técnico- Productivo entregado al Ministerio de Agricultura y Tierra de la Republica Bolivariana de Venezuela.**
- BAÑÓN S.; CIFUENTES, D.; FERNANDEZ, I.; GONZALEZ, A. 1.993. Gerbera, Liliun, Tulipan y Rosas.** 1^{era}ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 14-69 p.
- BASSO, C. 1988. Necrosamiento basal en estacas de rosa (*Rosa indica*).** Memorias de la Cátedra de Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.
- BAUTISTA, S. y BRAVO L. 2004. Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento.** Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 6:63-67.
- BAUTISTA, S.; HERNÁNDEZ, A.; VELÁZQUEZ, M.; HERNÁNDEZ, M.; AIT, E.; BOSQUEZ, E. and WILSON, C. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities.** Crop Protetion 25(2006): 108-118.
- BENITO, E.; ARRANZ, M. y ESLAVA, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*.** Rev. Iberoamericana de Micología. Nº 17: S43-S46.
- BERNAL, J. y BALLEEN, M. 2007. Fosfitos en nutrición vegetal.** Revista Acopaflor. Proflora 2007. ISSN 1909-8952. p: 38-42.
- BERNAL, J. 2008. Funciones del Silicio en las plantas.** Revista Acopaflor. San Valentin-Agrotec 2008. p: 56-60.

- BIOCONTROL.** 2004. La agricultura biológica colombiana. [on line]. <http://www.controlbiologico.com>
- BIGRE, J.; MORAND, J. y THARAUD, M.** 1990. **Patología de los cultivos florales y ornamentales.** 1^{era} ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 32-33 p.
- BOMBELLI, E. y WRIGHT, E.** 2006. **Efecto del bicarbonato de potasio sobre la calidad del tomate y acción sobre *Botrytis cinerea* en poscosecha.** [on line]. http://www.inia.cl/at/espanol/_v59n1/art1_e_1_1999.htm. Ciencia e investigación agraria. Vol 33 nº 3 177-270 p sep- dic 2006.
- BRITO, P.** 2001. **Guías de comercialización y producción de flores de corte en Venezuela.** Material de apoyo de la cátedra de Floricultura. U.C.V. Maracay.
- BUCHANAN, B; W. GRUISSEM; R. JONES.** 2000. **Biochemistry and molecular biology of plants.** American society of plant physiologists. Rockville, Maryland. 1367 pp.
- CABRERA, M; ALVAREZ, R. y SOSA, A.** 2003. **Hongos detectados en el filoplano de *Gerbera sp.* en Corrientes, Argentina.** Comunicaciones Científicas y tecnológicas 2003. Universidad Nacional del Nordeste. Resumen A-020.
- CALDERON Y RESTREPO,** 2001. **El cultivo hidropónico de flores en Colombia, Ecuador y Holanda.** [on line]. http://www.drcalderonlabs.com/Hidroponicos/Hidroponia_Colombia_EcuadorHolanda.htm
- CARRERO, C.; CEDEÑO, L.; QUINTERO, K.; PINO, H. y RODRÍGUEZ, L.** 2003. **Identificación y sensibilidad *In Vitro* a fungicidas del agente causal de la podredumbre del tallo en plántulas de**

- Eucalytus cinerea* en Mérida, Venezuela.** Interciencia. Nov 2003, Vol.28 N° 11. p: 656-659.
- CASTAÑO, J. y LOPEZ, N.** 2011. **Manejo Integrado del Mideú Velloso: Para reducir contaminación ambiental y mejorar rentabilidad en cultivos de rosas.** Rev. Acopaflor ISSN 1909-8952: 42-57 p.
- CASTAÑO, J.; GUTIÉRREZ, B. y POSADA, L.** 2007. **Efecto inhibitorio *In vitro* de lixiviados del raquis del plátano sobre *Botryotinia fuckeliana* de Bary (Whetzel), causante del moho gris en flores.** Revista Acopaflor. Proflora 2007. ISSN 1909-8952. p: 49-55.
- CHIOU, L. and WU, W.** 2001. **Isolation, identification and evaluation of bacterial antagonists against *Botrytis elliptica* on Lily.** Phytopatology 149: 319-324.
- CEDEÑO, L. CARRERO, C. and QUINTERO, K.** 2003. ***Botrytis porri*, causante de pudrición en el cuello del ajo en Mérida, Venezuela.** INCI, vol.28, no.5, p.273-277. ISSN 0378-1844.
- CEDEÑO, L.; DOMÍNGUEZ, I.; FERMÍN, G.; PINO, H.; QUINTERO, K. and BRICEÑO, A.** 2007. **First report of *Botrytis fabae* on broad vean in Mérida state, Venezuela.** Fitopatología Venezolana. 20:31-32
- CENTENO, G. Y OJEDA, A.** 1998. **La pudrición del aster causada por *Rhizoctonia sp.***Memorias de la Cátedra de Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.
- COLEY, S.; SMITS, J.; VERHOEFF, K. and JARVIS, W.** 1980.**The biology of *Botrytis*.** Academic Press. New York.
- COLINAGRO.** 2007. **Aliado para el manejo de enfermedades y la nutrición en los cultivos.** Rev. ACOPAFLOR ISSN 1909-8952: 107-108p.

- COLIAP.** 1989. **Informe de suelos, plantas y aguas de los principales cultivos en Colombia.**
- DAAYF, F.; SCHMITT, A. y BELANGER, R.** 1998. **Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *reynoutria sachalensis*.** *Plant Physiology* 113: 719-727.
- DAUGHTREY, M.** 2011. **Gerbera Diseases.** Manual Sakata. Gerbera. Section 7. p: 16-18.
- DELGADO, I.; SANDOVAL, M.; RODRIGUEZ, M. Y CARDENAS, E.** 2006. **Aplicaciones foliares de calcio y silicio en la incidencia de mildiú en lechuga.** [On line]. [Http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?!Cve=57311494011](http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?!Cve=57311494011). *Rev. Terra Latinoamericana*. 24(1): 91-98.
- DÍAZ, D. y LONGA, S.** 2006. **Bromelias afectadas por *Dreslsera sp.*** Memorias de la Cátedra de Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.
- DÍAZ, N.; BARRERA, M. and GARCÉS, E.** 1999. **Controlling *Botrytis cinerea* Pers. in statice (*Limonium sinuatum* Mill.) "Mindnight blue" cultivar.** *Acta Hort.* 482: 235-238.
- DI PRIETO.** 2012. **Identifican los hongos más dañinos del mundo.** Nota de ciencia. Periodico El Nacional. Cuerpo Ciudadanos. 21/10/2012. p 6.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; and BENHAMOU, N.** 2004. **Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit.** *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44:417-432.

- ELLIS, M.** 1971. **Dematiaceous Hyphomycetes.** Commonwealth Mycological Institute. England. p: 178-183.
- ESCALONA, F., MACIEL, N. y RENAUD, J.** 1992. **Un manchado de las inflorescencias de heliconias.** Fitopatología Venezolana. Vol. 5, Nº 2, 30-32.
- ESTERIO, M.; AUGER, J.; DROGUETT, A. y ARROYO, A.** 1996. **Efectividad de programas biológicos, orgánico natural, tradicional e integrado de control de *Botrytis cinerea* Pers. En uva de mesa cv. Thompson seedless en el valle central de Chile.** Revista Fitopatología. Vol. 31(1):43
- FRANTZ, J. Y LOCKE, J.** 2011. **Ready Research Results: Silicon in floriculture fertility programs.** Greenhouse Grower. 29(2): 26-27
- FERREIRA I. y SANABRIA N.** 1991. **La marchitez del minigladiolo por *Fusarium sp.*** Fitopatología Venezolana Vol 4 Nº2 61-62.
- FIALLOS, H.** 2012. **Inhibición de *Botrytis cinerea* en rosas a base de extractos alcohólicos y acuoso de hierba mora (*Solanum nigrum*).** Tesis de Pre Grado. Universidad Nacional de Ecuador. Facultad de Agronomía. [on line]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/1828>.
- FLORIST.** 1999. **Gerbera.** [on line].http://www.gerberacom/gerbera_in_soil.html.6 p.
- FLORALEX CONTINENTAL C. A.** 2002. **Registro de ventas promedios.**
- FLORVERDE.** 2011. **Defensa del ambiente.** Rev. Agricultura de las Américas. N 416: 30-33 p.
- FOURNIER, E.; LÉVIS, C.; FORTINI, D.; GIRAUD, T.; LEROUX, P. y BRYGOO, Y.** 2003. **Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea***

