

ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE EFICACIA DE PRODUCTOS PARA LA PROTECCIÓN DE CULTIVO (PPC) PREVENTIVOS PARA EL CONTROL DE *Botrytis* sp, EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS.

**MARIA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ OYUELA
ZULMA YADIRA MORENO CASTAÑEDA**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar el título de**

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTA, D.C
ENERO 2008**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado.”

ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE EFICACIA DE PRODUCTOS PARA LA PROTECCIÓN DE CULTIVO (PPC) PREVENTIVOS PARA EL CONTROL DE *Botrytis* sp, EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS.

**MARIA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ OYUELA
ZULMA YADIRA MORENO CASTAÑEDA**

APROBADO

ZULMA PATRICIA ARGUELLES
Bacterióloga
Directora

MARIA XIMENA RODRIGUEZ
Microbióloga
Codirectora

CINDIA SANDON
Microbióloga Agrícola y Veterinaria
Jurado

GERARDO MORENO
Ingeniero Agrónomo
Jurado

ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE EFICACIA DE PRODUCTOS PARA LA PROTECCIÓN DE CULTIVO (PPC) PREVENTIVOS PARA EL CONTROL DE *Botrytis* sp, EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS.

**MARIA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ OYUELA
ZULMA YADIRA MORENO CASTAÑEDA**

APROBADO

ANGELA UMAÑA MUÑOZ
Decana Académica
Facultad de Ciencias

JANETH ARIAS PALACIOS
Directora de Carrera
Microbiología Industrial

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

La empresa AMERICAFLOR Ltda. por la oportunidad de desarrollar el trabajo de grado en sus instalaciones.

Dra. Zulma Arguelles, por su constante colaboración y apoyo, por la confianza y los conocimientos brindados.

Dra. María Ximena Rodríguez, por su disposición para asesorar este trabajo, y por ser una guía en nuestro camino.

Todo el personal del Laboratorio de Sanidad Vegetal, por la colaboración prestada durante el desarrollo del trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera ayudaron a que este trabajo se llevara a cabo.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO Y REVISION DE LITERATURA	14
2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ROSA.....	14
2.2 GENERALIDADES DE LA ROSA.....	14
2.3 REQUERIMIENTOS PARA EL DESARROLLO DEL CULTIVO.....	16
2.3.1 <i>Temperatura</i>	16
2.3.2 <i>Iluminación</i>	17
2.3.3 <i>Humedad relativa</i>	17
2.3.4 <i>Suelo</i>	17
2.4 PROBLEMAS FITOSANITARIOS.....	18
2.5 GENERALIDADES DE <i>BOTRYTIS SP.</i>	19
2.5.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	19
2.5.2 MORFOLOGÍA	20
2.5.3 CICLO DE VIDA	21
2.5.4 FACTORES DE CRECIMIENTO PARA <i>BOTRYTIS SP.</i>.....	23
2.5.4.1 <i>Humedad Relativa</i>	23
2.5.4.2 <i>Temperatura</i>	23
2.5.4.3 <i>pH</i>	23
2.5.5 FACTORES QUE PREDISPONEN A LAS PLANTAS DEL ATAQUE POR <i>BOTRYTIS SP.</i>.....	24
2.5.6 FACTORES DE PATOGENICIDAD DE <i>BOTRYTIS SP.</i>	24
2.5.6.1 <i>Penetración de tejidos y degradación enzimática de paredes celulares</i>	24
2.5.7 CICLO DE INFECCIÓN.....	26
2.5.8 SINTOMATOLOGÍA	27
2.5.9 CONTROL DEL MOHO GRIS	29
2.5.9.1 <i>Control Cultural</i>	29
2.5.9.2 <i>Control Químico</i>	30
2.5.9.3 <i>Control Biológico</i>	31
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. OBJETIVOS	35
5. MATERIALES Y METODOS	36
5.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE <i>BOTRYTIS SP.</i>.....	36
5.1.1 <i>Recolección del material vegetal para el aislamiento del patógeno</i>	36
5.1.2 <i>Aislamiento de <i>Botrytis sp.</i> a partir de material vegetal</i>	36
5.1.3 <i>Purificación de la cepa de <i>Botrytis sp.</i></i>	36
5.1.4 <i>Reactivación de la cepa</i>	36
5.2. AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE <i>BOTRYTIS SP.</i> Y OBTENCIÓN DE LA ESCALA DE LECTURA DEL PORCENTAJE DE AFECCIÓN EN PÉTALOS DE ROSA	37
5.2.1 <i>Preparación del material vegetal</i>	37
5.2.2 <i>Preparación del inóculo de <i>Botrytis sp.</i></i>	37
5.2.3 <i>Aspersión de los pétalos de rosa</i>	37
5.2.4 <i>Lectura de pétalos de rosa y obtención de la escala de lectura</i>	38

5.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE <i>BOTRYTIS</i>	
SP. EN TALLOS FLORALES	38
5.3.1 <i>Preparación del Material Vegetal</i>	38
5.3.2 <i>Preparación de inóculos</i>	39
5.3.3 <i>Preparación de cámaras húmedas</i>	39
5.3.4 <i>Aspersión de los tallos florales</i>	41
5.3.5 <i>Determinación del Grado de Severidad de los pétalos de rosa</i>	41
5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	41
5.5 EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZANDO DIFERENTES	
PRODUCTOS PARA LA PROTECCIÓN DEL CULTIVO (PPC) PREVENTIVOS	
PARA EL CONTROL DE <i>BOTRYTIS</i> SP.	42
5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1 AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE <i>BOTRYTIS</i> SP. Y	
OBTENCIÓN DE LA ESCALA DE LECTURA DEL PORCENTAJE DE AFECCIÓN	
EN PÉTALOS DE ROSA	45
6.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE <i>BOTRYTIS</i>	
SP. Y LA HORA DE LECTURA EN TALLOS FLORALES	46
6.3 EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZANDO DIFERENTES	
PRODUCTOS PARA LA PROTECCION DEL CULTIVO (PPC) PREVENTIVOS	
PARA EL CONTROL DE <i>BOTRYTIS</i> SP.	49
7. CONCLUSIONES	55
8. RECOMENDACIONES	56
9. BIBLIOGRAFÍA	57
10. ANEXOS	63

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	42
TABLA 2. ESCALA DE LECTURA DE AFECCIÓN Y ESPORULACIÓN.....	43
TABLA 3. PRUEBA DEL RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN PARA LA AFECCIÓN DE PÉTALOS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS,	46
TABLA 4. PRUEBA DEL RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN PARA EL PORCENTAJE DE AFECCIÓN CON LAS DIFERENTES HORAS DE LECTURA,.....	47
TABLA 5. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUKEY PARA EL NÚMERO TOTAL DE PÉTALOS AFECTADOS EN LOS DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD DE LOS SEIS TRATAMIENTOS.	50

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MICROSCOPIA DE <i>BOTRYTIS</i> SP.	21
FIGURA 2. CICLO DE VIDA DE <i>BOTRYTIS</i> SP.	22
FIGURA 3. CICLO DE INFECCIÓN DE <i>BOTRYTIS</i> SP.	27
FIGURA 4. LESIONES LOCALIZADAS.....	17
FIGURA 5. NECROSIS DE PÉTALOS.....	28
FIGURA 6. MUERTE DE LA FLOR Y CAIDA DE LOS PETALOS	29
FIGURA 7. DESPÉTALE DE LAS ROSAS.....	27
FIGURA 8. CORTE DE HOJAS Y ESPINAS	39
FIGURA 9. CORTE DE TALLOS DE LAS ROSAS	39
FIGURA 10. CÁMARA HÚMEDA	40
FIGURA 11. CUBÍCULOS PLÁSTICOS	40
FIGURA 12. PORCENTAJE DE AFECCIÓN CON LOS DIFERENTES INÓCULOS DE <i>BOTRYTIS</i> SP. Y HORAS DE LECTURA EN PÉTALOS DE ROSA	47
FIGURA 13. PORCENTAJE DE CONTROL DE CADA UNO DE LOS PPC EVALUADOS.....	51
FIGURA 14. PORCENTAJE DE ESPORULACIÓN DEL TESTIGO RELATIVO EN CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS.	53

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A. AGAR PAPA DEXTROSA (PDA)	63
ANEXO B. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE <i>BOTRYTIS</i>	63
ANEXO C. PRUEBA DEL RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN PARA LA AFECCIÓN DE PÉTALOS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	64
ANEXO D. PRUEBA DEL RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN PARA EL PORCENTAJE DE AFECCIÓN CON LAS DIFERENTES HORAS DE LECTURA.	65
ANEXO E. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUKEY PARA EL NÚMERO TOTAL DE PÉTALOS AFECTADOS EN LOS DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD.....	65

ANEXO F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO NO PARAMÉTRICO KRUSKAL-WALLIS PARA DETERMINAR LA VARIACIÓN ENTRE LAS TRES REPETICIONES DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS.	66
ANEXO G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO NO PARAMÉTRICO KRUSKAL-WALLIS PARA DETERMINAR LA VARIACIÓN DEL TESTIGO RELATIVO EN LAS SEIS EVALUACIONES.	66
ANEXO H. ESCALA DE LECTURA DEL PORCENTAJE DE AFECCIÓN DE <i>BOTRYTIS</i> SP. EN PÉTALOS DE ROSA.	68

RESUMEN

Botrytis sp., es el agente causal del moho gris, este es un fitopatógeno que ataca diversos cultivos agronómica y económicamente importantes, limitando la producción y ocasionando grandes pérdidas. Este fitopatógeno es muy común en los cultivos de rosa, en donde su control se lleva a cabo utilizando diferentes productos con modo de acción preventivo y curativo, los cuales deben ser evaluados determinando su eficacia antes de su aplicación en campo. Con el fin de estandarizar una metodología de evaluación de eficacia de Productos para la Protección del Cultivo (PPC) con modo de acción preventivo para el control del hongo fitopatógeno *Botrytis* sp. bajo condiciones semicontroladas, se realizó una evaluación de la patogenicidad de la cepa utilizando rosas variedad virginia con tres concentraciones de inóculo del fitopatógeno (6×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 conidios/ml), y tres horas de lectura (48, 72 y 96 horas), observando el porcentaje de afección sobre los pétalos. Los resultados obtenidos indicaron que con la concentración de inóculo 1×10^6 conidios/ml y a las 96 horas de lectura, se alcanzó un porcentaje de afección superior al 90%.

Posteriormente se realizó la evaluación de seis PPC preventivos, tres productos químicos: Clorotalonil, Captan y Mancozeb, dos productos biológicos: *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum* y un producto biorracional, evaluando cada producto con tres repeticiones. Las lecturas de las evaluaciones se realizaron con una escala, en donde se tenía en cuenta dos signos de la enfermedad del moho gris (afección y esporulación), con el fin de determinar en que etapa de desarrollo del fitopatógeno actuaban los PPC preventivos evaluados. Con estas evaluaciones se logró determinar el porcentaje de control de los PPC, obteniendo un mejor control con los productos captan, clorotalonil y el biorracional, que con el fungicida mancozeb y los biocontroladores *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum*. Igualmente se logró determinar la estabilidad y reproducibilidad de la metodología, al no existir diferencias significativas entre las repeticiones de cada producto y entre el testigo relativo de cada evaluación.

ABSTRACT

Botrytis sp., is the casual agent of the gray mold, it is a phytopathogen which attacks several important crops either agronomical and economical, limiting production and causing big lost. This phytopathogen is very common in rose crop, where its control is doing utilizing different products as preventing and curative, these products might be evaluated by determining its efficacy before its application on the field. To standardize a an efficient methodology of evaluation of products to protect the crop (PPC) as prevent action mode to control phytopathogen fungus *Botrytis* sp., under semi-controlled conditions, an pathogenicity evaluation of strain was made by use a variety of roses called Virginia with three conidial suspensions of phytopathogen (6×10^4 , 1×10^5 and 1×10^6 conidia/ml), and three hours of lecture (48, 72 and 96 hours), observeting the percentage of affectation over petals. The obtained results showed that conidial suspension 1×10^6 conidia/ml and after 96 hours of lecture, was obtained a percentage of affectation higher than 90%

Subsequently an evaluation was made with six PPC preventives, three chemical products: Clorotalonil, Captan and Mancozeb, two biological products: *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum* and bio-rational product, evaluating each product with three repetitions. The lectures of evaluations was made with a scale, in which have two signs of illness of grey mould (affectation and sporulation), to determinate in which development stage of performance of phytopathogen the PPC preventives evaluated. With these evaluations was determined the percentage of control of PPC, obtained a better control with Captan, Clorotalonil and bio-rational products, which with Mancozeb fungicide and biocontrollers *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum*. Also stability and reproducibly of methodology were determinated, due to there were no significative differences in each product and between the relative witness of each evaluation

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales actividades económicas de Colombia es la floricultura, exportando el 98% de la producción y convirtiéndose en el ámbito internacional en el segundo exportador mundial de flores frescas de corte, con una participación de 14% en el comercio total, después de Holanda, que cuenta con una participación del 56%. Actualmente, Colombia es el primer proveedor de flores de Estados Unidos con una participación del 60% del mercado total, y es el cuarto proveedor de la Unión Europea con una participación del 4%; igualmente, es el segundo proveedor del Reino Unido con una participación del 10% y el tercer proveedor de Alemania con una participación del 2% sobre el volumen total importado (www.asocolflores.org).

