



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Centro Universitario UAEM Tenancingo



***Botrytis cinerea* PERS. EN STATICE (*Limonium sinuatum* MILL.) Y SU
SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

P R E S E N T A

ROBERTO GARCÍA GUADARRAMA

DIRECTORES

M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi

Dr. en C. Rómulo García Velasco

Tenancingo, Estado de México

Octubre de 2024

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE ANEXOS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. REVISIÓN DE LITERATURA	10
2.1. Importancia del cultivo de statice a nivel mundial	10
2.2. Importancia económica del cultivo de statice en México	10
2.3. El género de <i>Limonium</i> Mill.	12
2.3.1. Clasificación taxonómica	12
2.3.2 Morfología de <i>L. sinuatum</i>	13
2.3.3 Condiciones edafoclimáticas óptimas de desarrollo	13
2.4 Enfermedades que afectan al cultivo	13
2.4.1 Virus	13
2.4.2 Bacterias	14
2.4.3 Hongos	15
2.4.4 <i>Botrytis cinerea</i>	16
2.5 Resistencia a fungicidas	33
2.5.1 Tipos de resistencia	35
2.5.2 Resistencia a fungicidas por parte de <i>B. cinerea</i>	35
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. HIPÓTESIS	38
5. OBJETIVOS	38
5.1. Objetivo general.....	38
5.2. Objetivos específicos	38
6. MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1. Ubicación de la investigación	39
6.2. Colecta de material vegetal enfermo.....	39
6.3. Preparación de medio de cultivo.....	39
6.4. Aislamiento y purificación de <i>Botrytis cinerea</i>	40

6.5. Obtención de cultivos monospóricos.....	41
6.6. Identificación	42
6.6.1. Identificación morfológica	42
6.6.2. Identificación molecular.....	42
6.7. Determinación de patogenicidad	44
6.7.1. Siembra de plantas de statice	44
6.7.2. Cepas de <i>Botrytis</i> spp.	45
6.7.3. Inoculación de <i>Botrytis</i> spp.	45
6.7.4. Recuperación del patógeno	47
6.7.5. Variables evaluadas.....	47
6.7.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	47
6.8. Determinación de la sensibilidad a fungicidas	47
6.8.1. Preparación de medio de cultivo	48
6.8.2. Siembra del patógeno	48
6.8.3 Variables evaluadas.....	49
6.8.4. Diseño experimental y análisis estadístico.....	50
7. RESULTADOS	51
7.1. Aislamiento del patógeno	51
7.2 Selección de cultivos monospóricos	51
7.3. Identificación a nivel de especie	52
7.3.1. Identificación morfológica	52
7.3.2. Identificación molecular.....	56
7.4 Patogenicidad.....	58
7.4.1 Síntomas registrados	58
7.5 Incidencia.....	58
7.6 Severidad	60
7.7 Sensibilidad a fungicidas	60
8. DISCUSIÓN	65
9. CONCLUSIONES	70
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
11. ANEXOS	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Superficie cultivada (ha) y valor de la producción (MXN) de statice como flor de corte en México, durante el periodo 2016-2019.....	11
Cuadro 2. Superficie cultivada (ha) y valor de producción (MXN) statice como flor de corte en los principales municipios productores del Estado de México en el periodo de 2016-2019.....	12
Cuadro 3. Especies de bacterias, cianobacterias y hongos reportadas como agentes de control biológico frente a <i>B. cinerea</i>	24
Cuadro 4. Aceites esenciales y extractos usados para el control de <i>B. cinerea</i>	27
Cuadro 5. Ingredientes activos, grupo químico y mecanismos de acción de los fungicidas utilizados con mayor frecuencia para el manejo de <i>Botrytis</i> spp.....	29
Cuadro 6. Datos de las secuencias de <i>Botrytis</i> spp. utilizadas para el análisis filogenético.....	43
Cuadro 7. Fungicidas y productos de bajo impacto ambiental evaluados frente a <i>Botrytis</i> spp.....	48
Cuadro 8. Tasa de crecimiento (cm ²) de los cultivos monospóricos de los aislamientos.....	51
Cuadro 9. Características morfológicas de macroconidios, microconidios y esclerocios de <i>B. cinerea</i> , cepas C1R1 y C2R5.....	53
Cuadro 10. Identificación molecular de <i>Botrytis cinerea</i> utilizando los cebadores universales ITS4 e ITS5, y el factor de elongación-1 α (EF-1 α) EFI-728F y EFI-986R, alineados con especies de la base de datos del NCBI (2023).....	56
Cuadro 11. Incidencia de la pudrición grisácea provocada por <i>B. cinerea</i> en plantas de statice hasta el día siete ddi.....	58

Cuadro 12. Área de crecimiento micelial (cm²) al sexto dds de *B. cinerea* cepa C1R1 en medio de cultivo PDA con fungicidas.....61

Cuadro 13. Área de crecimiento micelial (cm²) al sexto dds de *B. cinerea* cepa C2R5 en medio de cultivo PDA con fungicidas.....63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conidióforos y macroconidios de *B. cinerea*. A) Microscopio compuesto (4x); B) microscopio electrónico.....18

Figura 2. Macroconidios de *B. cinerea* observados bajo microscopio compuesto (40x)...18

Figura 3. Conidióforo y microconidios de *B. cinerea* observados bajo microscopio compuesto.....19

Figura 4. Esclerocios de *B. cinerea* desarrollados en medio de cultivo PDA.....20

Figura 5. Estructura química de pirimetanil.....33

Figura 6. Estructura química de procloraz.....33

Figura 7. Síntomas típicos de la pudrición grisácea en plantas de *statice* colectadas en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México: A) flores pudrición grisácea; B) tallo con pudrición en la base; C) tallo con necrosis en todo el largo del tallo y amarillamiento de hojas superiores al daño; D) corona dañada con necrosis y desarrollo de moho gris producido de la parte necrosada.....40

Figura 8. Siembras en medio de cultivo PDA de tejido de *statice* con síntomas de pudrición grisácea y purificación. A) Siembra de cuatro fragmentos de tejido; B) purificación.....41

Figura 9. Incubación de plántulas de *statice*. A) Charola de 120 cavidades con plántulas de *statice* un mes después de la siembra; B) trasplante e incubación.....45