- homolog of the *Neurospora crassa* *het-c* vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker.**
Mycologia 95: 951–961.
- FOURNIER, E.; GIRAUD, T. y BRYGOO, Y.** 2005. **Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies.**
Mycologia 97: 1251–1267.
- FRENCH, E. y HEBERT, T.** 1980. **Métodos de Investigación Fitopatológica.** 1^{era} ed. Editorial IICA. Costa Rica. 289 p.
- GARCÍA, J. Y GIRALDO, I.** 2009. **Calcio: Elemento básico para la correcta Fertilización de los cultivos, el calcio es fundamental para mayor productividad en flores, frutos, tallos y tubérculos.**
Rev. Acoplaflor ISSN 1909-8952: 118-119 p.
- GARCÉS, E. y OROZCO, M.** 2007. **Cómo evitar la propagación de enfermedades en los invernaderos. Tecnología Amigable.** *Revista Agricultura de las Américas.* Edición 368. p: 18-24.
- GARCÉS, EMIRA.** 1997. **Algunos aspectos de la biología y control del hongo patógeno *Botrytis cinerea* "Moho gris" de las flores.**
Trabajo de Ascenso a Titular en la Universidad Nacional de Colombia. 82p.
- GEPP, V.; VERO, S.; CASSANELLO, M.; ROMERO, G.; SILVERA, E.; GONZÁLEZ, P.; REBELLATO, J.; FERREIRA, Y. y BETANCUR, O.** 2012. **Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay.**
Agrociencia Uruguay. Vol 16 N° 1. 16-22.
- GOMEZ, D. Y REIS, E.** 2011. **Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos.** [On line] www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar. *Rev. QuimicaViva* 10(1):1-17.

- HERNÁNDEZ, A.; BAUTISTA, S.; VELÁZQUEZ, M.; RODRÍGUEZ, S.; CORONA, M.; SOLANO, A. y BOSQUEZ, E.** 2005. **Potencial del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha.** Revista Mexicana de Fitopatología, Vol 23, N° 002. p: 198.205.
- HERNÁNDEZ, T.** 2005. **Epidemiología. Fundamentos de Análisis y manejo sistémico de epidemias de cultivos tropicales.** Instituto de Asesorías y Capacitación para el desarrollo sostenible. Perú.
- HERRERA, J. Y NARANJO, M.** 2007. **Evaluación del efecto de dos inductores de resistencia sobre el desarrollo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y el crecimiento de plantas de banano (*Musa AAA*).** Tesis de Grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de EARTH. Guácimo, Costa Rica. 60 p.
- HILBER, U.; SCHWINN, F. and SCHÜEPP, H.** 1995. **Comparative reistence patterns of fluixonil and vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*.** Journal of Phytopathology 143: 423-428.
- HORST, L.; LOCKE, J.; KRAUSE, C.; MCMAHON, R.; MADDEN, L.; HOITINK, H.** 2005. **Supresión del destrozo de *Botrytis* de la begonia por el *Trichoderma hamatum* 382 encapsulado en turba y mezclas estiércol-enmiendadas.** Enfermedad de planta. 89:1195 - 1200.
- HORTITEC.** 2011. **Metabolismo secundario y manejo preventivo de enfermedades.** Acopaflor ISSN 1909-8952: 154-157 p.
- HURTADO, T.; SUBERO, L. y ALCANO, M.** 2.001. **Diagnóstico de enfermedades foliares en Gerbera.** Resúmenes del XVII Congreso de Fitopatología. Maracay 14-16 de Noviembre

- HURTADO, T. y SUBERO, L.** 2003. **Diagnóstico de dos enfermedades fungosas del suelo en gerbera (*Gerbera jamesonii*)**. Resumen de XVIII Congreso de Fitopatología. Maracay 14-17 de Noviembre.
- HURTADO, T.** 2004. **Diagnóstico y control *In vitro* y en umbráculo de la marchitez repentina en Gerbera (*Gerbera jamesonii*)**. Tesis de grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 82 p.
- HURTADO, T.; ARCIA, M. y BAUTISTA.** 2007. **Captura de aislamientos de *Trichoderma* a través de prácticas o técnicas de enriquecimiento**. Resúmenes del XX Congreso Venezolano de Fitopatología. San Felipe de noviembre.
- INFOAGRO.** 2001. **El cultivo de la Gerbera**. [on line]. http://www.infoagro.com/flores/docs/gerbera_3.asp. 2-4 p.
- INFOAGRO.** 2003. **Cultivo de Salvia (*Salvia officinalis* L, fam. Labiatae)**. [on line]. <http://www.infoagro.com>
- JALIL, C.; LATORRE, B. y APABLAZA G.** 1998. **Sensibilidad de *Botrytis cinerea* a Pirimetanil y pruebas de resistencia cruzada a Iprodione**. Revista Fitopatología. Vol. 33(3):141-144.
- JIMÉNEZ, M.** 2009. ***Trichoderma* spp. COMO INDUCTOR DE RESISTENCIA A MICRORGANISMOS FITOPATÓGENOS**. Resumen del XXI Congreso Venezolano de Fitopatología. Margarita 2-6 Noviembre.
- JASEN, R.** 2009. **Changing smell of plants announces pathogen attack**. [on line]. <http://www.wur.nl/UK/newsagenda/news/smell191009.htm>
- JASEN, R.** 2010. **Cambios en el olor de las plantas anuncian el ataque de hongos**. Rev. Flomarket-51-2010-39.

- KAMENIDOU, S.** 2009. **Soluble silicon-based disease management of floricultural crops.** Oklahoma State University. AAT 3358875; 100 p.
- KERSSIES, A.** 1993. **Influence of environmental conditions on dispersal of *Botrytis cinerea* conidia and on post-harvest infection of gerbera flowers grown under glass.** Plant Pathology. Vol. 42. p: 754-762.
- KIMURA, M. DE SOUSA, P. and DE CASTRO, H.** 2001. **Sensibilidad *In vitro* de *Botrytis cinerea* a fungicidas.** Cienc.agrotec, larvas. Vol 25. N° 5. 1150-1160.
- LATIEGUII, A.** 1990. ***Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Sclerotium rolfsii* Sacc., agente causal de pudrición baal de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.).** Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto. 61 p.
- LEROUX, P. et GREDET, M.** 1981. **Méthode de detection de la résistance de *Botrytis cinerea* Pers. Aux fongicides, a partir déchantillons prélevés dans le vignoble.** Phytatrie – Phytopharmacie. 30:57-68.
- LISBOA, M.** 2003. **Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de la pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en Vid *Vinifera*.** Tesis de grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía. Universidad de Talca – Chile. 49 p.
- MADRIZ, R., NOGUERA, R. Y SMITS, G.** 1991. **Principales hongos patógenos que afectan a *Strelitzia reginae*.** Fitopatología Venezolana Vol 4 N°2 60-61.
- MADRIZ, K.** 2002. **Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno.** Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) N° 63: 22-32.
- MARCANO, M.** 1980. **Estudio de una enfermedad fungosa presente en dos patrones de rosa (*indica* y *multiflora*) del Departamento de Agronomía de la UCV- Maracay.** Memorias de la Cátedra de

Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.

MARIN, A. 2002. **Patogenicidad de *Phytophthora sp.* en cala (*Anthurium andreanum*).** Memorias de la Cátedra de Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.

MELGAREJO, N.; RAPOSO, R.; GÓMEZ, V.; MOYANO, C.; URRUTIA, T.; SÁNCHEZ, H.; MARTÍNEZ, F. y LÓPEZ, O. 2007. **Control integrado de *Botrytis cinerea* en los cultivos protegidos de Almería.** [on line]. Conocimiento y tecnología al servicio del agricultor F.I.A.P.A. www.fiapa.es. 6p.

MEYER, D.; BIGIRIMANA, J.; ELAD, Y and HÖFTER, M. 1998. **Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*.** European journal of Plant Pathology. 104:279-286.

MEYER, U.; DEWEY, M. y ELAD, Y. 2007. **El papel DE L-RHAMNOSE producido por *Botrytis cinerea* en interacciones de planta-patógeno.** [On line]. <http://intranet.catie.ac.cr/intranet/noticias>.

MODINO, P. 2001. **Manejo de la resistencia a fungicidas.** Universidad de la República de Uruguay. Facultad de Agronomía. Departamento de Protección Vegetal. Cátedra de Fitopatología. Material de Apoyo Docente. 22 p.