Hoy en día, y con más de 900 millones de dólares exportados en 2005, Colombia destina los mejores suelos de la Sabana de Bogotá, Antioquia, Valle, Eje Cafetero y Cauca para cultivar intensivamente las flores que acompañan fechas especiales en diferentes destinos del mundo. Actualmente cuenta con un área cultivada de 6.953 hectáreas a nivel nacional (www.proexport.com).

La producción de flores es una actividad con baja tecnificación que depende en gran parte de los trabajadores, encargados de la siembra, cultivo, cuidado, fumigación, corte y empaque del producto. Es una actividad agrícola intensiva que en Colombia genera 111.000 empleos directos, de los cuales el 89% son operarios (www.proexport.com).

Uno de los principales problemas que presentan los cultivos de rosa, es la presencia de fitopatógenos, los cuales limitan la producción ocasionando grandes pérdidas económicas. Entre los hongos fitopatógenos más comunes en cultivos de rosa se encuentra *Botrytis* sp, causante de la enfermedad del moho gris.

Este fitopatógeno coloniza los pétalos causando lesiones que reducen la producción y calidad de las rosas. Las pérdidas frecuentemente ocurren después de la

cosecha, como infección latente no detectable establecida durante la temporada de crecimiento, llegando a ser severa en condiciones de alta humedad y oscuridad comúnmente asociadas con el almacenamiento y transporte de rosas cortadas (Araujo *et al.*, 2005).

El hongo coloniza con frecuencia tejidos senescentes que al tener contacto con otros tejidos provocan la infección en ellos. Las infecciones en hojas pueden producirse directamente al caer un conidio sobre ellas o por el contacto con un tejido infectado; se forma entonces una lesión húmeda, transparente, que avanza por toda la hoja llegando al pecíolo. Si prosigue la invasión, en éste se forman lesiones elípticas en el tallo en la zona de inserción; con cierta frecuencia, la lesión puede llegar a rodear el tallo y provocar la muerte de las hojas o de la parte de la planta por encima de ella. Con similares consecuencias se producen invasiones del tallo por la colonización por parte del hongo de los restos de poda o deshojados, sobre todo si estos no se hacen correctamente, hasta poder causar la muerte de la planta (Elad, 1997).

Los síntomas de la enfermedad difieren según la especie atacada y la succulencia del tejido afectado aunque, en general, se producen lesiones de aspecto húmedo y coloración más o menos parda, que provocan la maceración de los tejidos. Normalmente, la lesión se recubre de un fieltro gris característico que le da nombre a la enfermedad, y que no es otra cosa que el micelio del hongo recubierto de abundante cantidad de conidios. Esta enfermedad se puede presentar en cualquier momento desde la floración, sin manifestar síntomas visibles, hasta cuando llega la flor al consumidor (Agrios, 2005).

Para prevenir la incidencia del hongo fitopatógeno, se han utilizado diversos productos en los cultivos tanto químicos como biológicos; sin embargo, no siempre se ha alcanzado el grado de protección deseado. Por lo tanto, para garantizar la efectividad de estos productos preventivos, es necesario estandarizar una metodología que permita evaluarlos bajo condiciones semicontroladas, para que de esta manera se asegure su acción preventiva contra *Botrytis* sp. en su aplicación en campo.

2. MARCO TEÓRICO Y REVISION DE LITERATURA

2.1 Clasificación Taxonómica de la Rosa

Siguiendo la clasificación tradicional, la rosa se encuentra dentro de los siguientes grupos botánicos.

División: Angiospermae
Clase: Dicotyledoneae
Subclase: Archiclamidae
Superorden: Rósidas
Orden: Rosales
Suborden: Rosinae
Familia: Rosaceae
Subfamilia: Rosidae
Tribu: Rosae
Género: Rosa

Fuente: Figueroa & García, 2002

2.2 GENERALIDADES DE LA ROSA

El rosal es una planta arbustiva, de porte abierto, con ramos leñosos, y normalmente espinosos. La mayoría de las especies tienen folíolos dispuestos en forma de plumas, desde 5 hasta 19 folíolos, las hojas son pinnadas, con estípulas y caducas (Figueroa & García, 2002).

Las rosas son plantas que se reproducen asexualmente, por estacas, aunque para mejoramiento se puede hacer por vía sexual. Posee un tallo principal del cual se originan tallos basales que en algunas variedades están cubiertos de espinas. A lo largo de los tallos están alojadas las yemas, que dan origen a los brotes que posteriormente determinan las flores. El tamaño, color, número de pétalos y

sépalos están determinados por las características de las variedades. Sus hojas son compuestas y el número de folíolos depende de la edad y variedad de la planta (Galán, 2002).

Según sus características generales, las especies de rosas se clasifican en diferentes tipos:

Híbridas de té: la primera variedad de este tipo se desarrolló en Francia durante el siglo XVIII. Poseen tallos largos y botones en punta. Son las más cultivadas y perfumadas. De las 30000 variedades de rosas existentes en el mundo, la mayoría son de este tipo. Son rosas muy apreciadas por el formato de sus botones y el tamaño de la rosa cuando se abren por completo. Su crecimiento es erecto y presenta una flor en cada tallo. Dentro de este tipo de rosas se encuentra una variedad enorme de colores.

Floribundas: florecen en ramilletes, sostenidos por un solo tallo. Sus plantas pueden ser altas, medianas o bajas. Se recomiendan para lugares amplios, ya que necesitan más espacio que las híbridas de té. Su floración es muy abundante y se adaptan muy bien a climas cálidos. Son un elemento decorativo ideal por su resistencia, su lozanía permanente y crecimiento compacto.

Grandifloras: este tipo de rosas es producto de un cruce entre la híbrida de té y la floribunda. Presentan tallos largos y buenos botones. Producen flores abundantes y de gran tamaño. Son rosales de crecimiento alto y erecto. Necesitan un lugar amplio para desarrollarse.

Miniaturas: son rosas de tamaño pequeño. Las plantas son muy durables y floríferas. El formato de algunas variedades es el mismo de las híbridas de té. Todas son ideales para canteros y macetas.

Antiguas: estas variedades son anteriores a las híbridas de té. Son ideales para jardines con poco sol y su cuidado es sencillo, ya que casi no se podan. Las flores son de color rojo o blanco.

Trepadoras: son enredaderas. Se diferencian de los otros tipos de rosa por su crecimiento vigoroso. Alcanzan hasta los 4 metros y son ideales para decorar pérgolas, rejas, alambrados, cercos y paredes.

Inglesas: tienen crecimiento rápido. La apariencia es la de la rosa antigua pero son muy florecientes y perfumadas. Son una creación del hibridador D. Austin (Galán, 2002).

En los diferentes cultivos de rosa de la Sabana de Bogotá se reconocen algunas variedades como las de mayor susceptibilidad, entre las cuales se encuentran: Anna, Diplomat, Kiko, Osiana, Peckoubo, Vendela, Virginia y Titanic, entre otras. Sin embargo, respecto a estas y otras variedades, la susceptibilidad reportada es determinada de acuerdo a la ubicación del cultivo y al manejo dado en cada finca, por lo que no representa el mismo problema en cada caso (Montaño, 2005).

2.3 REQUERIMIENTOS PARA EL DESARROLLO DEL CULTIVO

2.3.1 Temperatura

Para la mayoría de los cultivos de rosa, las temperaturas óptimas de crecimiento son de 17°C a 25°C, con una mínima de 15°C durante la noche y una máxima de 28°C durante el día. Pueden mantenerse valores ligeramente inferiores o superiores durante períodos relativamente cortos sin que se produzcan serios daños, pero una temperatura nocturna continuamente por debajo de 15°C retrasa el crecimiento de la planta, produce flores con gran número de pétalos deformes, en el caso de que se abran. Temperaturas excesivamente elevadas también dañan la producción, apareciendo flores más pequeñas de lo normal, con pétalos escasos y de color más cálido (www.infoagro.com).

2.3.2 Iluminación

El índice de crecimiento para la mayoría de los cultivos de rosa sigue la curva total de luz a lo largo del año. Así, en los meses de verano, cuando prevalecen elevadas intensidades luminosas y larga duración del día, la producción de flores es más alta que durante los meses de invierno.

A pesar de tratarse de una planta de día largo, es necesario el sombreo u oscurecimiento durante el verano, dependiendo de la climatología del lugar, ya que elevadas intensidades luminosas van acompañadas de un calor intenso afecta la producción. Se ha comprobado que en lugares con días nublados y durante el invierno, podría ser ventajosa la iluminación artificial de las rosas, con el fin de aumentar la producción (www.infoagro.com).

2.3.3 Humedad relativa

Durante el período de brotación de las yemas y crecimiento de los brotes, es aconsejable una humedad relativa alta (80-90%) a fin de estimular el crecimiento, para posteriormente estabilizarla a valores del 70-75%. Una caída de la humedad relativa por debajo del 70% puede ocasionar ciertos desarreglos fisiológicos en la rosa: deformación de botones, hojas menos desarrolladas, vegetación pobre, caída total de hojas. Por el contrario, humedades relativas altas pueden ser causa de desarrollo de enfermedades. En los momentos cálidos del día, en donde la humedad relativa es más baja, se puede incrementar mediante aplicaciones de agua sobre la vegetación (nebulización), dando riegos cortos y frecuentes. Cuando la humedad relativa sea elevada, se reducirá mediante la ventilación del invernadero (Figuroa & García, 2002).

2.3.4 Suelo

Para el cultivo de rosas el suelo debe estar bien drenado y aireado para evitar encharcamientos. Las rosas toleran un suelo ácido, aunque el pH debe mantenerse en torno a 6. No toleran elevados niveles de calcio, desarrollándose rápidamente la

clorosis debido al exceso de este elemento. Tampoco soportan suelos salinos (www.infoagro.com).

2.4 PROBLEMAS FITOSANITARIOS

El cultivo de rosa se ve afectado por diversas plagas, las cuales pueden ocasionar grandes pérdidas económicas, si sus poblaciones no se mantienen bajo control. Entre las principales se encuentran: ácaros, pulgones, trips, falsa oruga del rosal o mosca del rosal, araña roja, mosca blanca, cochinillas, cicadelas, coleopteros, nemátodos (Figueroa & García, 2002). Otro de los factores que pueden llegar a afectar la producción de rosa son las enfermedades ocasionadas generalmente por hongos fitopatógenos; entre los más frecuentes se encuentran:

Mildeo veloso (*Peronospora sparsa*): se desarrolla favorablemente bajo condiciones de elevada humedad y temperatura, dando lugar a la aparición de manchas irregulares, de color marrón o púrpura sobre el haz de las hojas, pecíolos y tallos, en las zonas de crecimiento activo. En el envés de las hojas pueden verse las estructuras de fructificación del hongo, apareciendo pequeñas áreas grisáceas (Galán, 2002).

Mildeo polvoso (*Sphaerotheca pannosa*): es una de las enfermedades más importantes que se desarrolla sobre flores, tallo y hojas jóvenes, apareciendo un micelio de color blanco grisáceo. Los primeros síntomas son unos ligeros abultamientos de las hojas que aparecen como ampollas en la cara superior (Galán, 2002).

Moho gris (*Botrytis cinerea*): es una enfermedad que se da mucho en cultivos en invernadero, siendo poco conocida al aire libre. Se producen necrosis extensas en los tallos y brotes, pero lo más conocido es el daño que causan a las flores. En los botones florales, con diferentes grados de apertura, aparecen primero, pequeñas manchas rojo púrpura; posteriormente el micelio y las estructuras de propagación del hongo cubren toda la flor observándose en este caso una masa pulvulenta gris.

El ambiente húmedo y la falta de viento con temperatura suave, facilita el desarrollo de la enfermedad (Figueroa & García, 2002).

2.5 GENERALIDADES DE *Botrytis* sp.

2.5.1 Clasificación Taxonómica

Súper-reino: Eukaryonta
Reino: Mycetozoa: fungi
División: Amastigomycota
Sub-división: Deuteromycotina
Clase: Deuteromycete
Sub-Clase: Hyphomycetidae
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género: *Botrytis*
Especie: *cinerea*

Fuente: Bayona, 1996.

Botrytis sp., el agente causal del moho gris, es un patógeno de plantas necrotrófico, que causa serias enfermedades en pre y postcosecha en al menos 235 especies de plantas, incluyendo un rango de cultivos agrónomicamente importantes como uvas, manzanas, peras, tomates, fresas, pepinos, bulbos de flores y plantas ornamentales, a través de heridas, de aberturas naturales o directamente a través de la cutícula intacta (Reis *et al*, 2005). El hongo *Botrytis* sp., no tiene únicamente la capacidad de crecer como saprófito sobre tejidos de plantas muertas o en descomposición, también puede ser un patógeno atacando flores, tallos, bulbos y semillas (Chase, 2000). El moho gris crece principalmente sobre frutos maduros después de la cosecha, pero también sobre flores y frutos maduros e inmaduros antes de la cosecha (Helbing, 2001).

La enfermedad del moho gris es encontrada primariamente en climas templados, pero puede ocurrir dondequiera que se produce un cultivo susceptible (Chase, 2000). La susceptibilidad al moho gris de los órganos de las plantas, particularmente frutos y flores, incrementa con la edad o maduración. Los factores que aceleran la senescencia, como el etileno, tiende a incrementar la susceptibilidad, mientras que los tratamientos que disminuyen la senescencia, como el calcio, citoquinina y giberelina, tienden a incrementar la resistencia (Elad, 1997).