- Figura 10.** Proceso de inoculación. A) Plantas de statice de tres meses de edad; B) recorte de discos de medio PDA con crecimiento de *Botrytis* spp.; C) inoculación de las plántulas; D) cámara húmeda.....46
- Figura 11.** Condiciones de laboratorio bajo las cuales se mantuvieron las siembras para la determinación de sensibilidad a fungicidas y a productos de bajo impacto ambiental.....49
- Figura 12.** Trazo del área de crecimiento radial de *Botrytis* spp. seis días después de la siembra. A) Testigo; B) Scala.....50
- Figura 13.** Características culturales y morfológicas de la cepa de *B. cinerea* C1R1 en medio de cultivo PDA. A) Vista frontal de la caja de Petri; B) reverso de la caja de Petri; C) presencia de esclerocios en medio de cultivo; D) micelio septado y ramificado (40X); E) macroconidios en forma de uva (100X); F) microconidioforo y microconidios de forma circular (100X).....54
- Figura 14.** Características culturales y morfológicas de la cepa C2R5 en medio de cultivo PDA. A) Vista frontal de la caja de Petri; B) reverso de la caja de Petri; C) presencia de esclerocios en medio de cultivo; D) micelio septado y ramificado (40X); E) macroconidios en forma de uva (100X); F) microconidioforo y microconidios de forma circular (100X).....55
- Figura 15.** Relaciones filogenéticas aplicando los algoritmos Neighbor-Joining a una matriz de distancias entre pares estimada mediante el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL), construidas con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Kimura de 2 parámetros con 27 secuencias de nucleótidos de la región ITS del género *Botrytis* y *Pestalotiopsis ellipsospora* MFLUCC 12-0282 (JX398980) como grupo externo.....57
- Figura 16.** Avance de la pudrición grisácea, enfermedad provocada por *B. cinerea* en plantas de statice. A) planta con necrosis inicial en la zona de inoculación; B-C) necrosis extendida en la corona y las hojas, y marchitez; D) muerte de hojas.....59

Figura 17. Área de daño (cm²) de *B. cinerea*, cepas C1R1 y C2R5 en plantas de statice. Barras con letra diferente, indican diferencias estadísticas (p < 0.01).....60

Figura 18. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cepa C1R1. A) Sin fungicida, B) Scala, C) Sportak, D) Full-Gro, E) Cinnasure, y F) Citrex.....62

Figura 19. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cepa C1R1. A) Sin fungicida, B) Scala, C) Sportak, D) Full-Gro, E) Cinnasure, y F) Citrex.....64

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* cepa C1R1 al sexto dds, en las réplicas 1 y 2 con los tratamientos testigo, Scala, Full-Gro, Sportak, Cinnasure y Citrex.....87

Anexo 2. Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* cepa C2R5 al sexto dds, en las réplicas 1 y 2 con los tratamientos testigo, Scala, Full-Gro, Sportak, Cinnasure y Citrex.....87

RESUMEN

A nivel nacional el cultivo de statice para flor de corte solo se produce en el Estado de México, donde en el año de 2019 se reportó una superficie cultivada de 32.76 ha equivalentes a un valor de producción de \$ 14,985,400.00 MXN. Este cultivo es afectado por un amplio número de plagas y enfermedades, una de las que mayores daños causa tanto en campo como en poscosecha es el “moho gris” o también conocida como “pudrición grisácea” cuyo agente causal es el hongo *Botrytis cinerea*; no obstante, el patógeno no se encuentra documentado de manera formal. La enfermedad provoca afectaciones en toda la planta, en especial la inflorescencia. Existen diversos métodos de manejo, siendo el químico el que más se aplica en la región; no obstante, esto es una seria dificultad porque, aunado a los problemas ambientales que se derivan, se ha documentado la pérdida de sensibilidad a fungicidas e incluso resistencia, lo que contribuye a un círculo vicioso en el uso de plaguicidas. En este sentido, en el presente trabajo de investigación se planteó como objetivo general: aislar al agente causal de la pudrición grisácea en la inflorescencia de statice y evaluar su sensibilidad a fungicidas y a productos de bajo impacto ambiental. Para llevarlo a cabo se colectaron inflorescencias de plantas dañadas a partir de cultivos comerciales en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México, a partir de lo cual se obtuvieron dos cepas, nombradas C1R1 y C2R5, que de acuerdo con el análisis morfológico y molecular correspondieron a *B. cinerea*; y además, fueron patogénicas en plantas de statice de tres meses de edad, de tal forma que los primeros síntomas se manifestaron al día tres después de la inoculación del patógeno, siendo la más virulenta la cepa C2R5. Adicionalmente se determinó la sensibilidad *in vitro* a los fungicidas Scala y Sportak, así como a los productos de bajo impacto ambiental Cinnasure, Citrex y Full-Gro, en todos los casos utilizando la dosis recomendada en la etiqueta del producto; al día seis después de la siembra se determinó el área de crecimiento micelial, identificándose que ambas cepas han perdido sensibilidad a Scala, siendo la cepa menos sensible la C2R5. Por otro lado, es relevante destacar que los tres productos considerados de bajo impacto fueron efectivos para inhibir el 100 % del crecimiento del fitopatógeno, por lo que representan una alternativa para el manejo del patógeno en la región.

1. INTRODUCCIÓN

Limonium sinuatum, mejor conocida como statice o flor de papel, es una de las especies más conocidas y utilizadas en la horticultura ornamental. Es originaria de la zona mediterránea, norte de África y Palestina, aunque ha llegado a considerarse como una planta europea. Es una especie con resistencia a la sequía, productora de flores pequeñas agrupadas en una panícula y con gran diversidad de colores, lo que la hace muy vistosa. Una característica importante es su larga vida de florero, por lo que es muy importante en los arreglos florales. Entre los principales países exportadores a nivel mundial se encuentran: Egipto, Etiopía, Kenia, Sudáfrica y Zimbabwe (García y Serrano, 2011).

De acuerdo con datos del SIACON (2022), en el año 2019 en México se sembraron 32.76 hectáreas, con un valor de producción de MNX \$ 14,985,400, siendo el Estado de México la entidad con la mayor superficie sembrada. El cultivo es afectado por una serie de organismos fitopatógenos, esto tanto a cielo abierto como bajo invernadero; entre los que destaca el hongo *Botrytis cinerea* Pers., que causa daño en las inflorescencias, además de provocar pudrición en tallo, hoja y corona, llegando incluso a matar a las plantas.