MOLINA, G.; ZALDÚA, S.; GONZÁLEA, G. y SANFUENTES, E. 2006. **Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile.** Reviste Bosque 27(2): 126-134.

- MONTES, R.** 1992. **Identificación de Hongos Fitopatogenos.** 1^{era} ed. Editorial CIDIR_OAXACA. México. 10 p.
- MONTEALEGRE, J. y VÁSQUEZ, G.** 1996. **Resistencia a Benzimidazoles, Carboximidias y Dicarboximidias de cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de peras.** Revista Fitopatología. Vol. 31:59-64.
- MOORMAN, G.** 1999. **Gerbera Diseases.** Plant disease Facts. [on line]. <http://www.cas.psu.edu/docs/CASDEPT/PLANT/ext/gerbera.html>. 1p
- MORENO J.** 2003. **La pudrición de la corona de la gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) causada por *Phytophthora cryptogea* Pethybridge and Lafferty.** Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Postgrado en Agronomía. Fundamentos y Diagnóstico Fitopatológico. 25 p.
- MUÑOZ, J. y ESCALONA A.** 2005. **Nueva opción en el control de la mancha blanca (*Botrytis sp.*) y la pudrición basal o cachera (*Sclerotium cepivorum*) en ajo y cebolla con el fungicida Chacl 50 Wp (Procydone).** Revista Fitopatología Venezuela. Vol.18, N°2.56.
- NAVAZIO, L.; BALDAN, B.; MOSCATIELLO, R.; ZUPPINI, A.; WOO, S.; MARIANI, P. and LORITO, M.** 2007. **Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*.** [on line]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/7/41> Plant Biology 2007, 7:41
- OCAMPO, M.** 2001. **Gerbera.** Ediciones Hortitecnia Ltda. Bogota. Colombia. 1^{era} ed.48 p.
- O´NEILL, T. y MC QUICKEN, M.** 2005. **Evaluación de los fungicidas para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en cosechas ornamentales del invernadero.** [On line].

<http://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.plant.uga.edu/Extension/news/>

ORTEGA, S. y BAUTISTA S. 2007. **Extracto acuoso de brócoli y su evaluación fungicida en fresas durante el almacenamiento.**

Resumen del IX Congreso Internacional/ XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.; XIV Congreso de Asociación Latinoamericana de Fitopatología. Cancún, Quintana Roo, México

OSZKINIS, K. y LISIECKA, A. 1990. **Gerbera.** 1^{era} ed. Ediciones Edamex. México. 240 p.

PALMER, C.; HORST, R. and LANGHANS. 1997. **Use of bicarbonates to inhibit *In vitro* colony growth of *Botrytis cinerea*.** Plant Disease 81(12):1432-1438.

PATAKY, N. 1997. ***Botrytis* blight or gray mold of ornamental plants.** University of Illinois, Extension. Report on Plant Disease. N° 623.

PEREZ, H. 2004. **El marchitamiento vascular de la cala roja (*Anthurium andreaum*) var. Tropical causada por *Fusarium oxysporum*.** Memorias de la Cátedra de Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.

PONCE, I. 2002. **Evaluación *In vitro* e *In vivo* de la capacidad biocontroladora de tres cepas nativas de *Trichoderma spp.* contra *Botrytis cinerea* en frutilla.** Tesis para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. 33 p.

PULIDO, 2004. **Mancha foliar en Gerbera por *Cercospora sp.*** Memorias de la Cátedra de Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.

- RANGEL M.; FERREIRA, R.; RODRÍGUEZ, D. y SANABRIA, M.** 2005. **Inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* con extracto etanólico de cuatro plantas silvestres.** Revista Fitopatología Venezuela. Vol.18, N°2.56.
- RAPOSO, R; GÓMEZ, V.; MOYANO, C.; URRUTIA, T.; SÁNCHEZ, H.; MARTÍNEZ, F. y LÓPEZ, O.** 2008. **Control Integrado de *Botrytis cinerea* en los cultivos protegidos de Almería.** [on line]. http://intranet.catie.ac.cr/intranet/noticias/Semana_Cientifica2004/PDF/42.pdf
- RIVEROS, B.** 1998. **Sensibilidad a Dicarboximidias en poblaciones de *Botrytis cinerea* Obtenida en tres ciclos de cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo invernaderos.** Revista Fitopatología. Vol. 33(1):45
- RIVEROS, A.** 2001. **Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible.** Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) N° 61. p: 4-11
- ROGERS, M. y TJIA, B.** 1990. **Gerbera Production for cut flowers and pot plants.** 1^{era} ed. Volume 4. Growers Handbook series. Timber Press. Oregon. 40-45 p.
- ROJAS, V.; ULACIO, D.; SANABRIA, M. Y JIMÉNEZ, M.** 2009. **Efecto del calcio, *Trichoderma* y Brócoli en la pared y área celular del ajo para el control de la pudrición blanca.** Rev. Boletín del centro de investigaciones Biológicas. Vol. 43 (2): 183 - 195.
- RONDON, O.** 2001. **Alternativas agronómicas al manejo convencional de la producción de flores ornamentales (*Gerbera jamesonii* H. Bolus).** Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Escuela de postgrado de Agricultura y Agroforestería Orgánica. Costa Rica.

- SALINAS, J.; GLANDORF, D.; PICALET, F. and VERHOEFF, K.** 1989. **Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*.** Netherlands Journal of Plant Pathology. Vol 95: 51-64.
- SALINAS, J. y VERHOEFF, k.** 1995. Estudios microscópicos de la infección de las flores de gerbera por *Botrytis cinerea*. [on line]. [European Journal of Plant Pathology / European Foundation for Plant Pathology](#) [1995, 101 (4) :377-386].
- SANABRIA, NELLY.** 1988. **Hongos causantes de Mildiú Polvoriento en plantas ornamentales de la zona central de Venezuela.** Fitopatología venezolana Vol 1, Nº 2. 59-64.
- SANTAELLA, M. SANABRIA, N. Y ARCIA, M.** 1999. **Identificación del agente causal de la Pudrición del tallo en plantas de papagayo (*Euphorbia pulcherrima*).** Memorias de la Cátedra de Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.
- SEDDON, B.** 2007. ***Bacillus brevis (Brevibacillus brevis)* y control biológico del *Botrytis cinerea*.** [on line]. <http://intranet.catie.ac.cr/intranet/noticias>
- SMITH, I.; DUNEZ, J.; LELLOTT, R; PHILLIP, D.; y ARCHER, S.** 1992. **Manual de Enfermedades de las Plantas.** 1^{era}ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 247-248 p.
- STEHMAN, C. y DE WAARD, M.** 1996. **Sensitivity of population of *Botrytis cinerea* to Triazoles, Benomyl and Vinclozolin.** European Journal of Plant Pathology 101:171-180.
- SOSA, F.** 1992. ***Fusarium solani* causando necrosamiento basal en estacas de rosa (*Rosa manetti*).** Memorias de la Cátedra de

Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.

SORIANO, J. 1991. **Manual teórico-práctico del cultivador de flor cortada.** Ed. Veinte. Valencia, España. 22 p.

SOROA, M.; CORTÉS, S. y HERNÁNDEZ, A. 2003. **Estudio del efecto de la aplicación de biofertilizantes sobre algunas variables de crecimiento y rendimiento en *Gerbera jamesonii* cv. Bolus.** Cultivos Tropicales, Vol 24, N° 2, p:15-17.

STAATS, M.; VAN BAARLEN, P. y VAN KANJ, A. 2005. **Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity.** Mol Biol Evol 22: 333–346.

TALLY, A.; OOSTENDORP, M.; LAWTON, K.; STAUB, TH. y BASSI, B. 2000. **Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens and herbivores: biochemistry ecology and agriculture.** Agrawal, AA; Tuzun, S; Bent, E. Ed St. Paul, Minnesota, USA, APS Press. P 357-369.

ULACIO, D. 2011. **Curso de Epidemiología.** Memorias. Curso Pre Congreso SOVEFIT. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. Julio.