Esta enfermedad es más seria cuando las temperaturas están entre 2° y 7°C. Poca circulación de aire, humedades altas y un crecimiento lento de las plantas pueden todas contribuir en un brote del patógeno *Botrytis* sp. (Chase, 2000). La infección de los tejidos de las plantas por *Botrytis* sp. requiere la expresión coordinada de un gran conjunto de enzimas de patogenicidad que pueden degradar la capa protectora de las células de las plantas y sus defensas químicas (Manteau *et al.*, 2003).

Una vez introducido *Botrytis* sp. en los cultivos, puede sobrevivir en sustrato orgánico, hojas muertas caídas y en tejidos de plántulas como componente de la biota del filoplano, debido a que produce estructuras de latencia como los esclerocios (Molina *et al.*, 2006).

La germinación de los conidios y el crecimiento del tubo germinal de *Botrytis* sp. sobre tejidos de la planta son dos etapas importantes en el proceso de infección que pueden ser utilizadas para investigar aspectos de la susceptibilidad relativa de los tejidos a la infección por el patógeno. La germinación de los conidios puede ser influenciada por los nutrientes y químicos disponibles en el tejido hospedador; igualmente sustancias de tejidos de plantas muertas, estimulan la infección por *Botrytis* sp. (Perryman *et al.*, 2002).

2.5.2 Morfología

Botrytis sp. es un hongo fitopatógeno de amplia distribución mundial. Produce abundante micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides o esféricos,

unicelulares, hialinos o levemente coloreados. Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas. Las colonias de *Botrytis* sp. son de crecimiento moderado, blancas o grises dependiendo del medio de cultivo (Latorre & Rioja, 2002).



Figura 1. Microscopía de *Botrytis* sp. Tomado de:
www.-biol.paisley.ac.uk/bioref/fungi/Botrytis.cinerea.html

Las colonias pueden ser de tipo micelial, esclerocial o esporulante. La de tipo micelial es una colonia de crecimiento más rápido, abundante, algodonosa, y de color pardo. La de tipo esclerocial, es una colonia de crecimiento lento, micelio escaso de color blanco inicialmente y luego color gris a pardo, con abundantes esclerocios de color negro, distribuidos irregularmente en el medio (Figuroa & García, 2002). Los esclerocios se caracterizan por poseer varias capas exteriores formadas por células de paredes oscuras que dan la coloración negruzca externa del esclerocio; las capas internas están constituidas por células hialinas (Garcés de Granada, 1998).

2.5.3 Ciclo de Vida

El hongo puede hibernar como micelio, el cual vive sobre el material moribundo de la planta. Este puede también formar esclerocios, una fuerte y compacta masa de micelio, la cual se separa de la colonia y puede germinar cuando el invierno ha

pasado y crecer de nuevo. Con el nuevo crecimiento el hongo produce los conidióforos, estructuras que producen conidios. Los conidios maduros se sueltan y son transportados por el viento o por la lluvia, en condiciones adecuadas ellos pueden encontrar y atacar un nuevo hospedador. Después de establecidos, los conidios generan nuevo micelio el cual invade los tejidos, causando el colapso y la desintegración de las células, los tejidos se emblandecen y se pudren como resultado de la podredumbre gris. Con crecimiento adicional el hongo intenta la producción de conidióforos de nuevo, los cuales se quedan en el hospedador, y nuevos conidios son liberados. El ciclo continúa hasta que las condiciones climáticas y nutricionales sean desfavorables para el desarrollo de la enfermedad (www.thewinedoctor.com).

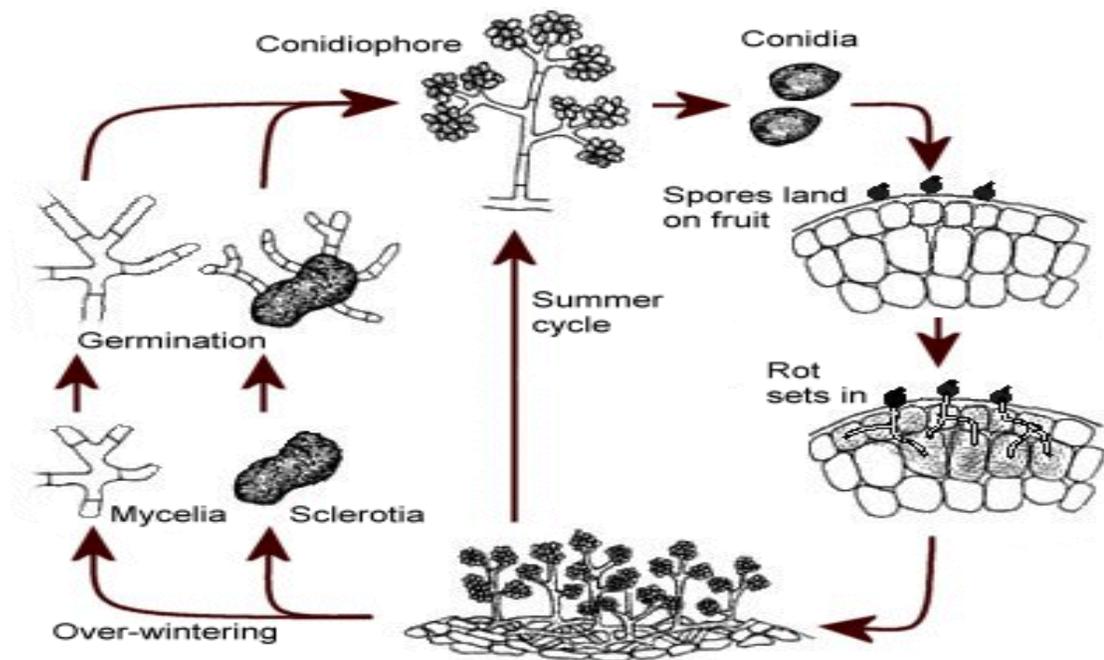


Figura 2. Ciclo de vida de *Botrytis* sp. Tomado de:
http://www.agf.gov.bc.ca/ornamentals/publications/pesticide/disease/botrytis_cinerea.pdf

2.5.4 Factores de Crecimiento para *Botrytis* sp.

El clima es un factor de gran importancia para el establecimiento y desarrollo del hongo en el tejido vegetal o sustrato. Los dos elementos que más influyen son la humedad relativa y la temperatura.

2.5.4.1 Humedad Relativa

La humedad relativa se considera como el principal factor en el desarrollo del hongo *Botrytis* sp., para su crecimiento. Necesita de alta humedad relativa, principalmente para la germinación de los conidios ya que estos germinan en un rango de 93-100% de humedad relativa (Rabón, 2001), mientras que la esporulación del hongo comienza entre 70 y 100% de humedad relativa (Eden *et al.*, 1996; Barnes & Shaw, 2002).

El contenido de agua en los tejidos de la planta, al ser mayor, aumenta la permeabilidad celular, facilitando la entrada de diversos patógenos. Por ello, la incidencia de *Botrytis* sp. puede incrementarse en épocas de lluvia, en cultivos a libre exposición o por un mal manejo de riego (Rabón, 2001).

2.5.4.2 Temperatura

Este factor es de gran importancia para el crecimiento del hongo, puesto que se logra el mayor porcentaje de germinación de los conidios, cuando la temperatura está entre 15 y 20°C (Rabón, 2001). El micelio es capaz de crecer a temperaturas cercanas a 0°C. Los esclerocios (cuerpos de resistencia) se forman cuando las temperaturas fluctúan entre 11 y 13°C y la esporulación de estos cuerpos es favorecida por temperaturas de 12 a 22°C (Lahlali *et al.*, 2006).

2.5.4.3 pH

Los conidios de *Botrytis* sp. germinan a un pH entre 3-7, encontrándose una germinación óptima a un pH de 4 (Figueroa & García, 2002).

2.5.5 Factores que predisponen a las plantas del ataque por *Botrytis* sp.

Los tejidos muertos o moribundos son fácilmente colonizados, dominando la esporulación y siendo fuente de inóculo (Chase, 2000). El incremento del agua y el intercambio gaseoso en los tejidos conducen al aumento de la permeabilidad celular, y así, predisponen los tejidos a la infección. El etileno predispone las flores y los frutos de algunas plantas al ataque por *Botrytis* sp., ya que daña las flores y facilita la infección. El contenido de carbohidratos en los tejidos y las deficiencias nutricionales de la planta juegan un papel importante en la predisposición, pues la conducen a una senescencia prematura y así, facilitan el ataque del patógeno. Las heladas, las quemaduras por el sol y el viento, la polución atmosférica, los insectos, los nemátodos y las bacterias son factores que predisponen los cultivos a la infección, debido a que estos pueden disminuir las defensas de la planta (Garcés de Granada, 1992).

2.5.6 Factores de patogenicidad de *Botrytis* sp.

Los factores de patogenicidad involucrados en la colonización del hospedero por parte del fitopatógeno incluyen la penetración de las hifas en algunos tejidos de la planta y posteriormente la degradación enzimática de las paredes celulares de ésta.

2.5.6.1 Penetración de tejidos y degradación enzimática de paredes celulares

Después de la germinación de los conidios del fitopatógeno sobre la superficie de la planta, la penetración de éste puede ser directa, o el tubo germinal conidial puede elongarse antes de la penetración y el apresorio o el colchón de la infección puede ser formado (Fernández *et al*, 2006). Sobre pétalos de rosa, por ejemplo, un apresorio es formado rápidamente después de la germinación y penetra la cutícula, o el apresorio es formado al final de la elongación del tubo germinal (Elad, 1997).

Para infectar los tejidos intactos, el hongo puede primero penetrar la cutícula, la cual provee la primera barrera a la penetración por el hongo, y las heridas y tratamientos

que alteran o disuelven la cutícula resultan en una rápida proporción de infección (Meir *et al.*, 1998).

En algunos casos las defensas físicas y químicas del hospedero pueden limitar la propagación de las primeras fases de la infección y el patógeno entra a una fase quiescente o latente en el tejido hospedero (Elmer & Reglinski, 2006).

La penetración de los tejidos del hospedero no parece estar relacionado en la proporción de germinación por *Botrytis* sp. y el desarrollo de la enfermedad está relacionado al proceso de post-penetración. Igualmente, no hay diferencias en la proporción de germinación de *Botrytis* sp. sobre pétalos de rosas de cultivos susceptibles y resistentes, pero los conidios germinados penetran la cutícula del cultivo susceptible con gran frecuencia (Lahlali *et al.*, 2006).

Después de que la hifa del hongo penetra la cutícula, ésta es separada de la pared de las células y hay degradación de las paredes celulares de la planta por enzimas hidrolíticas que facilitan la penetración y colonización de tejidos hospederos y que ayudan al crecimiento hifal (Elad, 1997).

Las enzimas que hidrolizan la pared celular causan la liberación de nutrientes de las células del hospedero, crean estrés osmótico sobre los protoplastos y finalmente causan la muerte celular. Las enzimas que degradan la pared celular en *Botrytis* sp. han sido identificadas en tejido infectados de muchas plantas y su producción puede ser inducida en cultivos que suministren sustratos apropiados. Varias enzimas han sido reportadas por estar involucradas en el proceso de patogenicidad de *Botrytis* sp., una de ellas, la cutinasa, la cual hidroliza los enlaces primarios del polímero de la cutina. En algunos estudios se encontró la cutinasa citoplasmática constitutiva en conidios no germinados de *Botrytis* sp. y se sugirió que la enzima puede jugar un papel importante en la infección temprana (Elad, 1997). Otras enzimas descritas para *Botrytis* sp. incluyen la poligalacturonasas (PGs), pectinliasas (PLs) y pectin metil esterases (PMEs) las cuales degradan la pectina. La degradación de las proteínas de la pared celular se lleva a cabo por ácido aspártico proteasas. Los fenoles son atacados por lacasas, el β -1,3-glucan por la β -1,3-glucanasa y la

celulosa por celulasas. Las fosfolipasas y lipasas degradan los fosfolípidos de las membranas (Reis *et al.*, 2005).

2.5.7 CICLO DE INFECCIÓN

Los conidios de *Botrytis* sp. pueden ser producidos sobre cualquier material vegetal y transportados a grandes distancias por corrientes de aire. Una vez que los conidios han alcanzado la superficie del hospedero se inicia el ciclo de infección que, para facilitar su descripción y estudio, puede considerarse dividido en varias fases (Figura 3):

1. La adhesión y germinación de los conidios sobre la superficie del hospedero (Benito *et al.*, 2000).
2. Su penetración en el tejido vegetal, bien a través de heridas o de aberturas naturales, bien directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración) (Benito *et al.*, 2000).
3. El establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta (Benito *et al.*, 2000).
4. En muchos casos se inicia entonces una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en las áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias (Benito *et al.*, 2000).
5. Transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su disseminación en el tejido vegetal circundante, determinando la colonización y la maceración del tejido

infectado en un breve período de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de conidios que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Benito *et al*, 2000).