En la región florícola del Estado de México, como parte del crecimiento de la industria florícola y el cultivo intensivo de las especies ornamentales se utilizan fungicidas como principal método de manejo de los hongos fitopatógenos. En este sentido, debido al uso desmedido se tienen reportes de resistencia a diferentes ingredientes activos como lo son tiabendazol y benomyl (Ponce-González *et al.*, 2002; López, 2019), además Camacho (2009) reportó pérdida de sensibilidad a procloraz, iprodiona, metalaxil-m y clorotalonil. Por lo que es necesario buscar alternativas de manejo, entre estas se encuentra el biocontrol a base de extractos vegetales y el uso de sustancias amigables con el ambiente tales como las sales cuaternarias. Por lo anterior se plantea como objetivo: aislar al agente causal de la pudrición grisácea en la inflorescencia de statice y evaluar su sensibilidad a fungicidas y a fungicidas de bajo impacto ambiental.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del cultivo de *statice* a nivel mundial

Limonium es un género importante a nivel ornamental al contar con alrededor de 300 especies, las cuales son anuales y algunas perenes o vivaces de larga vida. Su distribución es cosmopolita; algunas especies se han reportado en África, América del norte, Australia, Asia y Europa. Entre las especies de mayor importancia ornamental se reportan: *L. angustifolium*, *L. acutifolium*, *L. avei*, *L. asperrimum*, y *L. sinuatum*; la más popular del mercado es esta última, que es originaria de la región Mediterránea y comúnmente es conocida como limonium, *statice* o *estátice* (Munz, 1973; citado por CONABIO, 2009). El *statice* es utilizado para cubrir espacios, para arreglos florales y también como flor de corte, en maceta o incluso sus tallos se utilizan secos. Entre los principales países exportadores se encuentra Egipto, Etiopía, Kenia, Sudáfrica y Zimbabwe (García y Serrano, 2011).

2.2. Importancia económica del cultivo de *statice* en México

De acuerdo con datos del SIACON (2022), a nivel nacional el cultivo de *statice* solo se produce en el Estado de México. Durante el periodo 2016-2020 se reportaron fluctuaciones importantes; por ejemplo, en 2016 se sembraron 29.2 ha, aumentando a 35.7 para 2017; no obstante, la superficie de cultivo disminuyó en los dos años siguientes con 33.2 ha para 2018 y 29.4 ha para 2019; sin embargo, se presentó una ligera recuperación en 2020 con 32.76 ha. En cuanto al valor de la producción en el periodo 2016-2020, fue mayor en 2018 con MXN \$ 16,243,530. Es interesante destacar que a pesar de que en 2016 y 2019 se registró superficie de cultivo similar, en 2019 el valor de la producción fue mayor (Cuadro 1) (SIACON, 2022), lo cual puede atribuirse al alza de los precios o el incremento de la demanda.

Cuadro 1. Superficie cultivada (ha) y valor de la producción (MXN) de stative como flor de corte en México, durante el periodo 2016-2019 (Fuente: SIACON, 2022).

Año	Superficie sembrada (ha)	Valor de la producción (MXN)
2016	29.20	12,452,550
2017	35.70	15,074,160
2018	33.20	16,243,530
2019	29.40	13,619,520
2020	32.76	14,985,400

De acuerdo con datos del SIACON (2022), en 2019 en el Estado de México, los municipios en donde se cultivó la mayor superficie de dicha especie, en orden de importancia, fueron: Tepetlixpa, Zumpahuacán, Tenancingo, Villa Guerrero y Ozumba. Durante el periodo 2016-2019, se registraron fluctuaciones en cuanto a la superficie sembrada y el valor de la producción; en el año 2019 en Tepetlixpa se registró una superficie de 10 hectáreas con un valor de producción de MXN \$ 5,765,550; para Zumpahuacán se reportaron 8 hectáreas sembradas y un valor de producción de MXN \$ 4,521,350 en Tenancingo, Villa Guerrero y Ozumba, en el mismo periodo se registró una superficie sembrada de 5.4, 5 y 1 hectárea respectivamente, un valor de la producción de MXN \$ 3,272,270, MXN \$ 3,336,310 y MXN \$ 1,724,050, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Superficie cultivada (ha) y valor de producción (MXN) *statice* como flor de corte en los principales municipios productores del Estado de México en el periodo de 2016-2019 (Fuente: SIACON, 2022).

Municipio	2016		2017		2018		2019	
	SC	VP	SC	VP	SC	VP	SC	VP
Tepetlixpa	12	5117.1	14.5	6881.3	12.5	6084.8	10	4765.6
Tenancingo	7	3685.4	7.2	2239.5	6	2891.9	5.4	2272.3
Villa Guerrero	5	1375.2	6	1863.2	6.2	2956.1	5	2336.3
Zumpahuacán	4	1516.7	5	1982.9	6	2509.9	8	3521.4
Ozumba	1.2	758.2	3	2107.2	2.5	1800.9	1	724.1

SC: superficie cultivada, VP: Valor de la producción.

2.3. Género *Limonium* Mill.

2.3.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo con Catalogue of Life (2023), el género *Limonium* Mill. se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Plumbaginaceae

Género: *Limonium*

Especie: *L. sinuatum* (L.) M.

2.3.2 Morfología de *L. sinuatum*

Limonium sinuatum es considerada como una planta herbácea anual o perene, que rara vez puede alcanzar una forma arbustiva, tiene una germinación epigea rápida, cuenta con raíz profunda de consistencia leñosa, con abundantes raíces secundarias ubicadas en los primeros 10 cm del suelo (De Blas, 1992). Las hojas basales son angostas con una vena media muy marcada, y escasas hojas en el tallo; son enteras y angostas de 4 cm de largo. Los tallos son ramificados y alados (Munz, 1973; citado por CONABIO, 2009).

Sus flores se agrupan formando filas por tamaños generalmente de menor a mayor tamaño, cuya inflorescencia es una panícula; cada flor brota de las axilas en las brácteas, la parte más vistosa de la flor es el cáliz. Estas pueden ser de gran variedad de colores que va desde diversas tonalidades de rojo, azul, morado, amarillo, blanco, etc., con forma de embudo de alrededor de 1 cm de tamaño. La corola consiste en cinco pétalos que en ocasiones no sobrepasan el cáliz. Una característica especial y por la cual es ampliamente utilizada en el mercado ornamental es que aun secas las flores mantienen su color. Su periodo vegetativo es de alrededor de 120 días y comienza a presentar floración aproximadamente 150 días después de la siembra (Munz, 1973; citado por CONABIO, 2009).