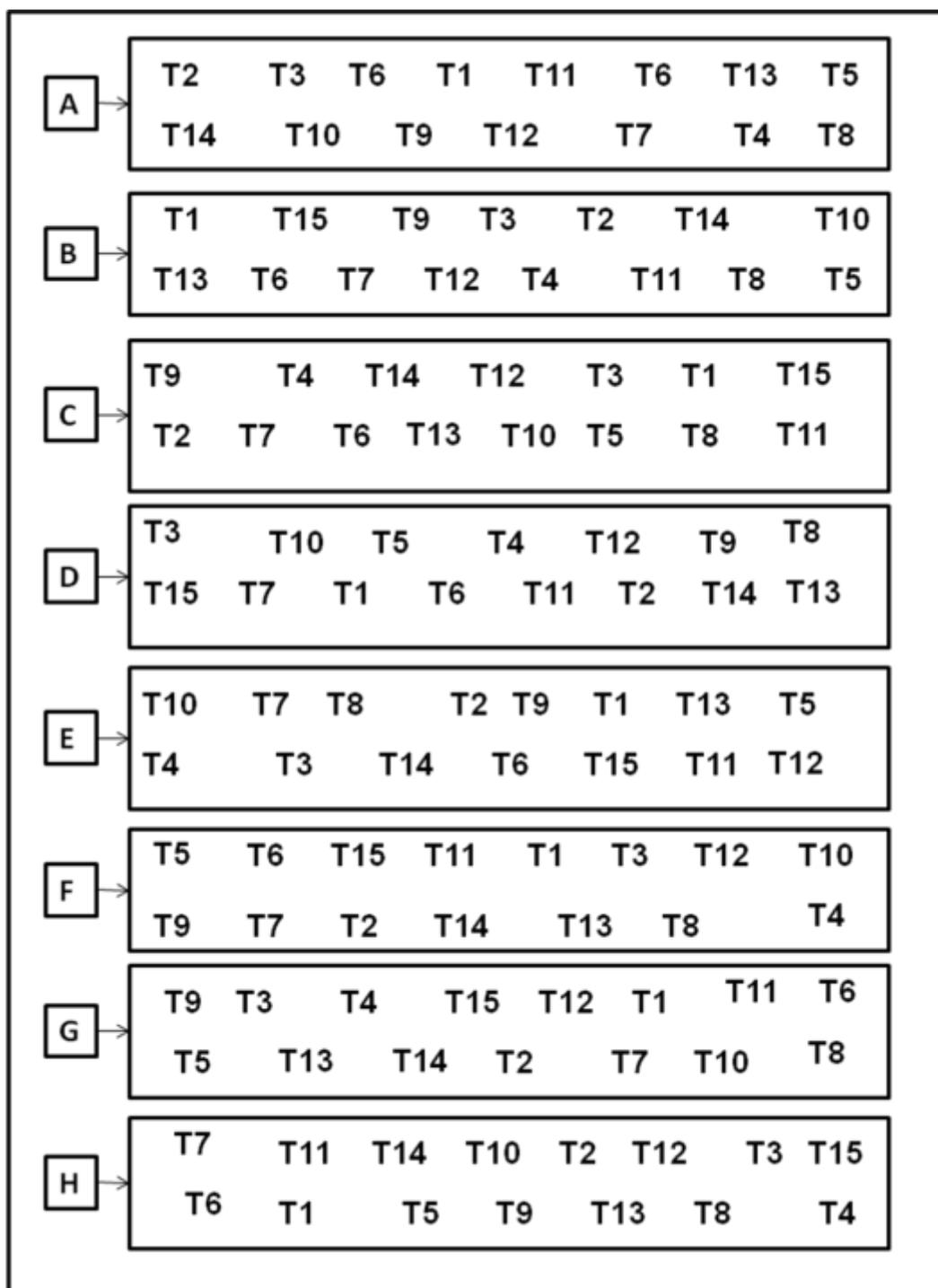
ULACIO, D.; PÉREZ, H. y JIMÉNEZ, M. 2013. **Concentración, dosis, momento y frecuencia de aplicación de *Trichoderma spp.* Estudio de casos.** Manejo integrado de las enfermedades de las plantas (Principios y aplicaciones).

VALAGRO ANDINA. 2008a. **Evaluación de activadores de defensa en rosa para el control de mildéu veloso (*Peronospora sparsa*).** Revista Acopaflor. San Valentin-Agrotec 2008. p: 78-80.

- VALAGRO ANDINA.** 2008b. **Defensa en cultivos de rosa: control de mildéu veloso (*Peronospora sparsa*).** Revista Acopaflor. Agroindustrial 2008. p: 106-108.
- VAN DER PLANCK, J. E.** 1963. **Epidemics and control.** Plant diseases. Academic Press, New York. 349 p.
- VARELA, J.** 1995. **Estudio de la roya blanca del crisantemo producida por *Puccinia horiana* P. Henn.** Memorias de la Cátedra de Fundamentos al Diagnóstico de Enfermedades de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía Postgrado de Agronomía. Protección vegetal.
- VARGAS, T., NOGERA, R. Y SMITS, G.** 1988. **Hongos patógenos en rosas sp.** Fitopatología Venezolana. Vol 1, Nº 1. 48p.
- VARGAS, T., NOGUERA, R. Y SMITS, G.** 1989. **Algunos hongos patógenos del rosal en a región central de Venezuela.** Fitopatología Venezolana. Vol. 2, Nº 1. 10-15.
- VÉLEZ, J.** 2008. **Resistencia a plagas y enfermedades en vegetales.** Revista Acopaflor. San Valentin-Agrotec 2008. p: 32-39.
- VIDALE, H.** 1992. **Producción de Flores y Plantas ornamentales.** 2^{da}ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 184-191 p.
- WILLIAMS-WOODWARD, Jean L.** 2007. **Destrozo de *Botrytis* del geranio.** [on line]. <http://www.plant.uga.edu/Extension/news/OrnTree/GerBotBt.html&sa>

ANEXOS

Anexo 1. Esquema de los tratamientos en el ensayo de control *In vivo* de Bot 05 con los inductores de resistencia.



Anexo 2. Muestreos realizados desde enero del 2008 hasta enero del 2011, para la obtención de las cepas de *Botrytis sp.*

Fechas de muestreo	Unidad de Producción	Localidad	Municipio	Estado	Cultivos
12/01/2008; 15/07/2008 27/01/2010	Súper Plántulas	Guayabita	Mariño	Aragua	Vincas; Gerbera de pote; Petunias
22/01/2008; 26/07/2008 22/01/2009; 20/05/2009 11/01/2010; 15/02/2010 15/03/2010; 26/04/2010 17/05/2010; 14/06/2010 12/07/2010; 16/08/2010 13/09/2010; 11/10/2010 15/11/2010; 13/12/2010 05/01/2011; 17/01/2011 28/01/2011	Finca Monverana	Vía Pozo de Rosas; sector La Navera	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera y Rosas de corte, Poinsettias
25/01/2008; 11/06/2008 13/11/2008	Flosven	Tasajera	Revenga	Aragua	Gerberas de corte y Rosas de pote
18/02/2008; 12/06/2008 13/11/2008	Agroflor	Tasajera	Revenga	Aragua	Gerbera de corte
20/02/2008; 05/06/2008 08/09/2008; 18/11/2008 21/01/2010	Vivero Tropi Rosas	San Pedro de los Altos Sector Manzanares	Guaicaipuro	Miranda	Gazanias; Rosas de pote; Begonias; Vincas
23/02/2008; 13/06/2008 14/11/2008; 23/06/2009	Finca La Boriza	Los Anaucos	Guaicaipuro	Miranda	Rosas de pote
26/02/2008; 21/04/2009 19/11/2009; 21/01/2010	Culflor	Carrizales	Carrizales	Miranda	Gerbera y Rosas de corte
01/03/2008; 06/09/2008 12/11/2008	Wanaby	Tasajera	Revenga	Aragua	Rosas de corte y de pote
04/06/2008; 21/01/2010 09/03/2010	Floricultura La Toma	Sector La Navera	Guaicaipuro	Miranda	Crisantemos; Girasol
04/06/2008; 21/01/2010 09/03/2010	Hacienda Fresca Flor	Sector La Navera	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera y Rosas de corte
01/08/2008; 13/02/2009 09/03/2010	Agrícola Doña Adela	Potrerito	San Antonio	Miranda	Gerbera y Rosas de corte; Tomate
21/11/2008; 28/01/2009 22/04/2009; 22/05/2009 23/10/2009	Inversiones Tiara Plants	Club de Campo	San Antonio de los Altos	Miranda	Poinsettias, Gerberas de pote
07/01/2009; 18/04/2009 06/06/2009; 24/10/2009	Capachalito	Capachal – Colonia Tovar	Tovar	Aragua	Fresas y Rosas de pote