Bajo condiciones favorables, el ciclo completo de infección puede ocurrir en 3 o 4 días, dependiendo del tipo de tejido atacado. Después del contacto entre el conidio y el tejido, un número de factores influencia la germinación. Una alta humedad relativa es requerida para la germinación y penetración de la epidermis (Lahlali *et al.*,2006).

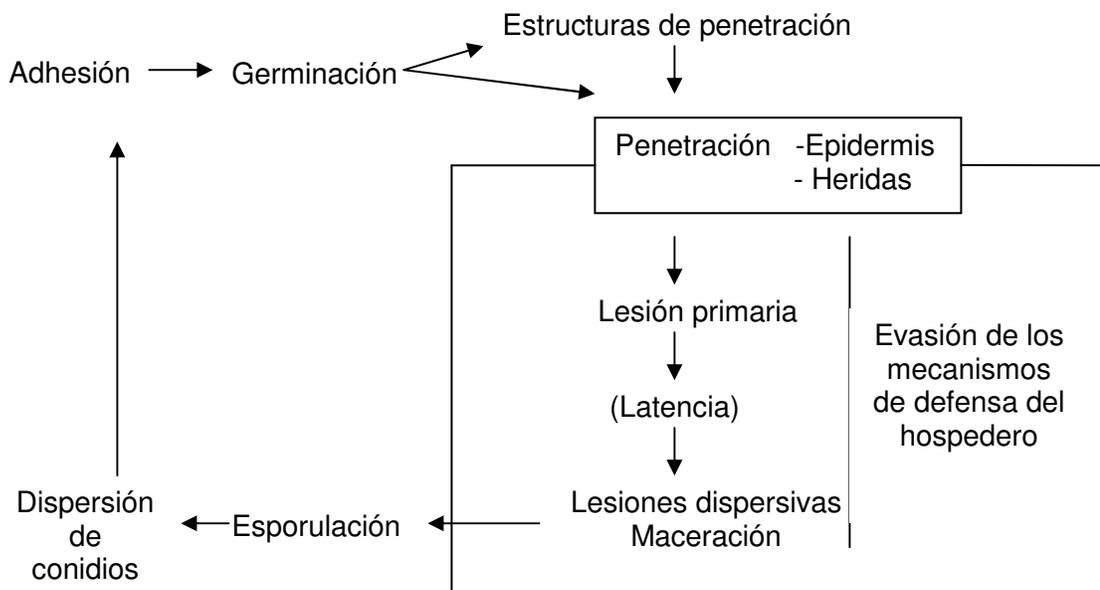


Figura 3. Ciclo de infección de *Botrytis sp.* Fuente: (Benito *et al.*, 2000).

2.5.8 SINTOMATOLOGÍA

Botrytis sp. puede atacar distintos órganos en la planta, incluyendo flores, pedicelos, hojas, yemas, frutos, bulbos, cormos, tubérculos y raíces. Así mismo, es posible que *Botrytis sp.* ataque tejidos tiernos y suaves, tales como pétalos, yemas, y brotes tiernos, debilitando el tejido, envejeciéndolo y causando su muerte (Serrano, 2006).

Hay dos clases de síntomas causados por *Botrytis* sp. infección localizada y propagación de la necrosis. Las lesiones localizadas están asociadas con la ocurrencia de factores como el bajo nivel de inóculo, ausencia de agua libre en la superficie del hospedero, ausencia de tejido altamente susceptible o senescente y falta de nutrientes exógenos. Si uno o más de estos factores no limitan la infección, la lesión causada por *Botrytis* sp. se propaga. Además, los síntomas típicos de la enfermedad del moho gris son evidentes (Elad, 1997).

Inicialmente, los síntomas aparecen sobre pétalos infectados con lesiones localizadas (Figura 4). Posteriormente, estas lesiones llegan a ser necróticas y se propagan a pétalos completos y el receptáculo (Figura 5); finalmente resulta en muerte de la flor y caída de los pétalos (Figura 6). El problema es agravado por la latencia de la infección en los pétalos, en los cuales los síntomas pueden no ser visibles en la cosecha, pero podría prevalecer en condiciones de alta humedad relativa y temperatura durante el almacenamiento y transporte (Meir *et al.*, 1998).

Uno de los síntomas más serios de la enfermedad que produce *Botrytis* sp. es la putrefacción del tallo o de la cabeza de la rosa. El hongo forma rápidamente conidios en el tejido dañado, produciendo una apariencia gris vellosa (Chase, 2000).

La infección por el hongo fitopatógeno resulta en un cambio de la fisiología de la planta y alteraciones mecánicas y bioquímicas. Además, la infección causa reducción sobre el contenido de clorofila y proporción de fotosíntesis que resulta en síntomas visibles de la enfermedad (Elad, 1997).



Figura 4. Lesiones localizadas de *Botrytis* sp. en pétalos.



Figura 5. Necrosis de pétalos.



Figura 6. Muerte de la flor y caída de los pétalos.

2.5.9 CONTROL DEL MOHO GRIS

Las enfermedades causadas por *Botrytis* sp. se consideran de gran importancia económica, porque causan daños en el campo, durante el transporte y en el almacenamiento. La enfermedad del moho gris es de difícil control, por lo que deben utilizarse diversas medidas para el manejo de la enfermedad tales como, el control biológico, la aplicación de fungicidas protectores y sistémicos, el manejo en los tratamientos de postcosecha y en las técnicas de almacenamiento, la realización oportuna de las prácticas culturales y la utilización de cultivos resistentes. Los avances y la integración de algunas de esas medidas han llevado a mejorar en gran parte el control de la enfermedad (Clavijo y Cruz, 1997).

2.5.9.1 Control Cultural

Un acertado programa de control de *Botrytis* sp. debe considerar medidas de control cultural. Las medidas a tomar se basan en la prevención de la enfermedad, reduciendo o eliminando, cuando sea posible, las fuentes de inóculo, diversas formas de sobrevivencia del hongo y la predisposición de las plantas al ataque por el patógeno (Garcés de Granada, 1992). Algunos de los aspectos que se deben tener en cuenta incluyen:

Evitar las siembras demasiado densas en condiciones de baja luminosidad, realizar desinfección de semillas, retirar los restos de cultivos y plantas afectadas por la enfermedad tanto del interior del invernadero como de sus alrededores (Chase, 2000). Reducir la humedad relativa por debajo del 90%, lo cual se puede lograr a través del espacio entre las plantas, el cual mejora la circulación del aire; la calefacción del invernadero, la cual ayuda a minimizar la condensación sobre las plantas así como la caída de la temperatura, hacer podas y deshojados a ras del tallo para no dejar tocones que sirvan al desarrollo del parásito. (Garcés de Granada, 1992).

2.5.9.2 Control Químico

El control químico permanece como el principal camino contra la lucha de este hongo fitopatógeno, a pesar del hecho de que la resistencia a los fungicidas se ha desarrollado, como con los benzimidazoles y dicarboximidias (Dardari *et al*, 2004). Actualmente, el control de esta enfermedad se obtiene integrando medidas de saneamiento con el uso de tratamientos fungicidas en los momentos más críticos para la infección (Latorre *et al.*, 2001).

La aplicación de fungicidas durante la floración es el método de control más importante contra *Botrytis* sp. en diversos cultivos (Helbing, 2001), debido a que en estudios recientes se ha encontrado que la fase de floración es una de las más susceptibles al ataque con *Botrytis* sp. Por lo tanto, los estados más susceptibles pueden ser usados como guía de decisión acerca de la aplicación de fungicidas para prevenir el desarrollo de la enfermedad y pérdidas de cosechas (Perryman *et al.*, 2002).

Para el control químico de *Botrytis* sp. existen diversos tipos de fungicidas tales como: fungicidas multisitio, que actúan a nivel de la respiración celular del hongo, inhibidores de la síntesis de microtubulos como los benzimidazoles y N-fenilcarbamato, inhibidores de la síntesis de lípidos como las dicarboximidias, inhibidores de la síntesis de proteínas y aminoácidos como las anilino pirimidinas,

inhibidores de la síntesis del esteroles en la membrana celular y algunos otros mecanismos denominados de última generación, como los inhibidores de la síntesis de metionina (Rosslénbroich & Stuebler, 2000).

Los fungicidas son usualmente valiosos pero en su mayor parte se utilizan como preventivos. De este modo, un programa regular de aspersiones con productos preventivos es casi siempre la mejor estrategia de control (Montaño, 2005). Numerosos fungicidas preventivos, pertenecientes a diversos grupos químicos, se han utilizado en el control de *Botrytis* sp. en flores entre los cuales se destacan clorotalonil, dicloran, maneb, mancozeb, thiram, captan, entre otros (Clavijo y Cruz, 1997).

2.5.9.3 Control Biológico

El control biológico es una alternativa para disminuir el uso de fungicidas químicos, la cual consiste en el uso de procesos biológicos para reducir las pérdidas en los cultivos (Santos *et al.*, 2004). El éxito de la implementación de métodos biosupresivos para el control de *Botrytis* sp. es dependiente de un íntimo conocimiento de la ecología y epidemiología de la enfermedad (Elmer & Reglinski, 2006).

Muchos microorganismos no patogénicos reprimen el crecimiento de fitopatógenos a través de la competencia de nutrientes, la producción de metabolitos inhibitorios y/o por parasitismo, por lo tanto limitan naturalmente las enfermedades de las plantas en el cultivo. Numerosos estudios han descrito el aislamiento de microorganismos antagonistas con una visión de explotar su potencial para la supresión biológica de las enfermedades (Elmer & Reglinski, 2006).

El control biológico usando microorganismos antagonistas naturales ha sido extensivamente estudiado, y algunos hongos y bacterias han sido demostrados como efectivos contra el moho gris.

Trichoderma spp. es entre los agentes biocontroladores el más ampliamente estudiado contra patógenos de plantas. Se han empleado diversas cepas de *Trichoderma* como agentes de control biológico contra *Botrytis* sp. en varios cultivos. Aunque *Trichoderma* es un hongo que habita en el suelo, y por lo tanto no está adaptado naturalmente a las partes aéreas, algunas cepas de *Trichoderma* se comercializan con éxito para este uso en cultivos como la fresa, el tomate, el pepino y la vid. Los mecanismos mediante los cuales *Trichoderma* controla a *Botrytis* sp. parecen ser la competencia y el antagonismo. La competencia entre *Botrytis* sp. y *Trichoderma* puede suceder, por ejemplo, durante la colonización de los restos florales. Además de fenómenos de competencia, se ha observado en la zona de contacto entre los dos hongos, en los márgenes entre áreas necróticas y sanas, las estructuras de superenrollamiento y penetración típicas del micoparasitismo que desarrolla *Trichoderma*, previniendo la dispersión del patógeno (Harman *et al.*, 1996).

Varias cepas del género *Bacillus* han recibido mucha atención como agentes de biocontrol por sus ventajas sobre agentes biológicos de control como las bacterias Gram negativas y los hongos. Las especies de *Bacillus* han sido reportadas por ser efectivas en el biocontrol de múltiples enfermedades de plantas debido a su producción de varios antibióticos de amplio espectro y su habilidad de formar endosporas. Varias cepas de *Bacillus* han sido desarrolladas como biofungicidas comerciales. El éxito de la escala de producción de los organismos y la formulación efectiva es esencial para el desarrollo estable y económico de biofungicidas (Lee *et al.*, 2006).

Otro microorganismo reportado como antagonista de *Botrytis* sp. es *Burkholderia cepacia*, la cual se destaca por su alta frecuencia de aparición en la rizosfera. Entre sus mecanismos de acción se encuentran el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la producción de reguladores del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos, dado fundamentalmente por la producción de sideróforos, la antibiosis y la inducción de resistencia a la planta (Hernandez *et al.*, 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de flores para exportación es una de las principales actividades en la economía colombiana, generando importantes fuentes de divisas y mejoramiento tecnológico en las áreas de establecimiento de los cultivos. A nivel social, el sector floricultor colombiano genera actualmente alrededor de 160.000 empleos.

El sector floricultor se ve afectado por diversas enfermedades como el moho gris causado por el patógeno *Botrytis* sp. Esta es una enfermedad ampliamente distribuida en rosas de invernadero y muchos otros cultivos de flores. Dado que los pétalos de flores infectados con *Botrytis* sp. reducen significativamente el valor de rosas de corte, es importante establecer un buen control preventivo de la enfermedad.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, en los cultivos se han utilizado diferentes estrategias para el control de este hongo fitopatógeno, utilizando diversos productos químicos y biológicos. Sin embargo, el uso de estos productos en muchas ocasiones no alcanza los niveles de protección esperados, causando grandes pérdidas. Por lo tanto, es importante asegurar que los productos son efectivos antes de su aplicación en campo.

Debido a la importancia de los cultivos de flores en el país y a la magnitud de las pérdidas causadas en éstos, se hace necesario establecer una metodología para la evaluación de eficacia de Productos para la Protección de Cultivo (PPC) preventivos para el control de este fitopatógeno en condiciones semicontroladas, teniendo en cuenta diferentes factores como la concentración de inóculo del fitopatógeno, la metodología de aplicación del inóculo y de los PPC y el método de lectura de los signos de la enfermedad, garantizando la estabilidad y reproducibilidad de la metodología, permitiendo de esta manera determinar el porcentaje de control de los productos preventivos utilizados en los diferentes cultivos. De esta forma se asegura que los PPC evaluados son capaces de controlar la incidencia del fitopatógeno,

disminuyendo la presencia de éste, en niveles que no afecten la calidad de las rosas tanto en la cosecha como en su distribución y almacenamiento.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar una metodología para la evaluación de eficacia de Productos para la Protección de Cultivo (PPC) preventivos para el control de *Botrytis* sp. en rosa bajo condiciones semicontroladas.