2.3.3 Condiciones edafoclimáticas óptimas de desarrollo

La temperatura óptima para el desarrollo de las plantas de *statice* es de 15 a 25 °C. Se desarrolla bien en suelos ligeros con pH de 6-6.5. Es una especie que presenta cierta tolerancia a la salinidad. Es una planta de día largo, por lo que para su floración requiere de 16 horas luz (Aleman, 2015).

2.4 Enfermedades que afectan al cultivo

2.4.1 Virus

Entre los virus que atacan al *statice* se encuentran: el virus del mosaico del nabo (Turnip mosaic potyvirus, por sus siglas TuMV), el virus del mosaico del pepino (Cucumber mosaic cucumovirus, por sus siglas CMV) (EcuRed, S.f), el virus de la marchitez del haba (Broad

bean wilt fabavirus, por sus siglas BBWV) (Matsumoto *et al.*, 1997), y el virus “rattle” del tabaco (Tobacco rattle wilt, por sus siglas TRV) (EcuRed, S.f).

Los síntomas que provoca el TuMV son: moteado, manchas necróticas, manchas anulares. En algunos casos llega a provocar mosaicos, deformaciones foliares y achaparramiento (Agrios, 2016); en *statice* se manifiesta principalmente un mosaico foliar con un fuerte debilitamiento que provoca la muerte prematura de las plantas (EcuRed, S.f). Por su parte, el CMV se distribuye ampliamente por todo el mundo, siendo uno de los virus que cuenta con más hospedantes (Agrios, 2016), los principales daños que produce son moteado o manchado y deformación de hojas, flores y frutos; las plantas pueden presentar achaparramiento, e incluso llegar al punto de ser destruidas por el virus. Por otra parte, el BBWV (Matsumoto *et al.*, 1997) provoca marchitamiento, mosaico y reducción del desarrollo, lo que en consecuencia ocasiona graves pérdidas en la productividad (Melgarejo *et al.*, 2010; Matsumoto *et al.*, 1997). En lo que respecta al TRV, provoca manchas foliares anulares y arabescas amarillas y rojas (EcuRed, S.f.).

2.4.2 Bacterias

2.4.2.1 *Pseudomonas* spp.

El género *Pseudomonas* son bacterias que provocan diversas enfermedades, entre las que se encuentran: manchas foliares, agallas del olivo, marchitez del plátano, canchales y quemaduras de las yemas (Agrios, 2016). Entre las especies que afectan a *statice* se encuentran *P. andropogonis* (Anderson y Tisserat, 1994) y *P. caryophylli* (Jones y Engelhard, 1984).

Pseudomonas andropogonis provoca la llamada mancha foliar (Anderson y Tisserat, 1994); provoca lesiones circulares a irregulares con centro marrón y bordes de color pardo rojizo, con o sin halos cloróticos. Normalmente aparece necrosis de color pardo rojizo en el borde de las hojas. Las lesiones pueden ser delineadas por las nervaduras de las hojas (EcuRed, S.f). Por otro lado, las plantas afectadas por *P. caryophylli* manifiestan hojas cloróticas y necróticas entre mezcladas desde la roseta; las raíces se descomponen antes de que la pudrición de la corona se presente, pero debido a los daños radicales las plantas mueren; además, es común que las plantas desprendan un olor putrefacto. Cabe señalar que las

enfermedades bacterianas son favorecidas por altos porcentajes de humedad y altas temperaturas (Jones y Engelhard, 1984).

2.4.3 Hongos

2.4.3.1 *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* produce marchitamiento vascular, principalmente en flores y hortalizas. Es un hongo que habita en el suelo, el cual es favorecido por las condiciones edafoclimáticas que se presentan en los invernaderos (Agrios, 2016). En *statice* se manifiesta como podredumbres de raíz, corona y tallo; es importante señalar que es un hongo sistémico (Arias y Jerez, 2008). En dicha especie se ha reportado en específico a *F. roseum*, la cual causa amarillamiento del tallo y coloración rosada en el mismo, con marchitamiento en las hojas (Díaz *et al.*, 1996).

2.4.3.2 *Sclerotium* spp.

El género de *Sclerotium* provoca diferentes enfermedades, entre estas: el ahogamiento de plántulas, cancrrosis de tallo, tizón de la corona y pudriciones de la raíz, corona, bulbos, tubérculos, y frutos. Se ve favorecido por el clima cálido, los síntomas que se presentan son amarillamiento o marchitez de hojas inferiores o la muerte descendente de hojas (desde la punta hasta el peciolo) (Agrios, 2016). En *statice* se reporta la especie *S. rolfsii* (Buriticá, 1999), cuando la temperatura esta entre los 30 y 35 °C y la humedad es alta, el hongo avanza formando micelio y esclerocios con rapidez (Agrios, 2016).

2.4.3.3 *Rizoctonia* spp.

En *statice* se tienen reportes de enfermedades ocasionadas por *R. solani* (Buriticá, 1999). Este patógeno es capaz de atacar desde pastos, plantas perennes, árboles y plantas de ornato, los síntomas son diversos, pero en general causa ahogamiento de plántulas, pudriciones de raíz, pudrición y llega a producir canchros del tallo en plantas adultas y en crecimiento, aunque también puede producir tizones y manchas foliares. La temperatura ideal de la mayoría de las especies de este género para su desarrollo ronda los 15 a 18 °C, pero algunas con temperaturas de más de 35 °C pueden provocar daños (Agrios, 2016).

2.4.3.4 *Alternaria* spp.

Afecta principalmente a las hojas, tallos, flores, y frutos de varias plantas, entre ellas hortalizas, ornamentales y frutales. Los principales síntomas se observan en forma de manchas y tizones foliares; también se reporta ahogamiento de plántulas, pudriciones del cuello, así como pudriciones de frutos y tubérculos (Agrios, 2016). En statice se reporta que causa manchas negras en hojas y tallos, amarillamiento en la corona y reducción en la producción de tallos florales (Díaz *et al.*, 1996).

2.4.3.5 *Cercospora insulata*

El género *Cercospora* por lo general causa manchas foliares pequeñas y aisladas, pero en algunos casos pueden extenderse y coalescer provocando tizones foliares. Cuando el clima es húmedo, la superficie dañada se cubre con un moho gris ceniciento que apenas se observa a simple vista, las plantas pueden llegar a perder todas sus hojas cuando la enfermedad es severa. El hongo se ve favorecido por elevadas temperaturas, es por lo que se presenta más en el verano o en zonas con clima cálido. Las esporas, aunque necesitan agua para germinar, les basta con el simple rocío de la mañana para provocar numerosas infecciones (Agrios, 2016). En statice es el agente causal de la enfermedad que se le conoce como “ojo de rana”, dada la forma característica de las manchas; enfermedad descrita en Estados Unidos y responsable de importantes pérdidas en el cultivo (Wolcan *et al.*, 1994).