23/01/2009; 03/07/2009 30/10/2009; 24/03/2010 06/07/2010	Vivero El Horticultor	Baruta	Baruta	Miranda	Poinsettias; Rosas de pote
05/02/2009; 06/05/2009 03/11/2009; 23/03/2010	Floricultura Minerva	San Pedro de los Altos; vía a Hidroponías Venezolanas	Guaicaipuro	Miranda	Crisantemos; Aves del Paraíso
27/02/2009; 06/05/2009 03/11/2009; 23/03/2010 16/07/2010	Floricultura La Curva de las Flores	San Pedro de los Altos. Sector Santa Rita	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera y Rosas de corte
23/04/2009; 09/10/2009 12/02/2010; 10/06/2010	Califlor	Tucutunemo	Zamora	Aragua	Gerbera de corte
28/04/2009; 07/07/2009 28/10/2009	Alberto Varela	San Pedro de los Altos. Sector La Culebra	Guaicaipuro	Miranda	Rosas de corte
21/05/2009; 09/01/2010 19/01/2010; 19/02/2010 19/03/2010; 24/04/2010 21/05/2010; 18/06/2010 16/07/2010; 13/08/2010 11/09/2010; 15/10/2010 13/11/2010; 18/12/2010 14/01/2011; 29/01/2011	La Serenisima	La Lagunita – Colonia Tovar	Tovar	Aragua	Rosas de corte
09/07/2009; 20/10/2009 17/02/2010	Ornamentales Cormar	Cortada del Guayabo	San Diego de los altos	Miranda	Begonias, Gerberas de pote; Coquetas
07/08/2009; 14/01/2010 11/02/2010; 11/03/2010 08/04/2010; 18/05/2010 08/06/2010; 08/07/2010 10/08/2010; 09/09/2010 12/10/2010; 09/11/2010 14/12/2010; 11/01/2011 29/01/2011	Flores Las Llanadas	San Pedro de los Altos Sector Las Llanadas	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera de corte y Crisantemos
07/08/2009; 29/10/2009 14/01/2010; 11/02/2010 11/03/2010; 08/04/2010 18/05/2010; 08/06/2010 08/07/2010; 10/08/2010 09/09/2010; 12/10/2010 09/11/2010; 14/12/2010 11/01/2011; 29/01/2011	Finca La Noguera	San Pedro de los altos. Sector Garabato (Pozo de Rosas)	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera y Rosas de corte; Gladiolo; Crisantemos
11/08/2009; 14/01/2010 26/03/2010	El Jardín del Aster	San Pedro de los Altos. Sector garabato (Pozo	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera de corte y Aster

		de Rosas)			
14/08/2009; 08/12/2009 09/01/2010	Cooperativa Jarillo Arriba 2031	El Jarillo	El Jarillo	Miranda	Gerbera y Rosas de corte
02/10/2009; 20/11/2009 11/01/2010; 15/02/2010 15/03/2010; 26/04/2010 17/05/2010; 14/06/2010 12/07/2010; 16/08/2010 13/09/2010; 11/10/2010 15/11/2010; 13/12/2010 05/01/2011; 17/01/2011 28/01/2011	Vivero Los Montes Verdes	Los Teques	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera de corte y de pote
03/08/2010; 20/10/2010 01/12/2010	Cultivos Veneflor	Paracotos	Guaicaipuro	Miranada	Gerbera de corte y Poinsettias

Anexo 3. Unidades de Producción muestreadas desde enero del 2008 a diciembre 2010

Unidad de Producción	Localidad	Municipio	Estado	Cultivos	Presencia del patógeno		
					2008	2009	2010
Súper Plántulas	Guayabita	Mariño	Aragua	Vincas; Gerbera de Pote; Petunias	-	-	-
Finca Monverana	Vía Pozo de Rosas, Sector La Navera	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera y Rosas de Corte; Poinsettias	Si	Si	Si
Flosven	Tasajera	Revenga	Aragua	Gerbera de corte y rosas de pote	-	Si	-
Agroflos	Tasajera	Revenga	Aragua	Gerbera de corte	si	-	Si
Vivero Tropi Rosas	San Pedro de Los Altos; Sector Manzanares	Guaicaipuro	Miranda	Gazanias; Rosas de pote; Begonias; Vincas	si	-	si
Finca La Boriza	Los Anaucos		Miranda	Rosas de Pote	Si	-	-
Vivero La Pastora	Carrizales	Carrizales	Miranda	Gerbera y rosas de Corte	Si	-	Si
Wanaby	Tasajera	Revenga	Aragua	Rosas de pote y de Corte	Si	-	si
Floricultura La Toma	Sector La Navera	Guaicaipuro	Miranda	Crisantemos; Girasol	Si	-	Si
Hacienda Fresca Flor	Sector La Navera	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera y Rosas de corte	si	-	Si
Agrícola Doña Adela	Potrerito		Miranda	Gerbera y Rosas de Corte; Tomate	-	-	Si
Inversiones Tiara Plants	Club de Campo	San Antonio de los Altos	Miranda	Poinsettias y Gerbera de pote	Si	-	si
Capachalito	Capachal – Colonia Tovar	Tovar	Aragua	Fresas y Rosas de pote	-	Si	-
Vivero El Horticultor	Baruta	Baruta	Miranda	Rosas; Poinsettias; Tomate; Pimentón	Si	-	Si
Floricultura Minerva	San Pedro de los Altos, vía Hidroponías Venezolanas	Guaicaipuro	Miranda	Crisantemos; Aves del Paraiso	Si	-	Si

Floricultura La Curva de las Flores	San Pedro de los altos; Sector Santa Rita	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera y Rosas de Corte	Si	-	-
Califlor	Tucutunemo	Zamora	Aragua	Gerbera de corte	-	-	-
Alberto Varela	San Pedro de los altos, sector La Culebra	Guaicaipuro	Miranda	Rosas de Corte	.	si	-
La Serenisima	La Lagunita – colonia Tovar	Tovar	Aragua	Rosas de Corte	Si	Si	Si
Ornamentales Cormar	Cortada de Guayabo	San Diego de los Altos	Miranda	Begonias; Gerbera de pote; Coquetas	Si	-	-
Flores las Llanadas	San Pedro de los Altos, sector Las Llanadas	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera de Corte y Crisantemos	Si	Si	Si
Finca La Noguera	San Pedro de los Altos, sector Garabato (Pozo de Rosas)	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera y rosas de corte; Gladiolo; Crisantemos	Si	Si	Si
El Jardín del Aster	San Pedro de los Altos, sector Garabato (Pozo de Rosas)	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera de corte y Aster	Si	-	Si
Cooperativa Jarillo Arriba 2031	El Jarillo	El Jarillo	Miranda	Gerbera y Rosas de Corte	Si	-	Si
Vivero Los Montes Verdes	Los Teques	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera de Corte y de Pote	Si	Si	Si
Cultivos Veneflor	Paracotos	Guaicaipuro	Miranda	Gerbera de Corte y Poinsettias	-	-	Si

Anexo 4. Análisis Descriptivo del Muestreo

Descriptive Statistics

	v001
N	12
Mean	15.917
SD	4.7760
Variance	22.811
SE Mean	1.3787
C.V.	30.007
α	90

Anexo 5. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 01 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.