Objetivos Específicos

1. Estandarizar la concentración de inóculo de *Botrytis* sp. que alcance un porcentaje de afección superior al 90% y definir el tiempo de lectura de los tratamientos.
2. Definir la escala de lectura de *Botrytis* sp para los tratamientos en pétalos de rosa.
3. Determinar la estabilidad de la metodología por medio de la evaluación de Productos para la Protección de Cultivo (PPC) preventivos para el control de *Botrytis* sp.

5. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en la empresa AMERICAFLOR Ltda, en el laboratorio de Sanidad Vegetal, situado en el municipio de Cajicá, Cundinamarca.

5.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE *Botrytis* sp.

5.1.1 Recolección del material vegetal para el aislamiento del patógeno

Se recolectaron rosas provenientes de la finca El Rosal ubicada en el municipio del Rosal Cundinamarca, que presentaban sintomatología típica de la infección de *Botrytis* sp.; éstas fueron transportadas al laboratorio para su utilización en el aislamiento del fitopatógeno.

5.1.2 Aislamiento de *Botrytis* sp. a partir de material vegetal

Las rosas recolectadas se colocaron en cámaras húmedas que consistían en cajas plásticas estériles con una servilleta humedecida en la parte inferior del recipiente y una malla plástica, evitando el contacto del material vegetal con la servilleta. Las rosas se dejaron en las cámaras húmedas hasta que se observó esporulación sobre los pétalos. Posteriormente, se tomó parte del micelio, se sembró en agar PDA y se incubó a 20°C durante 5 días.

5.1.3 Purificación de la cepa de *Botrytis* sp.

A partir de los aislamientos obtenidos, se realizaron pases a agar PDA, para obtener una cepa pura, las cajas se incubaron a 20°C durante 5 días.

5.1.4 Reactivación de la cepa

Durante la realización del trabajo la cepa fue conservada por medio de reactivaciones semanales realizadas en material vegetal mediante aspersiones de

Botrytis sp. a tallos florales colocándolos en cámaras húmedas y realizando pases a agar PDA cuando se observaba esporulación e incubando a 20°C durante 5 días.

5.2. AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE *Botrytis* sp. Y OBTENCIÓN DE LA ESCALA DE LECTURA DEL PORCENTAJE DE AFECCIÓN EN PÉTALOS DE ROSA

5.2.1 Preparación del material vegetal

Para la obtención de la escala de lectura se utilizaron rosas variedad Virginia, a las cuales se les realizó remoción de los dos primeros pares de pétalos externos. Posteriormente, se tomaron dos pares de pétalos por tallo floral ubicando dos pétalos por cámara húmeda.

5.2.2 Preparación del inóculo de *Botrytis* sp.

La preparación de los inoculos se realizó a partir de los aislamientos obtenidos en la purificación de la cepa. Se tomó una caja con agar PDA y el hongo con crecimiento de 5 días aproximadamente y con ayuda de un bisturí estéril se realizó el desprendimiento del micelio y se depositó en un mortero estéril. Posteriormente, se adicionó 10 mililitros de agua clorada estéril hasta obtener una suspensión, a la cual se le realizó recuento de conidios en cámara de Neubauer. De acuerdo a este resultado se ajustó la concentración a 6×10^4 conidios/ml, 1×10^5 conidios/ml y 1×10^6 conidios/ml. A estas suspensiones se les adicionó Bioplant como coadyuvante.

5.2.3 Aspersión de los pétalos de rosa

Se tomaron 60 pétalos de rosa, de los cuales 20 se asperjaron con un inóculo de 6×10^4 conidios/ml, 20 con un inóculo de 1×10^5 conidios/ml y 20 con un inóculo de 1×10^6 conidios/ml; las aspersiones se realizaron con ayuda de un aerógrafo. Se incubaron a 20°C durante el día y a temperatura ambiente durante la noche.

5.2.4 Lectura de pétalos de rosa y obtención de la escala de lectura

Pasadas 24, 48, 72 y 96 horas se realizaron lecturas de los pétalos tomando fotografías que se ajustaran a la escala de lectura teórica planteada antes de la realización de este ensayo, la cual se muestra a continuación:

Grado 0: pétalo sin síntoma de afección con *Botrytis* sp.

Grado 1: 5-15% del pétalo con síntoma de afección con *Botrytis* sp.

Grado 2: 20-40% del pétalo con síntoma de afección con *Botrytis* sp.

Grado 3: 50-70% del pétalo con síntoma de afección con *Botrytis* sp.

Grado 4: 80-100% del pétalo con síntoma de afección con *Botrytis* sp.

5.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE *Botrytis* sp. EN TALLOS FLORALES

Para estandarizar la concentración de inóculo de *Botrytis* sp. que sería utilizada posteriormente en la evaluación de eficacia de los productos para la protección del cultivo (PPC), se evaluaron 3 concentraciones diferentes de inóculo de *Botrytis* sp. (6×10^4 conidios/ml, 1×10^5 conidios/ml, 1×10^6 conidios/ml), cada una considerada como un tratamiento.

5.3.1 Preparación del Material Vegetal

Se utilizaron rosas variedad Virginia, la cual es considerada como una variedad altamente susceptible a *Botrytis* sp.; estas rosas no fueron sometidas al proceso de inmersión de fungicidas establecido antes del ingreso a la postcosecha. Para el montaje del ensayo se realizó el despétale de los cuatro primeros pétalos (figura 7), corte de hojas, espinas y tallos (figuras 8 y 9), obteniendo finalmente flores con 30cm de altura. El despétale se realizó con el fin de evitar las lesiones o maltratos que pueden traer los pétalos externos, lo cual alteraría los resultados del ensayo.



Figura 7. Despétale de las rosas



Figura 8. Corte de hojas y espinas

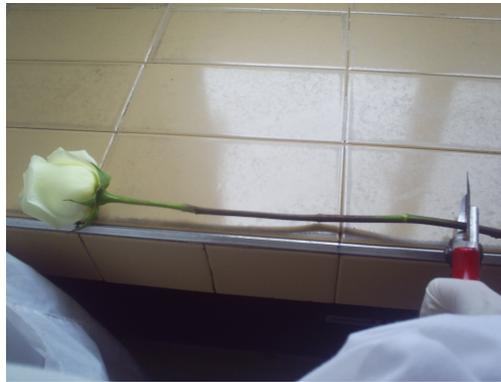


Figura 9. Corte de tallos de las rosas

5.3.2 Preparación de inóculos

A partir de los aislamientos obtenidos de la purificación de la cepa, se realizó la preparación de las tres concentraciones de inóculo de *Botrytis* sp. Los inóculos se prepararon como se realizaron en el ensayo de obtención de la escala de lectura.

5.3.3 Preparación de cámaras húmedas

Se tomaron canastas plásticas con una dimensión de 40 cm de ancho, 60 cm de largo y 40 cm de profundidad, las cuales se lavaron y desinfectaron previamente para cada ensayo con alcohol al 70%. Una vez desinfectadas se les adicionó 6 litros de agua clorada estéril, lo que permitió la hidratación de las rosas dentro de la

cámara; adicionalmente, se incorporó un colchón de icopor, ajustable a las paredes de la canasta, que contenía orificios permitiendo una adecuada distribución de las flores, proporcionando de esta manera soporte y evitando el contacto entre las mismas (figura 10).

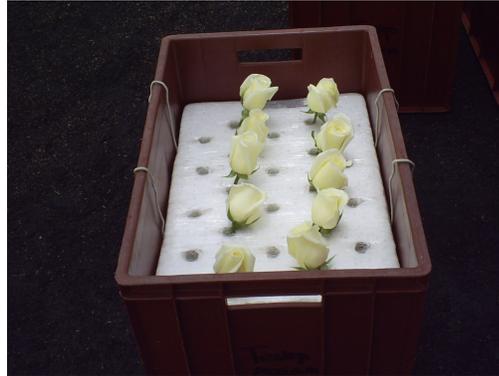


Figura 10. Cámara húmeda

Una vez las rosas se distribuyeron en el colchón (10 rosas por cámara húmeda), cada canasta se cubría con un plástico oscuro ajustándolo con una banda de caucho, llevando posteriormente las canastas a un cubículo de plástico dentro de un invernadero (figura 11). El invernadero contaba con un ventilador de agua, para mantener la humedad del ambiente y favorecer de esta manera la esporulación del hongo; adicionalmente, se contaba con un sensor de temperatura y humedad relativa para monitorear las condiciones climáticas dentro del invernadero.



Figura 11. Cubículos plásticos

5.3.4 Aspersión de los tallos florales

Para este ensayo se tomaron 30 rosas por tratamiento, asperjando un volumen de 5 ml de inóculo, a una distancia de 30 cm y dos pases por tallo floral. Adicionalmente se tomaron 30 rosas como testigos absolutos, las cuales fueron asperjadas con agua destilada.

5.3.5 Determinación del Grado de Severidad de los pétalos de rosa

Para determinar el porcentaje de afección de los pétalos, se realizó una lectura destructiva, observando la aparición de los signos de la enfermedad y determinando el porcentaje de afección de 10 pétalos por tallo floral, utilizando la escala de lectura establecida anteriormente. Las lecturas se realizaron a las 48, 72 y 96 horas, tomando por día de lectura 10 tallos florales de cada tratamiento.

5.4 Diseño Experimental

Se utilizó un Diseño de Bloques completamente Aleatorizado con submuestreo; realizando tres replicas por tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron utilizando un análisis de varianza ANOVA y la prueba múltiple de Duncan, con un nivel de significancia del 5%.

De acuerdo a los resultados obtenidos se escogió la concentración de inóculo de *Botrytis* sp. y la hora de lectura que alcanzaron un 90% de afección con el hongo fitopatógeno. Estos parámetros se utilizaron para evaluar la metodología utilizando diferentes productos para la protección del cultivo (PPC) con modo de acción preventivo.

5.5 EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZANDO DIFERENTES PRODUCTOS PARA LA PROTECCIÓN DEL CULTIVO (PPC) PREVENTIVOS PARA EL CONTROL DE *Botrytis* sp.

La evaluación de la metodología se hizo utilizando siete productos preventivos, tres productos químicos: Clorotalonil, Captan y Mancozeb, dos productos biológicos: *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum*, y un producto biorracional, cada uno considerado como un tratamiento. Adicionalmente se tomó el producto Procloraz como testigo comercial.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en la evaluación de la metodología.

Tratamientos	Dosis del Producto	Modo de Acción
T1 - Clorotalonil + <i>Botrytis</i>	1.5 cc/L	Preventivo
T2 - Captan+ <i>Botrytis</i>	1.2 g/L	Preventivo
T3 - Mancozeb + <i>Botrytis</i>	2 cc/L	Preventivo
T4 - <i>Burkholderia cepacia</i> + <i>Botrytis</i>	10 cc/L	Biocontrolador
T5 - <i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Botrytis</i>	0.9 cc/L	Biocontrolador
T6 - Biorracional + <i>Botrytis</i>	3 cc/ L	Biorracional
T7 - Testigo Comercial - Procloraz + <i>Botrytis</i>	0.6 cc/L	Curativo
T8 - Testigo Relativo - Agua destilada + <i>Botrytis</i>	-	-
T9 - Testigo Absoluto - Agua Destilada	-	-

Para la realización de los ensayos el material vegetal se preparó de la misma forma que en la estandarización de la concentración del inóculo de *Botrytis* sp. Posteriormente, las rosas del tratamiento y del testigo comercial se asperjaron con el PPC, las rosas del testigo relativo y del testigo absoluto se asperjaron con agua destilada estéril. Una vez las rosas asperjadas, fueron distribuidas en las cámaras húmedas, las cuales fueron llevadas a los cubículos de plástico dentro del invernadero. Pasadas 24 horas, el tratamiento, testigo comercial y testigo relativo se asperjaron con un inóculo de *Botrytis* sp. de 1×10^6 conidios/ml. Todas las aspersiones se realizaron utilizando un aerógrafo, aplicando un volumen de 5 ml, a una distancia de 30 cm y dos pases por tallo floral. Las cámaras húmedas fueron nuevamente incubadas en los cubículos del invernadero.

Debido a que la escala de lectura del porcentaje de afección obtenida anteriormente, no permitía tener un dato acerca de la esporulación, se realizó un ajuste a esta escala en donde se relacionaron dos signos de la enfermedad (afección y esporulación) obteniendo la siguiente escala:

- GRADO 0:** 0%
- GRADO 1:** <25% de Afección
- GRADO 2:** 25-50% de Afección
- GRADO 3:** 50-100% de Afección
- GRADO 4:** <50% de Esporulación
- GRADO 5:** 50-100% de Esporulación

Tabla 2. Escala de lectura de afección y esporulación

Grado 0	Grado 1
0%	<25% de Afección
 <p style="text-align: right; color: yellow;">2007/04/27</p>	 <p style="text-align: right; color: yellow;">2007/04/30</p>
Grado 2	Grado 3
25-50% de Afección	50-100% de Afección
 <p style="text-align: right; color: yellow;">2007/05/09</p>	 <p style="text-align: right; color: yellow;">2007/05/10</p>

Grado 4	Grado 5
<50% de Esporulaci3n	50-100% de Esporulaci3n
	

De esta manera, despu3s de 96 horas de la aplicaci3n del in3culo, se realiz3 la lectura de los p3talos, observando la aparici3n de los signos de la enfermedad (afecci3n y esporulaci3n) de 10 p3talos por tallo floral. Adicionalmente, se determin3 el porcentaje de control de los PPC, utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ CONTROL} = \frac{\text{No. Total de p3talos en Grados 4-5 del Testigo Relativo} - \text{No. Total de p3talos en Grados 4-5 del Tratamiento}}{\text{No. Total de p3talos en Grados 4-5 del Testigo Relativo}} \times 100$$

Esta f3rmula fue obtenida del Laboratorio de Sanidad Vegetal, la cual est3 establecida para la lectura de evaluaciones de eficacia de PPC.