2.4.4 *Botrytis cinerea*

2.4.4.1 Clasificación taxonómica

De acuerdo con el Catalogue of Life (2024), el género *Botrytis* cuenta con 74 especies descritas. La especie *B. cinerea* (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Leotiomycetes

Orden: Heliotales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: *Botrytis*

Especie: *Botrytis cinerea* Pers.

2.4.4.2 Características morfológicas

El género *Botrytis* se caracteriza por presentar conidióforos largos y ramificados que pueden ser hialinos o pigmentados con una ramificación irregular; células apicales alargadas o redondeadas, con grupos de conidios por cada conidióforo; conidios hialinos o grises en masa, ovoides; esclerocios negros con forma irregular (Álvarez, 2012; Barnet y Hunter, 1998).

Dentro de este género se pueden desarrollar micro y macroconidios, además de clamidosporas; cabe señalar que en la fase sexual se producen apotecios. De manera particular para la especie *B. cinerea* se reporta que durante la fase asexual es capaz de producir esclerocios, macro y microconidios (Álvarez, 2012).

2.4.4.2.1 Conidióforos

Los conidióforos son originados de las hifas del hongo y de los esclerocios; constan de un microfilamento un tanto recto, que se ramifica de forma alterna y en cada una de estas ramifica secundariamente; en la zona terminal de cada ramificación se encuentran los conidios o macroconidios. Cuando se produce gran cantidad de conidióforos estos dan lugar a la coloración grisácea a la que se le atribuye su nombre común “moho gris” (Figuras 1-A y 1-B) (Carbú, 2006).

2.4.4.2.2 Macroconidios

Los macroconidios son estructuras de propagación de corta duración. Su supervivencia y producción está determinada por las temperaturas, la humedad relativa, la interacción con la microbiota y la exposición al sol (Álvarez, 2012). En cuanto a la forma pueden ser ovalados, globosos o elípticos (Figuras 1 y 2) (Carbú, 2006; Fernández 2006), el tamaño que pueden alcanzar es alrededor de 13.0 x 8.1µm (Camacho, 2009).

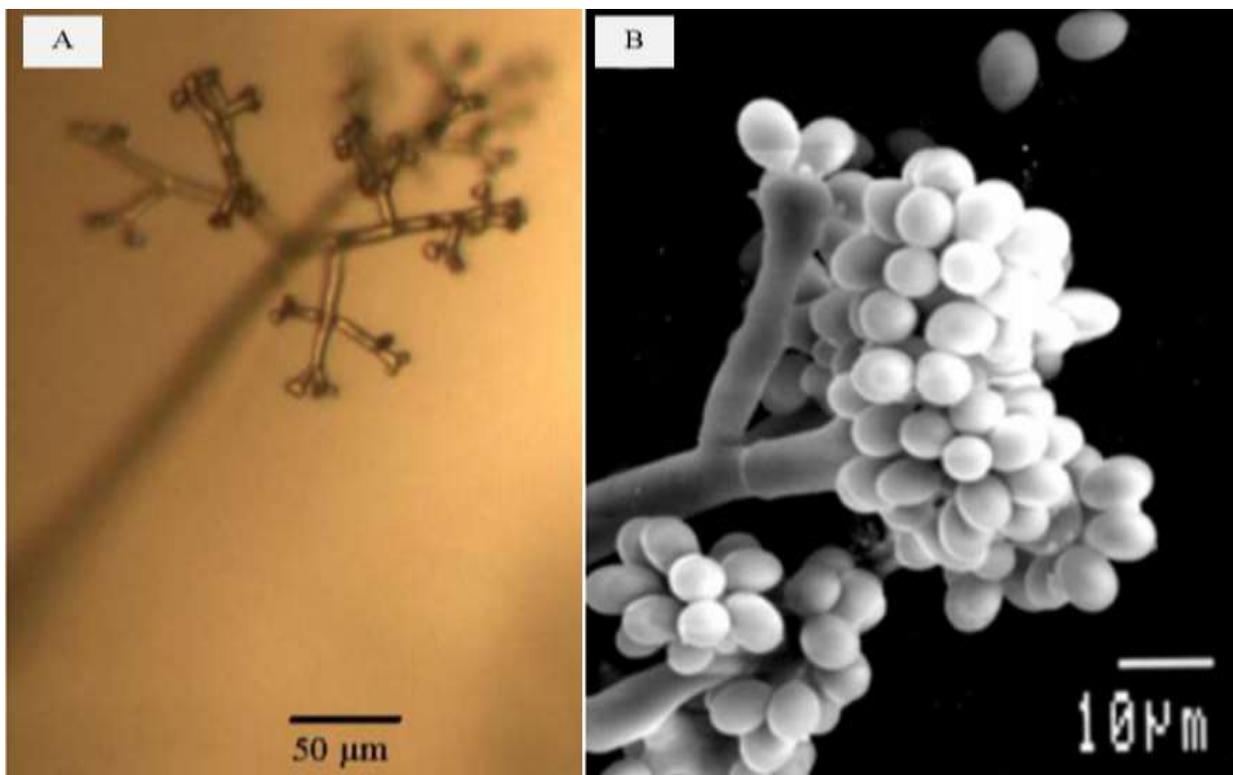


Figura 1. Conidióforos y macroconidios de *B. cinerea*. A) Microscopio compuesto (4x); B) microscopio electrónico (Carbú, 2006).



Figura 2. Macroconidios de *B. cinerea* observados bajo microscopio compuesto (40x) (Fernández, 2006).

2.4.4.2.3 Microconidios

Los microconidios tienen mayor capacidad de sobrevivencia que los macroconidios. Se cree que son estructuras cuya función es la esparmatización. Diversos estudios han revelado que se pueden producir cuando existe una deficiencia nutricional o condiciones adversas, como por ejemplo bajo contenido de O₂ (Álvarez, 2012).



Figura 3. Conidióforo y microconidios de *B. cinerea* observados bajo microscopio compuesto (Fernández, 2006).