Producto	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Germinación
Az 0,5	1,08 a	2,47 a	3,72 a	4,98 a	6,65 a	7,94 a	8,91 a	11,00 ab
Az 2	1,03 a	2,23 a	3,43 a	4,57 a	5,73 abc	7,33 ab	8,58 ab	9,00 ab
Az 5	0,95 a	2,18 a	3,42 a	4,67 a	5,73 abc	7,43 ab	8,66 ab	10,83 ab
Az 10	0,98 a	2,29 a	3,69 a	4,76 a	5,77 abc	7,63 a	8,68 ab	5,17 ab
Az 100	1,07 a	2,30 a	3,56 a	4,73 a	6,03 ab	7,53 ab	8,72 a	3,00 ab
Az 200	1,07 a	2,30 a	3,56 a	4,73 a	6,03 ab	7,53 ab	8,72 a	1,33 ab
Az 500	1,04 a	2,20 a	3,49 a	4,68 a	5,85 abc	7,46 ab	8,68 ab	0,00 b
Az 1000	0,88 a	1,50 a	3,45 a	4,39 a	5,54 abc	6,44 ab	7,43 ab	0,00 b
Ben 0,5	1,07 a	2,32 a	3,57 a	4,76 a	6,03 ab	7,60 a	8,74 a	3,33 ab
Ben 2	1,07 a	2,30 a	3,56 a	4,73 a	6,03 ab	7,53 ab	8,72 a	3,50 ab
Ben 5	1,07 a	2,30 a	3,56 a	4,73 a	6,03 ab	7,53 ab	8,72 a	3,50 ab
Ben 10	1,08 a	2,27 a	3,56 a	4,74 a	6,08 ab	7,63 a	8,76 a	1,83 ab
Ben 100	1,07 a	2,30 a	3,56 a	4,73 a	6,03 ab	7,53 ab	8,72 a	0,00 b
Ben 200	1,04 a	2,30 a	3,62 a	4,77 a	6,08 ab	7,60 a	8,53 ab	0,00 b
Ben 500	1,00 a	2,33 a	3,55 a	4,78 a	5,84 abc	7,27 ab	8,21 ab	0,00 b
Ben 1000	0,00 a	0,90 a	1,18 a	2,18 a	3,19 abc	4,63 ab	5,96 ab	0,00 b
Ipr 0,5	1,04 a	2,30 a	3,62 a	4,77 a	6,08 ab	7,60 a	8,72 a	12,50 a
Ipr 2	0,00 a	1,03 a	2,23 a	3,36 a	4,57 abc	5,65 ab	6,35 ab	13,17 a
Ipr 5	0,00 a	0,91 a	1,19 a	2,17 a	3,15 abc	4,08 ab	4,77 ab	8,50 ab
Ipr 10	1,08 a	2,27 a	3,56 a	4,74 a	6,08 abc	7,63 a	4,20 ab	1,83 ab
Ipr 100	1,07 a	2,30 a	3,56 a	4,73 a	6,03 abc	7,53 a	3,46 ab	0,00 b
Ipr 200	1,04 a	2,30 a	3,62 a	4,77 a	6,08 bc	7,60 a	2,95 ab	0,00 b
Ipr 500	0,00 a	0,91 a	1,13 a	1,69 a	2,12 bc	2,42 ab	2,68 ab	0,00 b
Ipr 1000	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 0,5	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,67 ab

Car 2	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 10	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 100	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 200	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 500	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 1000	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
CI 0,5	1,07	a	2,30	a	3,56	a	4,73	a	6,03	abc	7,53	a	8,72	a	11,83	ab
CI 2	1,07	a	2,30	a	3,56	a	4,73	a	6,03	ab	7,53	a	8,72	a	10,17	ab
CI 5	0,94	a	1,50	a	3,08	a	4,05	a	5,21	abc	5,83	ab	5,95	ab	10,33	ab
CI 10	0,90	a	1,25	a	2,38	a	3,10	a	4,12	abc	4,61	ab	4,83	ab	6,50	ab
CI 100	0,90	a	1,24	a	2,52	a	3,50	a	4,38	abc	4,75	ab	4,79	ab	3,00	ab
CI 200	0,90	a	1,17	a	2,31	a	3,23	a	4,23	abc	4,68	ab	4,77	ab	0,00	b
CI 500	0,90	a	1,22	a	2,48	a	3,21	a	3,93	abc	4,22	ab	4,27	ab	0,00	b
CI 1000	0,90	a	1,19	a	2,20	a	3,11	a	3,48	abc	3,78	ab	3,78	ab	0,00	b
Testigo	1,07	a	2,30	a	3,56	a	4,73	a	6,03	ab	7,53	a	8,72	a	14,67	a

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Anexo 6. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 02 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.

Producto	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Germinación
Az 0,5	1,08 a	2,47 a	3,73 a	4,97 a	6,65 a	7,93 a	8,88 a	9,17 a
Az 2	1,04 a	2,23 a	3,43 a	4,57 a	5,69 a	7,38 a	8,56 a	9,33 a
Az 5	0,53 a	1,69 a	3,20 a	4,46 a	5,48 a	6,45 a	6,85 ab	5,67 ab
Az 10	0,12 a	1,03 a	2,23 a	3,31 abc	4,33 abc	5,41 ab	5,98 ab	1,17 ab
Az 100	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Az 200	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Az 500	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Az 1000	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 0,5	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 2	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 5	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 10	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 100	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 200	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 500	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 1000	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ipr 0,5	0,20 a	0,53 a	1,07 a	1,47 abc	1,93 abc	2,36 ab	2,88 ab	2,67 ab
Ipr 2	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,88 c	1,29 abc	1,56 ab	2,27 ab	2,33 ab
Ipr 5	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ipr 10	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ipr 100	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ipr 200	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ipr 500	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ipr 1000	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 0,5	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 2	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b

Car 5	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 10	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 100	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 200	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 500	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
Car 1000	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	c	0,00	c	0,00	b	0,00	b	0,00	b
CI 0,5	0,88	a	2,22	a	4,29	a	4,87	a	5,68	a	6,33	a	7,03	a	8,33	a
CI 2	0,51	a	1,37	a	3,38	a	4,20	a	4,80	abc	5,04	a	5,53	ab	8,33	a
CI 5	0,75	a	1,28	a	3,28	a	4,03	a	4,40	abc	4,73	a	5,22	ab	8,50	a
CI 10	0,58	a	1,18	a	3,16	a	3,97	a	4,35	abc	4,61	a	5,02	ab	7,00	a
CI 100	0,33	a	1,52	a	2,76	a	3,58	abc	3,94	abc	4,16	a	4,43	ab	6,33	ab
CI 200	1,19	a	1,43	a	2,63	a	3,09	abc	3,42	abc	3,54	ab	3,88	ab	2,50	ab
CI 500	0,00	a	0,98	a	1,65	a	2,21	abc	2,80	abc	3,03	ab	3,28	ab	0,83	ab
CI 1000	0,58	a	1,02	a	1,71	a	1,94	abc	2,01	abc	2,01	ab	2,01	ab	0,00	b
Testigo	0,95	a	2,06	a	4,43	a	5,92	a	6,88	a	7,69	a	8,70	a	16,67	a

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Anexo 7. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 03 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.

Producto	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Germinación
Az 0,5	0,84 a	2,04 a	4,26 a	5,41 a	6,35 a	7,34 a	7,87 a	3,17 a
Az 2	0,98 a	2,22 a	4,28 a	5,43 a	6,27 a	6,70 ab	6,99 a	2,00 b
Az 5	0,53 ab	1,69 ab	3,20 ab	4,48 ab	5,49 ab	6,48 ab	6,90 a	1,50 b
Az 10	0,12 ab	1,03 ab	2,23 ab	3,31 ab	4,33 ab	5,41 ab	5,98 a	1,67 ab
Az 100	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	1,17 ab
Az 200	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,83 ab
Az 500	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,83 ab
Az 1000	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,17 ab
Ben 0,5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,33 ab
Ben 2	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Ben 5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Ben 10	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Ben 100	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Ben 200	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Ben 500	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Ben 1000	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Ipr 0,5	0,20 ab	0,53 ab	1,07 b	1,47 b	1,93 c	2,36 bc	2,88 ab	2,67 a
Ipr 2	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	1,29 c	1,58 c	2,88 ab	0,83 ab
Ipr 5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	1,10 d	2,27 ab	1,00 ab
Ipr 10	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 b	1,67 ab
Ipr 100	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,50 ab
Ipr 200	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 ab
Ipr 500	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,33 ab

Ipr 1000	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Car 0,5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Car 2	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Car 5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Car 10	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Car 100	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Car 200	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Car 500	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
Car 1000	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b
CI 0,5	0,88 a	2,22 a	4,29 a	4,87 ab	5,68 ab	6,33 ab	7,03 a	1,50 ab
CI 2	0,51 ab	1,37 ab	3,38 ab	4,20 ab	4,80 ab	5,04 ab	5,53 a	1,17 ab
CI 5	0,75 ab	1,28 ab	3,28 ab	4,03 ab	4,40 ab	4,73 b	5,22 ab	1,00 ab
CI 10	0,58 ab	1,18 ab	3,16 ab	3,97 ab	4,35 ab	4,61 b	5,02 ab	0,67 ab
CI 100	0,33 ab	1,52 ab	2,76 ab	3,58 ab	3,94 b	4,16 b	4,43 ab	0,67 ab
CI 200	1,19 a	1,43 ab	2,63 ab	3,09 ab	3,42 b	3,54 bc	3,88 ab	0,67 ab
CI 500	0,00 b	0,98 ab	1,65 b	2,21 ab	2,80 b	3,03 bc	3,28 ab	0,17 ab
CI 1000	0,47 ab	0,84 ab	1,35 b	1,58 b	1,61 c	1,61 c	1,61 ab	0,00 b
Testigo	0,89 a	2,00 a	4,54 a	5,82 a	6,55 a	7,10 a	7,50 a	4,67 a

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Anexo 8. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 04 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.