5.6 Dise1o Experimental

La evaluaci3n de los PPC se realiz3 utilizando un producto por semana y realizando tres repeticiones. Para cada tratamiento se utilizaron 30 rosas (10 rosas por cada repetic3n), 10 rosas como testigo absoluto, 10 rosas como testigo relativo y 10 rosas para el testigo comercial. Los resultados fueron analizados utilizando la prueba no param3trica de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaci3n m3ltiple de Tukey.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE *Botrytis* sp. Y OBTENCIÓN DE LA ESCALA DE LECTURA DEL PORCENTAJE DE AFECCIÓN EN PÉTALOS DE ROSA

Para la selección de la concentración de inóculo de *Botrytis* sp. que sería utilizada en la evaluación de eficacia de los Productos para la Protección del Cultivo (PPC), se evaluaron tres concentraciones diferentes de inóculo. Aunque en la literatura se ha reportado la concentración 1×10^5 conidios/ml como la más efectiva para la realización de evaluaciones tanto *in vivo* como *in vitro* (Sansone *et al*, 2005), se decidió realizar esta evaluación debido a que numerosos estudios han demostrado que *Botrytis* sp. es una especie fúngica altamente variable (Cotoras & Silva, 2005), tanto en los diferentes cultivos como en las diferentes especies de rosa; esta variación puede verse reflejada en crecimiento, esporulación y capacidad de infección de la cepa.

Al realizar la lectura de los pétalos inoculados con las diferentes concentraciones de *Botrytis* sp. en las diferentes horas de lectura (24, 48,72 y 96 horas), no se logró observar un porcentaje de afección igual o superior al 90% con ninguna concentración, a pesar de que las condiciones dadas de temperatura y humedad relativa eran las apropiadas para el desarrollo del fitopatógeno; igualmente, no se observó una buena condensación en las cajas de policarbonato. Según Latorre y Rioja, 2002, en condiciones con alta humedad relativa (>95%), ocurren condensaciones producto de la evapotranspiración de la planta, suficiente para iniciar la germinación de los conidios e igualmente infectar el hospedero, sin embargo, la ausencia de germinación en un ambiente sin presencia de condensación se podría atribuir a la falta de nutrientes exógenos, como exudados azucarados o polen, factores que también favorecen la germinación.

Para estandarizar la concentración de inóculo, se decidió realizar la evaluación en tallos florales, proporcionando condiciones que se asemejaran a las que se presentan en campo, utilizando un invernadero, en donde se monitoreó diariamente

la temperatura y la humedad relativa asegurando que estuvieran en el rango óptimo para el desarrollo de la enfermedad del moho gris.

Aunque no se logró estandarizar el inóculo con este ensayo, se obtuvo la escala de lectura del porcentaje de afección, la cual se utilizó para la evaluación posterior (Anexo H).

6.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE *Botrytis* sp. Y LA HORA DE LECTURA EN TALLOS FLORALES

Para determinar la diferencia del efecto de los tres tratamientos (6×10^4 conidios/ml, 1×10^5 conidios/ml, 1×10^6 conidios/ml), sobre el porcentaje de afección del hongo fitopatógeno en los pétalos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) (Anexo B). Este análisis indicó que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos, con un nivel de significancia del 5%.

Con el fin de establecer con cual de las tres concentraciones de inóculo y hora de lectura se obtenía un mayor porcentaje de afección, se realizó una prueba múltiple de Duncan, con un nivel de significancia del 5% (Anexo C). La tabla 3 presenta los valores de las medias de cada uno de los tres tratamientos, observándose diferencias estadísticamente significativas entre éstas, siendo la media del tratamiento 3 la mayor, por lo tanto con la concentración 1×10^6 conidios/ml, se obtiene el mayor porcentaje de afección sobre los pétalos.

Tabla 3. Prueba del rango múltiple de Duncan para la afección de pétalos con los diferentes tratamientos,

Tratamiento	Media	Numero de observaciones
1	34.7167 C	900
2	43.8667 B	900
3	67.7556 A	900

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

La tabla 4 presenta los valores de las medias de cada una de las tres horas de lectura, observándose diferencias estadísticamente significativas entre éstas (Anexo D), siendo la media de las 96 horas la mayor, esto quiere decir que el porcentaje de afección con esta hora de lectura será mayor que con las demás.

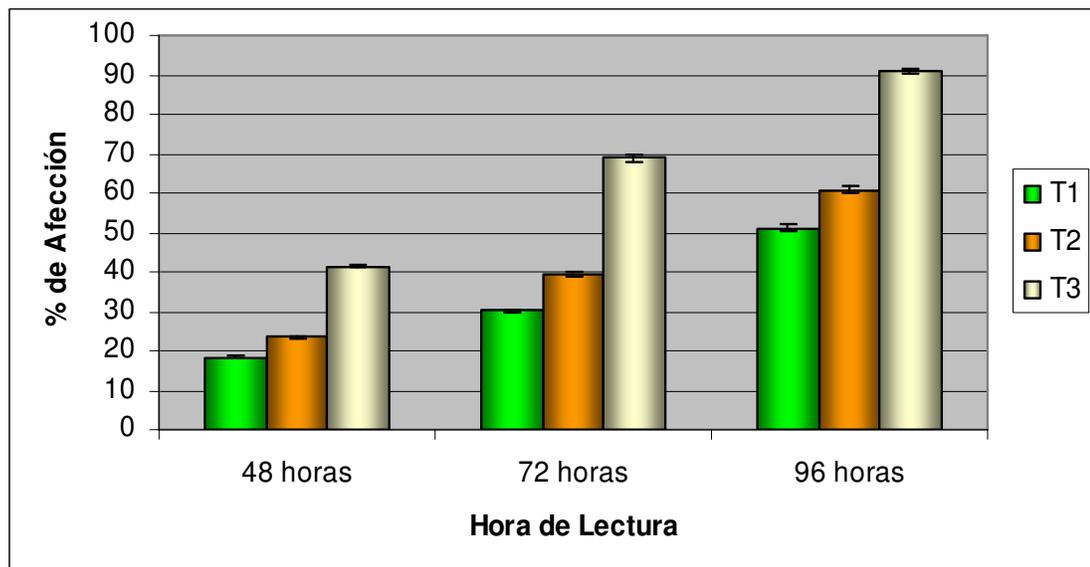
Tabla 4. Prueba del rango múltiple de Duncan para el porcentaje de afección con las diferentes horas de lectura,

Hora de lectura	Media	Numero de observaciones
48	28.6333 C	900
72	47.5722 B	900
96	70.1333 A	900

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

En la figura 12 se puede observar que con la concentración de 1×10^6 conidios/ml y a las 96 horas, se obtuvo el mayor porcentaje de afección (91%). Igualmente, se puede determinar que la variación entre las tres replicas realizadas por tratamiento fue mínima, como se puede observar con las barras de error.

Figura 12. Porcentaje de Afección con los diferentes inóculos de *Botrytis* sp. y horas de lectura en pétalos de rosa



T1: representa la concentración de inóculo 6×10^4 conidios/ml; **T2:** concentración de inóculo 1×10^5 conidios/ml; **T3:** concentración de inóculo 1×10^6 conidios/ml.

La concentración estandarizada en esta evaluación fue la misma reportada por Utkhede y colaboradores en el 2001, en donde se realizó un ensayo utilizando un inóculo de 1×10^6 conidios/ml, con el cual se logró un buen desarrollo de la enfermedad sobre plantas de tomate. Esta evaluación preliminar fue de gran importancia debido a que permitió determinar la patogenicidad de la cepa antes de su uso en las evaluaciones de eficacia.

Se tiene conocimiento, que en la Sabana de Bogotá, *Botrytis* sp. se desarrolla con facilidad, pues las temperaturas nocturnas descienden fácilmente hasta los 5°C y se registran humedades relativas del orden del 95% o mayores. En la mañana, al subir la temperatura de la atmósfera, y por tanto del invernadero, la diferencia de temperaturas entre el aire y la planta, provocan una condensación de agua en la superficie de los tejidos (Garcés de Granada, 1998), que favorece la penetración del fitopatógeno. Durante las evaluaciones se observó una buena condensación dentro de las cámaras húmedas y el plástico que las cubría; así mismo, con el monitoreo diario de las condiciones climáticas del invernadero se obtuvieron temperaturas con un rango entre 7 y 23°C y una humedad relativa del 96%. Estas condiciones fueron óptimas para el desarrollo de la enfermedad, lo cual se evidenció durante la lectura realizada a los pétalos, donde se observaron manchas foliares, las cuales son síntomas típicos de la enfermedad del moho gris (Montaño, 2005). Las lesiones inicialmente fueron pequeñas y de color amarillento, posteriormente se extendieron y se tornaron de color canela hasta cubrir la totalidad del área foliar; éstas mismas lesiones fueron observadas por Serrano, 2006 con *Botrytis* sp. en pétalos de rosa, claveles y gerberas.

Los síntomas de la enfermedad fueron progresando a través del tiempo, observándose a las 96 horas el mayor porcentaje de afección, esto se debe a que después de 20 a 90 horas tras el ingreso del fitopatógeno, ocurre el establecimiento dentro de los tejidos, se produce una nueva generación de conidios que se diseminan y hay crecimiento micelial abundante (Serrano, 2006).

6.3 EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZANDO DIFERENTES PRODUCTOS PARA LA PROTECCION DEL CULTIVO (PPC) PREVENTIVOS PARA EL CONTROL DE *Botrytis* sp.

Los fungicidas preventivos, constituyen una parte importante de todo un programa de manejo racional de la enfermedad (Clavijo y Cruz, 1997). Estos son aplicados foliarmente y su actividad se da en la superficie de los tejidos sin penetrar en ellos, o haciéndolo, pero con muy poca traslocación; generalmente inhiben la acción de las enzimas sulfúricas del hongo y alteran su respiración, impidiendo la germinación de los conidios y el desarrollo del micelio (Jiménez, 2005).

Al realizar una evaluación de eficacia de fungicidas preventivos, es importante tener en cuenta en que fase del ciclo de vida del fitopatógeno actúa, por lo tanto se decidió replantear la escala de lectura establecida al inicio de la investigación, debido a que en ésta solo se consideraba la afección del fitopatógeno sobre los pétalos y no se tenía en cuenta la esporulación sobre éstos, lo cual es un factor de gran importancia ya que si un producto preventivo logra inhibir esta etapa de desarrollo puede ser combinado con un producto curativo que disminuya la afección y de esta manera la pérdida total del material vegetal.

Para comparar el número total de pétalos afectados de las tres repeticiones de cada uno de los tratamientos en los diferentes grados de severidad (tabla 5), se realizó una prueba de comparación múltiple de Tukey (Anexo E), la cual indicó que el Captan tuvo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás productos, lo cual indica que el Captan tuvo el mejor comportamiento debido a que la mayoría de los pétalos se encuentran dentro de los grados de afección (1,2,3) y solamente 27 pétalos de los 300 evaluados, se encuentran dentro del grado 4, esto se pudo evidenciar al determinar el porcentaje de control con la fórmula establecida, y en donde al observar la figura 13, se evidencia que el Captan tuvo el mejor porcentaje de control de la enfermedad con respecto a los demás PPC evaluados. El mecanismo de acción de este fungicida está relacionado con la inhibición de la respiración celular del patógeno. Además, por ser un fungicida multisitio, es muy adecuado para entrar dentro de un programa de manejo integrado

de enfermedades (González, 1977), tanto en rotación como en mezcla, para evitar o retardar el desarrollo de resistencia con otros fungicidas.

Tabla 5. Prueba de comparación múltiple de Tukey para el número total de pétalos afectados en los diferentes grados de severidad de los seis tratamientos.