2.4.4.2.4 Esclerocios

Todas las especies de *Botrytis* son capaces de producir esclerocios en medio de cultivo. Estas estructuras se caracterizan por poseer varias capas de células de coloración negruzca, siendo capaces de sobrevivir bajo condiciones adversas, por lo que es la estructura de supervivencia de mayor importancia para el hongo (Álvarez, 2012). En cuanto a la forma, tienden a ser irregulares, aunque pueden presentarse algunos de forma redonda; el tamaño es variado, ya que pueden producirse también microesclerocios; en este sentido se reportan tamaños de 1.2 × 0.9 mm hasta 3.1 × 2.5 mm para los macroesclerocios (Terrones-Salgado *et al.*, 2019).



Figura 4. Esclerocios de *B. cinerea* desarrollados en medio de cultivo PDA (Fernández, 2006).

2.4.4.3 Signos y síntomas ocasionados por *Botrytis* spp.

Botrytis spp. son unos de los hongos más comunes en invernadero. La enfermedad que produce se manifiesta como tizones en inflorescencias, pudriciones de tallo, frutos, tubérculos, bulbos, raíces, canchales y ahogamiento de plántulas. Cuando existe exceso de humedad se desarrolla una capa fructífera conspicua de moho gris, de ahí que sea conocido comúnmente de esta manera (Agrios, 2016).

Particularmente en statice, el patógeno es capaz de provocar pudrición de corona, hojas y tallos. Los daños pueden presentarse principalmente durante la época de corte debido al tejido expuesto, lo que causa pudrición seca de la parte basal y posteriormente muerte total de la planta (Díaz *et al.*, 1996; Buitrago y Saavedra, 1982). Por otro lado, también afecta a las flores individuales, pero conforme avanza la enfermedad causa daño total a las inflorescencias; en este caso el daño se distribuye de manera descendente en los tallos, los cuales se vuelven necróticos (Englehard, 1980).

2.4.4.4 Condiciones óptimas de desarrollo

La enfermedad es mediada por tres factores: luz, humedad y temperatura, las cuales se describen a continuación:

- Luz: se ha demostrado que el espectro de luz ultravioleta es el tipo de luz más importante en la mortalidad de los conidios (Carbú, 2006). Además, el tipo de luz y la intensidad tienen influencia en el desarrollo de *B. cinerea*; por ejemplo, la luz UV-C (254 nm) inhibe el desarrollo del patógeno, utilizando tiempos superiores a 30 s (2.4 kJ/cm²) (Anabalón, 2016), mientras que con luz cercana al ultravioleta NUV la esporulación se ve favorecida hasta 54 veces en invernadero a comparación de la luz blanca (Álvarez, 2012).
- Humedad: en general, las condiciones de humedad relativa superior al 90 % son favorables para el patógeno (Bernal, 2009). Los conidios son capaces de germinar en 24 horas con alto porcentaje de humedad; esto ha sido demostrado en algunos estudios, en los que se ha registrado una germinación de hasta 83.7 % bajo condiciones de humedad relativa del 86 % (Latorre y Rioja, 2002).
- Temperatura: la germinación puede producirse en un intervalo de temperatura de entre 5 a 30 °C, aunque la óptima se encuentra en 20 °C, bajo la cual se inicia la germinación en 3 horas, con tendencia a disminuir significativamente al alcanzar los 30 °C, en la cual la germinación puede ser de 60 % en 6 horas. Por otro lado, entre los 10-15 °C, el proceso para el inicio de la germinación también se presenta hasta las 6 horas (Latorre y Rioja, 2002).

2.4.4.5 Métodos de manejo

Actualmente el manejo de *B. cinerea* se lleva a cabo principalmente a través de métodos químicos; no obstante, existen diversas alternativas que son de utilidad para reducir las pérdidas sin sacrificar la economía, entre las que se encuentran el control cultural, biológico, el uso de aceites esenciales y extractos acuosos, así como el uso de otros productos de bajo impacto ambiental.

2.4.4.5.1 Cultural

Las prácticas culturales son una herramienta de utilidad para el manejo fitosanitario; estas se encaminan principalmente hacia la alteración de las condiciones climáticas alrededor de los órganos vegetales que son susceptibles al ataque de las plagas y enfermedades, con el fin de

no favorecer sus condiciones óptimas y/o prevenir la entrada del inoculo al área de cultivo. Otro medio es a través de la utilización de plantas resistentes o cultivares tolerantes; no obstante, para *B. cinerea* aún no existen, por lo que el efecto de la ubicación de las plantas en el invernadero juega un rol importante, ya que las plantas del centro crean un microclima más favorable al ataque de patógenos debido a que la ventilación es reducida (Elad y Shtienberg, 1995). Entre las principales prácticas culturales recomendadas para el manejo del patógeno se encuentran:

- **Sanitización:** consiste en remover las plantas infectadas y eliminarlas con el fin de reducir el inoculo (Agrios, 2016), esto puede realizarse con agentes químicos o utilizar la solarización como método de reducción de inóculo en el suelo.
- **Modificación de las condiciones de temperatura y ventilación:** con la finalidad de afectar la germinación de las esporas del patógeno se recomienda el aumento de la temperatura y el incremento de la ventilación con el fin de reducir la humedad relativa entre las plantas y el invernadero entero. Adicionalmente, se recomienda la reducción de la densidad de plantación, lo que contribuye a mejorar la ventilación derivada de la reducción de la biomasa vegetal (Elad y Shtienber, 1995).
- **Modificación de las condiciones de luz:** debido a la importancia de la luz para inducir la esporulación de los hongos, se recomienda utilizar una cubierta con capacidad de absorción de luz UV para evitar la radiación de cercana a 300-400 nm (Elad y Shtienberg, 1995).

2.4.4.5.2 Biológico

En la actualidad se tiene la necesidad de encontrar estrategias inocuas y no dañinas al ambiente, por lo que el control biológico es ampliamente estudiado. El control biológico de enfermedades se refiere a cualquier condición o práctica por medio de la cual la supervivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de la mediación de otros organismos, excepto el hombre, con la consecuente disminución de la incidencia de la enfermedad (Memenza, 2009).

A través del uso de agentes de control biológico se han demostrado efectos benéficos para los cultivos; además, la evidencia científica muestra que tienen potencial en comparación con productos químicos para el control de plagas y enfermedades. Esto ha sido demostrado por Llanos (2017), quien contrastó la eficacia *in vitro* y en campo de fungicidas químicos y biológicos frente a *B. cinerea* en el cultivo de fresa; como resultados reportó que los fungicidas Pirimetanil y Fenhexamid inhibieron el 100 % del crecimiento micelial, al igual que la cepa QST713 de *Bacillus subtilis*, la cual a su vez fue más efectiva que el fungicida carbendazim esto a nivel *in vitro* y en campo estos mismos productos tuvieron 5.24, 5.63 y 7.81 % respectivamente de frutos con presencia de *B. cinerea* siendo estos y el fungicida Trifloxystrobin los más efectivos, cabe destacar que en campo quien tuvo mayor control fue el fungicida Trifloxystrobin.