Producto	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Germinación
Az 0,5	1,18 a	2,32 a	4,63 a	6,80 a	8,43 a	9,00 a	9,00 a	14,33 a
Az 2	1,24 a	2,28 a	4,44 a	6,29 a	7,88 a	8,81 a	9,00 a	12,00 a
Az 5	1,24 a	2,28 a	4,44 a	6,29 a	7,88 a	8,81 a	9,00 a	11,50 a
Az 10	1,18 a	2,03 a	4,11 a	5,87 ab	7,54 a	8,64 a	9,00 a	8,17 ab
Az 100	1,32 a	2,61 a	4,94 a	6,55 a	7,93 a	8,73 a	9,00 a	0,00 b
Az 200	1,22 a	2,17 a	4,03 a	5,43 ab	7,04 a	8,23 a	9,00 a	0,00 b
Az 500	1,22 a	2,17 a	4,03 a	5,43 ab	7,04 a	8,23 a	9,00 a	0,00 b
Az 1000	1,35 a	2,43 a	4,42 a	5,88 ab	7,39 a	8,45 a	9,00 a	0,00 b
Ben 0,5	1,32 a	2,70 a	4,72 a	6,40 a	7,75 a	8,63 a	9,00 a	0,00 b
Ben 2	0,00 a	0,91 a	1,23 a	2,13 b	2,89 ab	3,40 ab	3,76 ab	0,00 b
Ben 5	0,00 a	0,90 a	1,20 a	1,98 b	2,85 ab	3,41 ab	3,61 ab	0,00 b
Ben 10	0,00 a	0,68 a	0,75 a	1,06 b	1,32 ab	1,48 ab	1,53 ab	0,00 b
Ben 100	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 200	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 500	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ben 1000	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ipr 0,5	0,90 a	2,26 a	3,32 a	4,34 ab	6,41 ab	7,48 ab	7,86 ab	2,17 ab
Ipr 2	0,98 a	2,18 a	3,80 a	5,01 ab	6,84 ab	7,57 ab	7,76 ab	1,17 ab
Ipr 5	0,90 a	1,98 a	3,18 a	4,45 ab	5,68 ab	6,49 ab	6,81 ab	0,00 b
Ipr 10	0,90 a	1,22 a	2,29 a	3,38 ab	4,53 ab	5,20 b	5,43 ab	0,00 b
Ipr 100	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ipr 200	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Ipr 500	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b

Ipr 1000	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 0,5	0,00 a	0,90 a	1,27 a	2,07 b	2,32 ab	2,32 ab	2,32 ab	0,00 b
Car 2	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 5	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 10	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 100	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 200	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 500	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Car 1000	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
CI 0,5	1,26 a	2,39 a	4,83 a	6,83 a	8,37 a	8,81 a	9,00 a	15,50 a
CI 2	1,24 a	2,21 a	4,30 a	5,92 ab	7,56 a	8,50 a	8,96 a	8,33 ab
CI 5	1,27 a	2,38 a	4,24 a	5,83 ab	7,46 a	8,43 a	8,94 a	7,33 ab
CI 10	1,23 a	2,45 a	4,68 a	6,77 a	8,10 a	8,67 a	8,72 a	4,67 ab
CI 100	1,13 a	2,14 a	4,38 a	6,31 a	7,47 a	8,19 a	8,35 a	0,00 b
CI 200	1,09 a	2,15 a	4,34 a	6,58 a	7,74 a	8,23 a	8,27 a	0,00 b
CI 500	0,90 a	1,23 a	2,21 a	3,24 ab	4,38 ab	5,08 ab	7,10 ab	0,00 b
CI 1000	0,90 a	1,23 a	2,21 a	3,24 ab	4,38 ab	5,08 ab	5,27 ab	0,00 b
Testigo	1,26 a	2,28 a	4,38 a	6,13 a	7,76 a	8,69 a	8,97 a	12,00 a

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

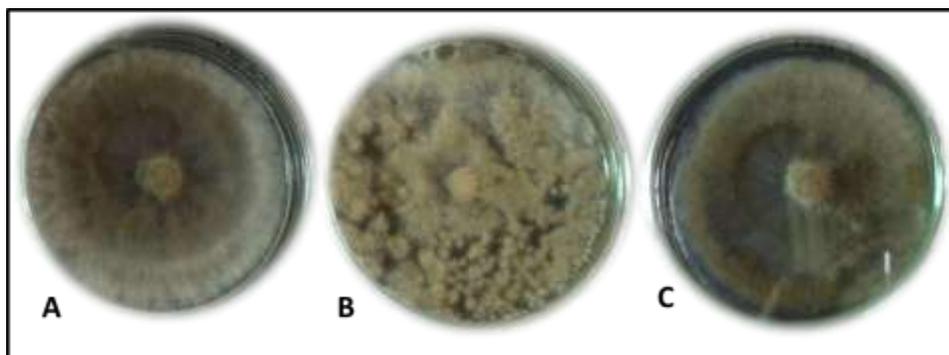
Anexo 9. Evaluación del crecimiento micelial y germinación de conidios de Bot 05 a los fungicidas: Azoxystrobin; Benomilo; Iprodione; Carbendazim y Clorotalonil a ocho dosis diferentes.

Producto	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Germinación
Az 0,5	0,54 ab	1,49 ab	3,60 ab	5,76 ab	7,88 a	9,00 a	9,00 a	14,33 abcd
Az 2	0,00 b	1,52 ab	3,63 ab	5,08 ab	6,57 ab	8,04 ab	8,98 a	11,00 abcd
Az 5	0,00 b	1,03 ab	2,56 ab	3,56	5,02 b	6,53 bc	8,32 ab	10,17 abcd
Az 10	0,00 b	1,03 ab	2,56 ab	3,56	5,02 b	6,53 bc	7,80 ab	10,17 abcd
Az 100	0,00 b	0,00 b	0,00 c	1,01	2,23 bcd	3,28 cd	4,65 cd	10,00 abcd
Az 200	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,81	2,33 bcd	3,34 cd	4,23 cd	8,67 abcd
Az 500	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00	0,00 d	0,00 d	0,00 d	8,00 abcd
Az 1000	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00	0,00 d	0,00 d	0,00 d	8,33 abcd
Ben 0,5	1,69 ab	3,18 a	5,47 a	7,36 a	8,63 a	8,98 a	9,00 a	18,17 ab
Ben 2	1,41 ab	2,77 ab	5,68 a	7,68 a	9,00 a	9,00 a	9,00 a	17,17 ab
Ben 5	1,46 ab	3,03 a	5,24 a	7,61 a	9,00 a	9,00 a	9,00 a	18,33 ab
Ben 10	1,23 ab	2,03 ab	3,73 ab	5,23 ab	7,13 a	8,26 ab	9,00 a	15,33 abc
Ben 100	0,31 ab	1,04 ab	2,17 bc	3,12 b	3,84 bcd	5,98 bc	7,29 ab	13,67 abcd
Ben 200	0,00 b	0,93 ab	2,13 bc	3,13 b	4,29 b	6,05 bc	7,31 ab	12,00 abcd
Ben 500	0,00 b	0,00 b	0,00 c	1,20 bc	3,24 bcd	5,13 bc	6,67 bc	10,00 abcd
Ben 1000	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d
Ipr 0,5	1,18 ab	1,79 ab	3,20 ab	4,19 ab	5,38 b	6,49 bc	7,84 ab	21,00 a
Ipr 2	0,42 ab	1,20 ab	1,98 bc	2,49 b	3,69 bcd	4,72 bc	5,87 bc	5,50 abcd
Ipr 5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	3,50 abcd
Ipr 10	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	2,83 bcd
Ipr 100	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 bcd
Ipr 200	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,33 bcd
Ipr 500	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d
Ipr 1000	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d