Tratamiento	Grado de Severidad				
	1	2	3	4	5
Clorotalonil b	0	79	178	43	0
Mancozeb b	11	138	42	107	2
Captan a	48	134	91	27	0
<i>Burkholderia cepacia</i> c	0	49	134	117	0
<i>Trichoderma harzianum</i> d	0	0	162	138	0
Biorracional cd	0	0	194	106	0

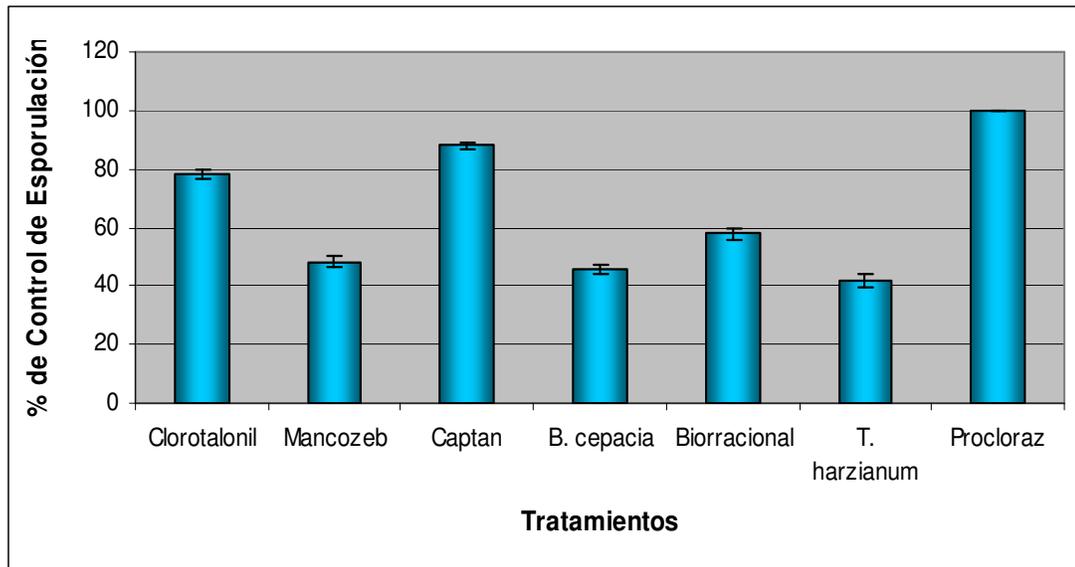
Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes.

Al comparar el Clorotalonil y el Mancozeb, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos, sin embargo al comparar los grados de severidad 4 y 5 de estos dos tratamientos se puede observar que el Mancozeb tuvo mayor número de pétalos entre estos dos grados que el Clorotalonil; esto explica porque al determinar el porcentaje de control de estos tratamientos, el Clorotalonil obtuvo un porcentaje de control de 78.2% mientras que el Mancozeb de 48.3% como se observa en la figura 13. Esto demuestra que al realizar la lectura de los pétalos, es importante tener en cuenta no sólo la afección sino también la esporulación y que estos dos criterios son claves al momento de seleccionar entre diferentes productos para su aplicación en campo.

Con respecto al producto biorracional no existen diferencias estadísticamente significativas entre éste y los productos biológicos *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum*. Al comparar *Burkholderia cepacia* y el producto biorracional se puede observar que aunque *B. cepacia* tuvo pétalos en grado 2, el producto biorracional tuvo un mejor porcentaje de control debido a que tuvo menos pétalos en grado 4 que *B. cepacia*, lo cual se puede evidenciar en la Tabla 5. Entre *T. harzianum* y el producto biorracional no se presentaron diferencias entre los grados de severidad obtenidos, sin embargo, al observar la figura 13, se puede demostrar que existió un mejor porcentaje de control de 57.9% con el biorracional

que con *T. harzianum* con el cual se obtuvo un 41.76%. El porcentaje de control obtenido con el producto biorracional fue mejor, debido a que es un fungicida orgánico que actúa induciendo la resistencia sistémica de la planta por la producción de fitoalexina, la cual es toxica para el hongo fitopatógeno y provoca la ruptura de la membrana celular de éste. Además, este producto tuvo una ventaja sobre los productos biológicos debido a que la alta población del fitopatógeno (10^6 conidios/ml) pudo retardar los mecanismos de biocontrol de *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum* entre los que se encuentran: micoparasitismo, competencia por nutrientes, por espacio, antibiosis, producción de sideroforos, entre otros (Huang & Wong, 1998; Zimand et al., 1996).

Figura 13. Porcentaje de Control de cada uno de los PPC evaluados.



Al comparar los dos productos biológicos evaluados (*Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum*) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos, obteniéndose un mejor control con *B. cepacia* que con *T. harzianum* (figura 13). Este resultado no coincide con lo obtenido por Harman y colaboradores en 1996, donde se obtuvo un porcentaje de control de *Botrytis* sp. mayor al 50% con *T. harzianum*; sin embargo, se considera que la efectividad del biocontrol por parte de *T. harzianum* depende de la dosis utilizada, las condiciones ambientales del invernadero y los compuestos inertes adicionados en la formulación del producto,

entre otros, los cuales inciden en el porcentaje de efectividad del control. En el caso específico de la temperatura, para *T. harzianum*, su rango de crecimiento óptimo esta entre 15 y 35°C es así como, temperaturas inferiores a este rango, reducen la viabilidad del controlador y su capacidad antagónica (Serrano, 2006), lo cual también pudo afectar en este caso debido a que en el registro de temperatura tomadas del invernadero estas oscilaron entre 7°C y 23°C.

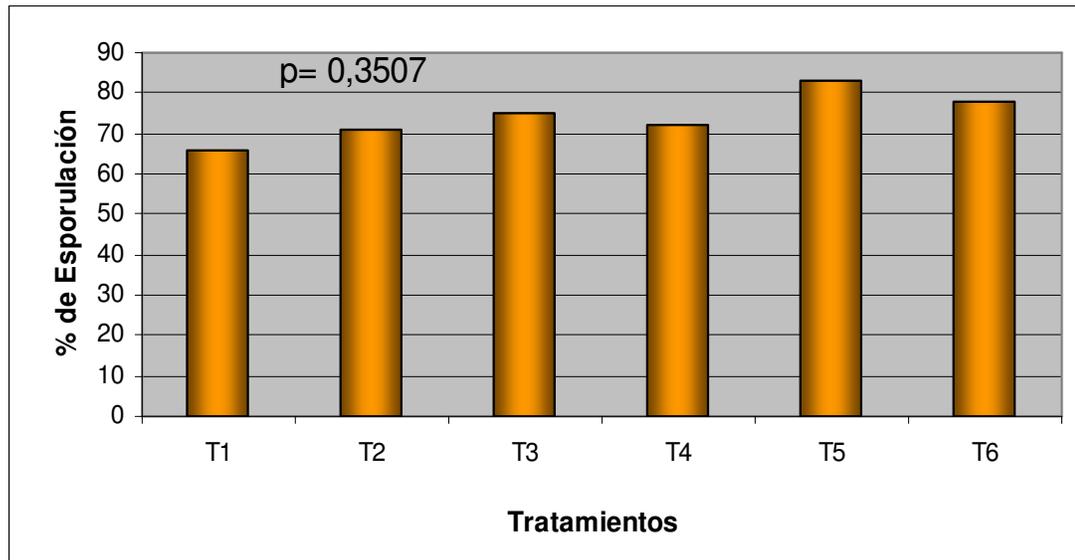
En la prueba de comparación múltiple de Tukey no fue posible comparar los tratamientos con el testigo comercial, debido a que el tamaño de la muestra de este era menor, sin embargo, a lo largo de las seis evaluaciones de los PPC el testigo comercial presentó un comportamiento estable, obteniendo siempre un porcentaje de control de la esporulación del 100%; así mismo, se puede observar en la figura 13 que ninguno de los tratamientos igualó este porcentaje de control.

Con las barras de error de la figura 13 y con el análisis estadístico no paramétrico Kruzkal-Wallis (Anexo F), se pudo determinar que no se presentaron variaciones entre las repeticiones realizadas con cada uno de los tratamientos, demostrando de esta manera que la metodología empleada para la evaluación de los PPC es reproducible, proporciona datos estables y al no presentarse una variación estadísticamente significativa se puede obtener un porcentaje de control confiable.

Debido a que se utilizó la misma cepa de *Botrytis* sp. a lo largo de las seis evaluaciones de eficacia de los PPC, se determinó la variación de su comportamiento por medio de un análisis estadístico no paramétrico Kruzkal-Wallis (Anexo G), donde se pudo establecer que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el testigo relativo de cada tratamiento con un nivel de significancia del 5%, demostrando de esta manera la estabilidad de la metodología. Igualmente, aunque nunca se alcanzó un porcentaje de esporulación superior al 90% (figura 14), no fue impedimento para la evaluación de los PPC y para la obtención de una metodología estable. Por lo tanto, al realizar una evaluación de eficacia de un producto se puede aceptar un testigo relativo con un porcentaje de esporulación entre el 70 y 85% aproximadamente; así mismo, es de gran

importancia que el comportamiento del testigo relativo sea estable para garantizar el éxito de la evaluación.

Figura 14. Porcentaje de Esporulaci3n del Testigo relativo en cada uno de los tratamientos.



T1: corresponde a Clorotalonil; **T2:** Mancozeb; **T3:** Captan; **T4:** *Burkholderia cepacia*; **T5:** Biorracional; **T6:** *Trichoderma harzianum*.

Durante el desarrollo de la investigaci3n, el testigo absoluto utilizado en cada uno de los tratamientos nunca mostr3 sntomas de la enfermedad del moho gris, indicando de esta manera que las rosas utilizadas estaban sanas, por lo tanto, no presentaban una infecci3n latente que puede desarrollarse bajo condiciones favorables y alterar los resultados de las evaluaciones de los fungicidas.

Los resultados obtenidos en las evaluaciones de eficacia indicaron que ninguno de los fungicidas evaluados present3 un control total de la enfermedad, debido a que se observaron manchas foliares producto de la germinaci3n de los conidios. Sin embargo, se logr3 un buen control de la esporulaci3n con los productos Captan, Clorotalonil y el biorracional. Por el contrario, con el Mancozeb y los productos biol3gicos se logr3 un nivel de control que puede considerarse como moderado (aproximadamente 45%). Este resultado, no completamente satisfactorio en el caso de los productos biol3gicos, puede ser explicado en parte porque su eficacia

depende del tiempo de distribución sobre la planta para asegurar su establecimiento temprano al fitopatógeno. Además, de su habilidad para tener un rápido crecimiento cuando las condiciones favorecen a *Botrytis* sp., el cual determina el nivel de biosupresión (Elmer & Reglinski, 2006).

Finalmente, con la metodología estandarizada se tiene una mayor aproximación al comportamiento de los fungicidas en campo que en las pruebas in vitro, con la ventaja que en las evaluaciones bajo condiciones semicontroladas, se tiene un menor número de condiciones variables que en campo, por tal razón, los resultados se deben en gran parte al efecto de los fungicidas.

7. CONCLUSIONES

1. Realizar evaluaciones de eficacia de Productos para la Protección de Cultivos preventivos bajo condiciones semicontroladas son decisivas antes de ingresar un producto al cultivo.
2. Las evaluaciones de eficacia en condiciones semicontroladas son una herramienta en la realización de las rotaciones de productos utilizados dentro de un manejo integrado de plagas.
3. Se estableció una escala de lectura que permite diferenciar entre dos signos de la enfermedad del moho gris, afección y esporulación, lo cual es de gran importancia para determinar en que etapa de desarrollo del fitopatógeno actúan los fungicidas.
4. Se determinó que con un inóculo de 1×10^6 conidios/ml y después de 96 horas de asperjado el fitopatógeno sobre los tallos florales se obtiene un porcentaje de afección superior al 90%.
5. Al realizar evaluaciones de eficacia con PPC preventivos se puede aceptar un testigo relativo con un porcentaje de esporulación superior al 75%.
6. Por medio de la evaluación de diferentes PPC preventivos para el control de *Botrytis* sp. se logró estandarizar una metodología que de acuerdo a los análisis estadísticos es reproducible y estable, la cual puede ser utilizada para la selección de productos aplicados en campo.
7. Los fungicidas Captan, Clorotalonil y el biorracional tuvieron un mayor control de la esporulación de los conidios de *Botrytis* sp. que el fungicida Mancozeb y los biocontroladores *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum*.

8. RECOMENDACIONES

Evaluar los productos biológicos proporcionándoles un mayor tiempo de establecimiento antes de la inoculación con el hongo fitopatógeno.

Considerar un porcentaje de control de PPC superior al 60% como el adecuado para la utilización de estos productos en campo.

Evaluar la metodología estandarizada utilizando diferentes especies ornamentales y de esta manera ser establecida para evaluaciones de eficacia en los diferentes cultivos comerciales.

9. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press.

Araujo, A. Maffia, L. Mizubuti, E. Alfenas, A. Capdeville, G. Grossi, J. 2005. Survival of *Botrytis cinerea* as Mycelium in Rose Crop Debris and as Sclerotia in Soil. Fitopatol. bras. 30 (5).

Barnes, S, Shaw, M. 2002. Factors affecting symptom production by Latent *Botrytis cinerea* in *Primula x polyantha*. Plant Pathology 51: 746–754.

Bayona, M. 1996. Control Biológico-Químico de *Botrytis cinerea* en rosa (L) en la Calera, Cundinamarca. Tesis Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.

Benito, P. Arranz, M. Eslava, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Rev. Iberoam. Mic. 17:S43-S46.

Chase, R. 2000. Preventing and controlling *Botrytis* Blight on Greenhouse Ornamental Plants. Cleary's Hort Talk. Volume 7, issue 1. Chase, R. 2000. Preventing and controlling *Botrytis* Blight on Greenhouse Ornamental Plants. Cleary's Hort Talk. 7 (1).

Clavijo, M. Cruz, E. 1997. Control químico de *Botrytis cinerea* Pers. en clavel miniatura y evaluación de un método de predicción de la enfermedad en un el cultivo comercial. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional. Bogotá.