Actualmente se conocen organismos capaces de hacer frente a *B. cinerea*, entre los cuales se han reportado hongos del género *Trichoderma*, entre estos: *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. barbatum*, *T. tomentosum* (Cuadro 3), el cual es bien conocido por su capacidad de control a través de sus diversos mecanismos de acción (López, 2023; Téllez, 2022; Alonso, 2020; Matute, 2019; Agrios, 2016; Memenza, 2009; Rodríguez *et al.*, 2008). También se han reportado especies de levaduras como *Metschnikowia pulcherrima* (Carrillo, 2020), *Rhodotorula* sp. y *Cryptococcus* sp. (Mónaco, 2006), cianobacterias del género *Klebsormidium* (Valido, 2022), esta última con efecto estimulante de crecimiento vegetal, aun con presencia de *B. cinerea* (Valido, 2022; Carillo, 2020; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006).

Otros organismos ampliamente estudiados son bacterias, tales como las pertenecientes al género *Bacillus*; entre las que se encuentran *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilis*, *B. methylotrophicus* (Ren *et al.*, 2022; Téllez, 2022; Rochette *et al.*, 2022; Carrillo, 2020; Bu *et al.*, 2021; Nakkeeran *et al.*, 2020; Edwards y Seddon, 1992); por otro lado, también se reporta a las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Paenibacillus elgii* (Kong *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2019; Tan, 1991; Cuadro 3).

Cuadro 3. Especies de bacterias, cianobacterias y hongos reportadas como agentes de control biológico frente a *B. cinerea*.

Nombre científico	Microorganismo	Fuente
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bacteria	Nakkeeran <i>et al.</i> (2020)
<i>B. brevis</i>	Bacteria	Edwards y Seddon (1992)
<i>B. methylotrophicus</i>	Bacteria	Carrillo (2020)
<i>B. pumilus</i>	Bacteria	Rochette <i>et al.</i> (2022)
<i>B. subtilis</i>	Bacteria	Téllez (2022), Rochette <i>et al.</i> (2022), Bu <i>et al.</i> (2021), Carrillo (2020), Pavone (2020)
<i>B. velezensis</i>	Bacteria	Ren <i>et al.</i> (2022)
<i>Burkholderia</i> sp.	Bacteria	Kong <i>et al.</i> (2020)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacteria	Tan (1991)
<i>Paenibacillus elgii</i>	Bacteria	Kim <i>et al.</i> (2019)
<i>Klebsormidium</i> sp.	Cianobacteria	Valido (2022)
<i>Trichoderma asperellum</i>	Hongo	Rodríguez <i>et al.</i> (2008), López (2023), Alonso (2020)
<i>T. barbatum</i>	Hongo	Alonso (2020)
<i>T. harzianum</i>	Hongo	Téllez (2022), Agrios (2016), Matute (2019), Alonso (2020)
<i>T. tomentosum</i>	Hongo	Alonso (2020)
<i>T. viride</i>	Hongo	Memenza (2009)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Levadura	Carrillo (2020)
<i>Rhodotorula</i> sp.	Levadura	Mónaco (2006)
<i>Cryptococcus</i> sp.	Levadura	Mónaco (2006)

2.4.4.5.3 Aceites esenciales y extractos acuosos

Una alternativa para el manejo de fitopatógenos es la utilización de aceites esenciales (AE) y extractos acuosos (EA) de diferentes especies vegetales, los cuales se consideran inocuos al ambiente (de Souza, 2016). Los AE contienen metabolitos secundarios que se caracterizan por su aroma generalmente agradable e intenso; están conformados por gran variedad de sustancias volátiles compuestas por hidrocarburos terpénicos, sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas, así como éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides y otros (Camargo y Rodríguez, 2008). Por su parte, los EA se obtienen a partir de materia vegetal desecada o fresca, entre los metabolitos secundarios que poseen se encuentran saponinas, taninos y flavonoides (Mena *et al.*, 2015).

Hoy en día se han reportado diversos AE y EA que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *B. cinerea* (Taborda *et al.*, 2015); entre los que se encuentran los obtenidos a partir de eucalipto (*Eucalyptus staigeriana* F. Muell), menta (*Mentha piperita* L.) (Téllez, 2022), ajo (*Allium sativum* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) (Hernández 2022), de ruda (*Ruta graveolens* L.) (Jimenez y Mosquera, 2014), clavo de olor (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) (Mendoza, 2021), cítricos, entre otros (Cuadro 4).

En lo relacionado con AE Jiménez y Mosquera (2014) reportaron que los provenientes de ruda (*Ruta graveolens* L.) inhibieron la germinación de conidios en un 57.5 % con un valor de CIM (Concentración mínima inhibitoria) de 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, lo que fue atribuido a metabolitos secundarios como cumarinas, flavonoides y alcaloides. Por su parte, Hernández *et al.* (2007) demostraron la capacidad de dicha especie para inhibir la germinación de esporas de *B. cinerea*. A tales estudios se suman los realizados por Mendoza (2021), quien demostró que los AE de canela y clavo al 0.03 % tuvieron una efectividad biológica *in vitro* del 100 y 80.56 %, respectivamente. Por otro lado, Lagos (2018) utilizó 1.4 mL L⁻¹ de AE de canela, a partir de lo cual registró inhibición de la germinación de conidios de 55.3 %, además del retraso del crecimiento del tubo germinativo, con la dosis de 0.9 mL L⁻¹ se observó calcinación y en algunos casos desprendimiento del tubo germinativo.

Otras de las especies que han sido evaluadas a nivel *in vitro* son los cítricos. Al respecto Ruiz y Ramos (2021) reportaron 68 % de inhibición de crecimiento micelial del patógeno al

utilizar AE de *Citrus x aurantifolia* (limón sutil); en otras evaluaciones Alarcón-García *et al.* (2015) encontraron que el AE de limón a 11000 ppm inhibió el crecimiento del hongo entre 24 a 28 %.