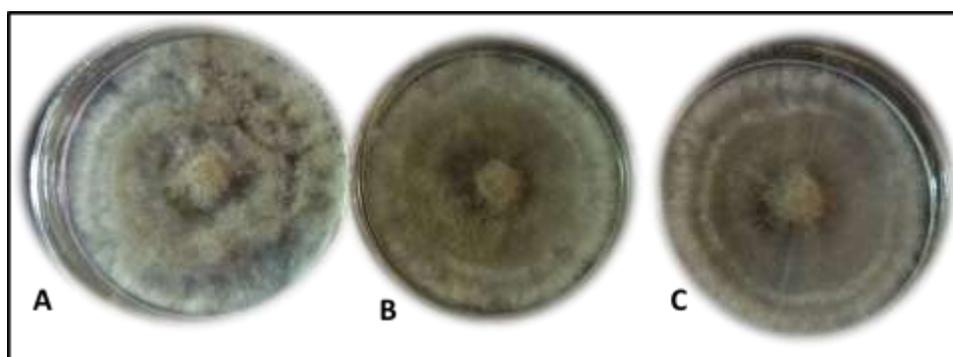
Car 0,5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	16,17 abc
Car 2	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	15,17 abcd
Car 5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	14,83 abcd
Car 10	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	13,33 abcd
Car 100	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	14,83 abcd
Car 200	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	12,83 abcd
Car 500	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	10,67 abcd
Car 1000	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	9,17 abcd
CI 0,5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	1,17 bcd
CI 2	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	1,00 bcd
CI 5	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	1,00 bcd
CI 10	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,67 bcd
CI 100	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,67 bcd
CI 200	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d
CI 500	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d
CI 1000	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d
Testigo	2,08 a	3,13 a	5,04 a	6,81 a	7,81 a	8,72 a	9,00 a	17,17 ab

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

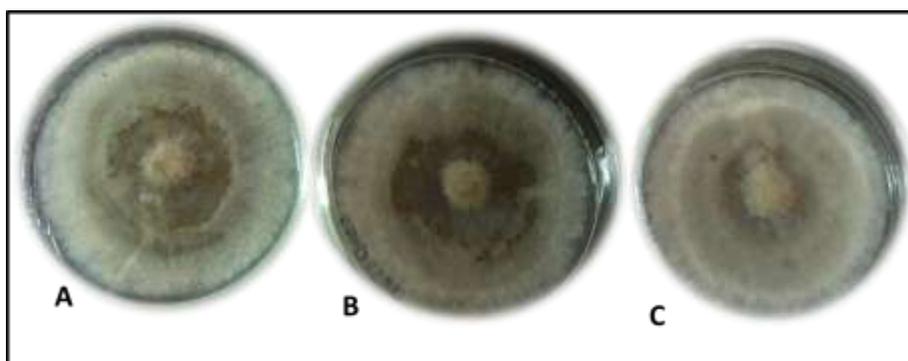
Anexo 10. Detalle del control *In vitro* de Bot 05 con los tratamientos de Ácidos fosfórico (Agrifos). A: Agrifos 3 ml/l; B: Agrifos 5 ml/l; C: Agrifos 7 ml/l



Anexo 11. Detalle del control *In vitro* de Bot 05 con los tratamientos de Quitosano (Biorend). A: Biorend 8 ml/l; B: Biorend 10 ml/l; C: Biorend 12 ml/l



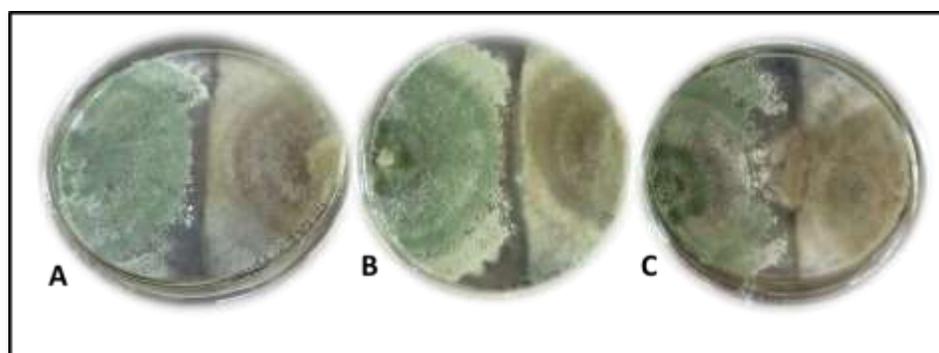
Anexo 12. Detalle del control *In vitro* de Bot 05 con los tratamientos de Silicio (Quick sol). A: Quick sol 2 ml/l; B: Quick sol 3 ml/l; C: Quick sol 5 ml/l



Anexo 13. Detalle del control *In vitro* de Bot 05 con los tratamientos de Ácido fosfórico + *Trichoderma* (Agrifos + Tricobiol). A: Agrifos 3 ml/l + Tricobiol; B: Agrifos 5 ml/l + Tricobiol; C: Agrifos 7 ml/l + Tricobiol



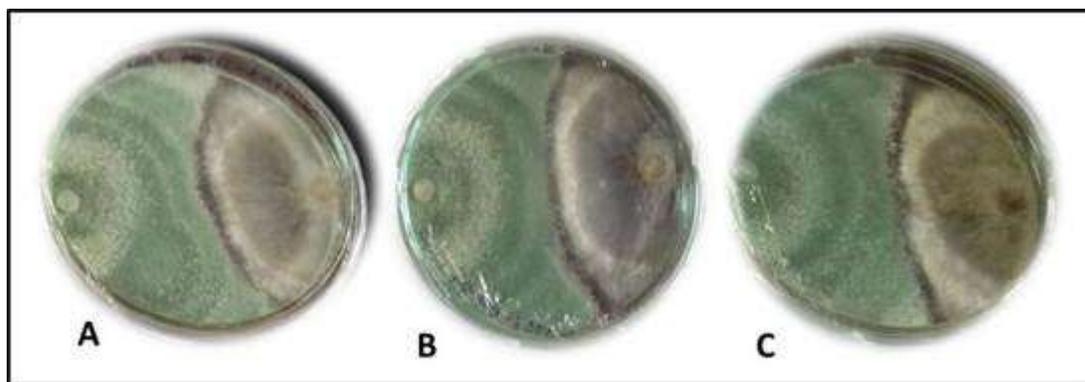
Anexo 14. Detalle del control *In vitro* de Bot 05 con los tratamientos de Quitosano + *Trichoderma* (Biorend + Tricobiol). A: Biorend 8 ml/l + Tricobiol; B: Biorend 10 ml/l + Tricobiol; C: Biorend 12 ml/l + Tricobiol



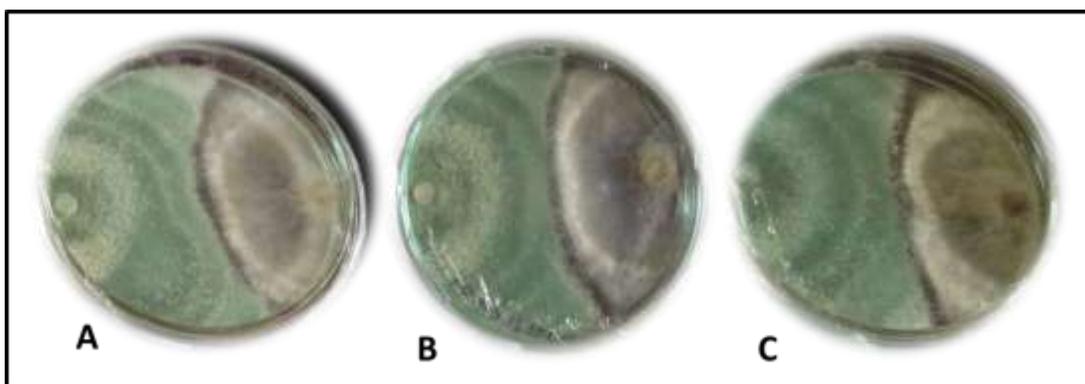
Anexo 15. Detalle del control *In vitro* de Bot 05 con los tratamientos de Silicio + *Trichoderma* (Quick sol + Tricobiol). A: Quick sol 2 ml/l + Tricobiol; B: Quick sol 3 ml/l + Tricobiol; C: Quick sol 5 ml/l + Tricobiol



Anexo 16. Detalle del control *In vitro* de Bot 05 con Ácido Fosforoso + Mezcla de *Trichoderma* (Agrifos + Trico Plus A). A: Agrifos 3 ml/l + Trico Plus A; B: Agrifos 5 ml/l + Trico Plus A; C: Agrifos 7 ml/l + Trico Plus A



Anexo 17. Detalle del control *In vitro* de Bot 05 con Quitosano + Mezcla de *Trichoderma* (Biorend + Trico Plus A). A: Biorend 8 ml/l + Trico Plus A; B: Biorend 10 ml/l + Trico Plus A; C: Biorend 12 ml/l + Trico Plus A



Anexo 18. Detalle del control *In vitro* de Bot 05 con Silicio + Mezcla de *Trichoderma* (Quick sol + Trico Plus A). A: Quick sol 2 ml/l + Trico Plus A; B: Quick sol 3 ml/l + Trico Plus A; C: Quick sol 5 ml/l + Trico Plus A