Cotoras, M, Silva, E. 2005. Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. Mycologia. Vol 97 (2). Pág. 485-492.

Dardari, Z, Boudouma, M, Sebban, A, Bahloul, A, Kitane, S, Berrada, M. 2004. 1 Phenyl-3-toluy-4-[ortho-1'-(N-ethyl-2'-methylpropylamine)] phenylpyrazole, synthesis

and evaluation of the in vitro antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. IL FARMACO 59:673–678.

Eden.M, Hill. R, Beresford. R, Stewart. A. 1996. The influence of inoculum concentration, relative humidity, y temperature on infection of greenhouse tomatoes by *Botrytis cinerea*. Plant Patology 45: 795-806.

Elad, Y. 1997. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. Biol. Rev. 72: 381-422.

Elmer. P, Reglinski. T. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathology 55: 155–177.

Fernández, F. Inmaculada, J. Calvo, E. Inmaculada, V. Carbú, M. Camafeita, E. Garrido, C. López, J. Jorin, J. Cantoral, J. 2006. Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. Arch Microbiol.

Figuroa, C. García, C.2002. Aislamiento e Identificación de *Botrytis* sp. en áreas de invernadero y postcosecha en un cultivo de rosas de la sabana de Bogotá mediante el empleo de placas Petrifilm. Tesis pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias.

Galán, L. 2002. Estudio Tecnológico para la formulación del hongo biocontrolador *Trichoderma* sp. cepa 004 para el control biológico de *Botrytis cinerea* Pers. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial.

Garcés de Granada, E. 1992. Consideraciones sobre *Botrytis cinerea* Pers., agente causal de la pudrición de las flores. Agronomía Colombiana. 9 (2): 196-201.

Garcés de Granada, E. 1998. Algunos aspectos de la Biología del hongo patógeno *Botrytis cinerea* Pers. moho gris de las flores. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional. Bogotá.

Gonzalez, L. 1977. Introducción a la Fitopatología. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica.

Harman. G, Latorre. B, Agosin. E, San Martin. R, Riegel.D, Nielsen. P, Tronsmo. A, Pearson. R. 1996. Biological and Integrated Control of *Botrytis* Bunch Rot of Grape Using *Trichoderma* spp. Biological Control. 7: 259–266.

Helbing. J. 2001. Biological Control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in Strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). J. Phytopathology. 149: 265-273.

Hernandez, A. Rives, N. Caballero, A. Hernandez, N. Heydrich, M. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. Revista Colombiana de Biotecnología, 4(1): 6-13.

Huang, Y. Wong, P. 1998. Effect of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and soil type on the control of crown rot in wheat. Plant and soil. 203: 103-108.

Jimenez, S. 2005. Control del moho gris de la rosa variedad Classy con *Trichoderma* sp., fungicidas con modo de acción curativo y preventivo y sus mezclas. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá.

Lahlali, R. Najib, M. Friel, D. Haissam, M. 2006. Predictive modelling of temperature and water activity (solute) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. International Journal of Food Microbiology.

Latorre, B. Lillo, C. Rioja, M. 2001. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. Cien. Inv. Agr. 28 (2): 61-66.

Latorre, B. Rioja, M. 2002. Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. Ciencia e investigación agraria. 29 (2).

Lee. J, Lee. S, Kim. C, Son. J, Song. J, Lee. K, Kim. H, Jung. S, Moon. B. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Biological Control. 37: 329–337.

Manteau. S, Abouna. S, Lambert. B, Legendre. L. 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Ecology 43: 359-366.

Meir, S. Droby, S. Davidson, H. Alsevia, S. Cohen, L. Horev, B. Philosoph-Hadas, S. 1998. Suppression of *Botrytis* rot in cut rose flowers by postharvest application of methyl jasmonate. Postharvest Biology and Technology. 13: 235-243.

Molina. G, Zaldúa. S, González. G, Sanfuentes. E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Bosque (Valdivia). 27 (2).

Montaño, W. 2005. Evaluación de la Incidencia de *Botrytis cinerea* sobre rosa cultivar Classy con aplicaciones de fungicidas químicos y *Trichoderma*. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional. Bogotá.

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

Rabón, W. 2001. Desarrollo de un manejo integrado de *Botrytis cinerea* en lechuga lisa (*Lactuca sativa*) bajo condiciones de invernadero en la Sabana de Bogotá. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional. Bogotá.

Reis, H, Pfiffi, S, Hahn, M. 2005. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. Molecular Plant Pathology 6 (3): 257–267.

Rosslenbroich, H, Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea* history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protection. 19: 557- 561.

Sansone, G. Rezza, I. Calvente, V. Benuzzi, D. Sanz de Tosetti, M. 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. Postharvest Biology and Technology. 35: 245-251.

Santos, A, Sanchez, A, Marquina, D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. Microbiological Research. 159: 331-338.

Serrano, V. 2006. Manejo Integrado de *Botrytis cinerea* Pers. en especies ornamentales. Trabajo de Grado. Universidad Nacional. Facultad de Agronomía. Bogotá.

Utkhede, R, Bogdanoff, C, McNevin, J. 2001. Effects of biological and chemical treatments on *Botrytis* stem canker and fruit yield of tomato under greenhouse conditions. Plant Pathology. 23: 253-259.

Vicedo, B. O Leyva, M. Flors, V. 2006. Control of the phytopathogen *Botrytis cinerea* using adipic acid monoethyl ester. Archv. Microbiol. 184: 316-326.

Zimand, G. Elad, Y. Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea*. Pathogenicity Biological Control. 86 (11).

Recursos electrónicos

www.asocolflores.org (Fecha de consulta: 17 de Febrero de 2007)

www.bibliotecasnavirtual.edu.co (Fecha de consulta: 8 de Marzo de 2007)

www.-biol.paisley.ac.uk/bioref/fungi/Botrytis.cinerea.html (Fecha de consulta: 27 de Febrero de 2007)

www.infoagro.com (Fecha de consulta: 15 de Febrero de 2007)

www.proexport.com (Fecha de consulta: 15 de Febrero de 2007)

www.thewinedoctor.com (Fecha de consulta: 26 de Febrero de 2007)

10. ANEXOS

ANEXO A. Agar Papa Dextrosa (PDA)

Para un litro de medio:

Agar-agar	2%
Extracto de papa	25% (80% en base húmeda)
Sacarosa	1,2%
Antibiótico	0.005%

ANEXO B. Análisis de Varianza (ANOVA) de la estandarización de la concentración de inÓculo de *Botrytis*.

C de V	GL	SC	CM	F	Valor p
Tiempo	2	776981	388490		
Tratamiento	2	523791	261895	58,53	0,0011
EE	4	17897	4474,29	36,85	<,0001
EM	2691	326735	121,42		
Total	2699	1645403,8			

En donde cada sigla corresponde a:

C de V: Causas de Variación

GL: Grados de Libertad

SC: Sumas de Cuadrados

CM: Cuadrado Medio

F: La distribución con la que se compara.

Hipótesis de igualdad del efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de afección de *Botrytis*:

$$H_0: \mu_{T_1} = \mu_{T_2} = \mu_{T_3}$$

vrs

$$H_\alpha: \text{Al menos un } \mu_{T_i} \neq \mu_{T_{i'}} \text{ ; } i \neq i' \text{ ; } i, i' = 1, 2, 3$$

Hay evidencia estadísticamente significativa para rechazar la hipótesis de igualdad del efecto de los tratamientos a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, ya que

$$F_{Trat} = 58.53 > F_{(2;4;0.05)} = 6.94$$

ANEXO C. Prueba del rango múltiple de Duncan para la afección de pétalos con los diferentes tratamientos.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	2691
Error de cuadrado medio	121.4178

Duncan Agrupamiento	Media	Numero de observaciones	Tratamiento
A	67.7556	900	3
B	43.8667	900	2
C	34.7167	900	1

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

ANEXO D. Prueba del rango múltiple de Duncan para el porcentaje de afección con las diferentes horas de lectura.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	2691
Error de cuadrado medio	121.4178

Duncan Agrupamiento	Media	Numero de observaciones	Tiempo
A	70.1333	900	3
B	47.5722	900	2
C	28.6333	900	1

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

ANEXO E. Prueba de comparación múltiple de Tukey para el número total de pétalos afectados en los diferentes grados de severidad.

Agrupamiento	Tratamiento	Grado de Severidad				
		1	2	3	4	5
b	Clorotalonil	0	79	178	43	0
b	Mancozeb	11	138	42	107	2
a	Captan	48	134	91	27	0
c	<i>Burkholderia cepacia</i>	0	49	134	117	0
d	<i>Trichoderma harzianum</i>	0	0	162	138	0
cd	Biorracional	0	0	194	106	0

Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes.

ANEXO F. Análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis para determinar la variación entre las tres repeticiones de cada uno de los tratamientos.

Ho: $R_1 = R_2 = R_3$

Hi: $R_1 \neq R_2 \neq R_3$; en donde R corresponde a las repeticiones.

Clorotalonil: Kruskal-Wallis chi-squared = 0.316, df = 2, p-value = 0.8538

Mancozeb: Kruskal-Wallis chi-squared = 0.2193, df = 2, p-value = 0.8962

Captan: Kruskal-Wallis chi-squared = 0.2591, df = 2, p-value = 0.8785

Burkholderia cepacia: Kruskal-Wallis chi-squared = 0.758, df = 2, p-value = 0.6846

Biorracional: Kruskal-Wallis chi-squared = 0.8142, df = 2, p-value = 0.6656

Trichoderma harzianum: Kruskal-Wallis chi-squared=0.7222, df=2, p-value=0.6969

$p > 0.05$ no hay diferencia significativa

$p < 0.05$ existe diferencia significativa

ANEXO G. Análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis para determinar la variación del Testigo Relativo en las seis evaluaciones.

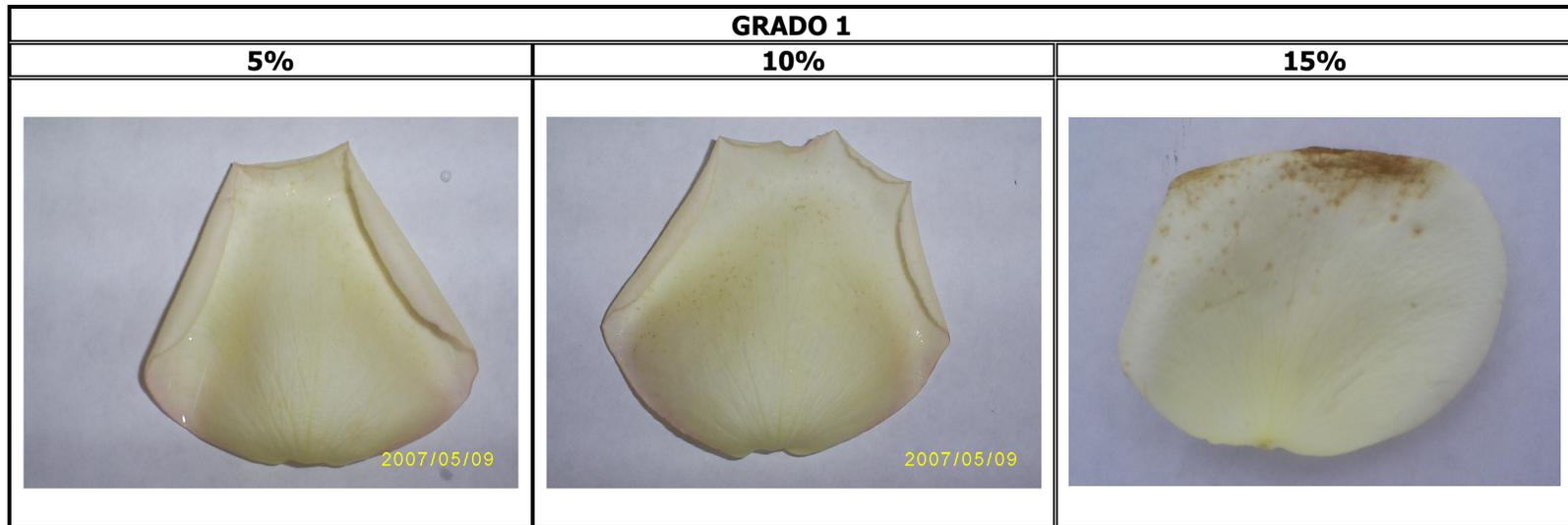
Ho: $T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = T_5 = T_6$

Hi: $T_1 \neq T_2 \neq T_3 \neq T_4 \neq T_5 \neq T_6$; en donde T corresponde a tratamiento.

Hay evidencia estadísticamente significativa para rechazar la hipótesis alterna (Hi) de la diferencia entre los tratamientos a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, ya que

Kruskal-Wallis chi-squared = 5.5666, df = 5, p-value = 0.3507

ANEXO H. Escala de lectura del Porcentaje de Afección de *Botrytis* sp. en pétalos de rosa.



GRADO 2		
20%	30%	40%
 <p>2007/04/30</p>	 <p>2007/04/30</p>	 <p>2007/04/30</p>

GRADO 3		
50%	60%	70%
 <p>2007/04/30</p>	 <p>2007/05/09</p>	 <p>2007/05/09</p>

GRADO 4

80%



90%



100%