Con respecto a EA evaluados a nivel *in vitro*, autores como Felicia *et al.* (2022) reportaron que el de canela al 15 % inhibió el 100 % del crecimiento micelial de *B. cinerea*. De manera similar Hernández (2022) evaluó las concentraciones de 15 y 10 %, obteniendo como resultados una efectividad biológica de 100 y 96.5 % respectivamente. Otros autores como Velosa *et al.* (2003) reportan que a la concentración de 50 % (en hidrolato y de purín), dicha especie vegetal redujo el crecimiento micelial, la esporulación y la formación de esclerocios del patógeno. Por su parte, Pazmiño *et al.* (2017) demostraron que al usar el EA al 1.5 % en frutos de fresa se redujo la incidencia en un 75 % y la severidad en un 88.2 %, atribuyendo su efecto a los metabolitos secundarios y a la composición de eugenol y cinamaldehido, los cuales tienen efecto inhibitorio de enzimas (cinamaldehido) y deterioro de pared celular (eugenol).

Por otra parte, Rueda *et al.* (2013) registraron que los EA de cítricos (producto comercial Inver-Agroinsums) a 666 y 8000 ppm, retardaron la manifestación de síntomas de *B. cinerea* en cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill var. Roma). Otros autores como Alarcón-García *et al.* (2015) reportaron que para *B. cinerea* el AE de limón mostró efecto antifúngico contra el crecimiento micelial al usar una concentración de 11000 ppm.

Cuadro 4. Aceites esenciales y extractos usados para el control de *B. cinerea*.

Espece vegetal	AE/ EA*	Fuente
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	AE y EA	Téllez (2022), Hernández (2022), Mendoza (2021), Lagos (2018), Pazmiño <i>et al.</i> (2017), Barrera y García (2008), Velosa <i>et al.</i> (2003)
Extractos de cítricos	Producto comercial (Inver-Agroinsums)	Rueda <i>et al.</i> (2013)
<i>Citrus x aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	AE	Ruiz y Ramos (2021)
Limón	AE	Alarcón-García <i>et al.</i> (2015)
<i>Origanum vulgare</i> L.	AE	Ruiz (2018)
<i>Syzygium aromaticum</i> L.	AE	Mendoza (2021), Fuentes (2013), Barrera y García (2008)
<i>Thymus vulgaris</i> L.	AE	Fuentes (2013), Herrera y Carolina (2012), Barrera y García (2008)
<i>Eucalyptus staigeriana</i> F. Muell	AE	Téllez (2022)
<i>Lippia origanoides</i> Kunth	AE	Taborda <i>et al.</i> (2015)
<i>Teloxys ambrosoides</i> (L.) W. A. Weber	AE	Barrera y García (2008)
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel	AE	Téllez (2022)
<i>Mentha piperita</i> L.	AE	Téllez (2022)
<i>Minthostachys mollis</i> (Benth.) Griseb.	AE	León <i>et al.</i> (2023)

* AE: aceite esencial; EA: extracto acuoso.

2.4.4.5.4 Sales cuaternarias

Las sales cuaternarias son un tipo de biocida agrupadas en los agentes no oxidantes; dentro de estos se encuentra el sulfato de cobre (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), fenoles clorados, oxido de tributilestaño y los compuestos cuaternarios de amonio. Las sales cuaternarias de amonio poseen un espectro de acción algo específico (Aguilar, 2000); de manera particular, tienen mayor eficacia frente a bacterias, aunque su efectividad es menor en las gramnegativas (Salazar, 2019), así contra esporas de bacterias, mycobacterias, hongos, pseudomonas, cryptosporidia y virus hidrófilos (Chavarro, 2009). Dentro de las sales cuaternarias de amonio más utilizadas se encuentran:

- Cloruro de benzalconio: usado para combatir bacterias, virus y hongos. Además, se utiliza como antiséptico y desinfectante de la piel (Salazar, 2019).
- Cetrimida: es un antiséptico de amplio espectro, efectivo contra bacterias grampositivas. También es usado para tratar quemaduras, heridas de la piel y para la limpieza y desinfección de utensilios (Salazar, 2019).
- Hexadecilpiridinio (HDPC): antibacteriano con función conservante y desinfectante. Efectivo frente a las bacterias *B. cereus* y *B. weihenstephanensis* en verduras crudas (Cobo *et al.*, 2008).
- Clorhexidina: posee amplio espectro de acción, activo contra bacterias grampositivas y negativas, es usado como desinfectante en productos farmacéuticos y cosméticos (Hugo y Russell, 1982).
- Bisfenoles, hexachlorofeno y triclosan: son algunas otras sales cuaternarias usadas para la lucha contra las bacterias. Son usados en sectores sanitarios, e incluso en salas quirúrgicas (Salazar, 2019).

2.4.4.5.5 Químico

Un buen uso de fungicidas químicos involucra hacer una correcta rotación de ingredientes activos (i. a.) con diferentes modos de acción, para con esto retrasar la aparición de resistencia; además de que es necesaria la aplicación de otras medidas, tales como culturales

y usar el control biológico o una alternativa más amigable con el ambiente y dejar como último recurso los fungicidas químicos.

Existen gran número de fungicidas ampliamente recomendados para el manejo de *B. cinerea*. En el cuadro 5 se indican los ingredientes activos y su modo de acción según la FRAC (2024). Entre estos se reportan productos con actividad multisitio, tales como clorotalonil, thiram, dietilditiocarbamato y captan (Vera, 2022; Agrios, 2016; Bernal, 2009; Leroux, 2007; Englehard, 1980; Diaz *et al.*, 1996), aunque también se hace uso de i. a. con formas de acción más específicas; por ejemplo, aquellos que afectan la respiración, como azoxtrobina, boscalida, fluxapyroxad, dicloran y fluazinam (Agrios, 2016; Leroux, 2007).

Cuadro 5 Ingredientes activos, grupo químico y mecanismos de acción de los fungicidas utilizados con mayor frecuencia para el manejo de *Botrytis* spp.

Ingrediente activo	Grupo químico	Modo de acción	Fuente
Pirimetanil	Anilino-pirimidinas	Inhibición de la síntesis de aminoácidos y proteínas	Vera (2022), Leroux (2007)
Prochloraz	Imidazoles	Inhibición de la biosíntesis de esterol en las membranas	Leroux (2007)
Benomilo	Benzimidazoles	Inhibición de la mitosis celular	Agrios (2016), Ponce-González <i>et al.</i> (2002), Englehard (1980)
Boscalida	Piridin-carboxamidas	Inhibición del complejo II en la mitocondria	Leroux (2007)
Thiabendazol	Benzimidazoles	Inhibición de la división celular	Vera (2022), Ponce-González <i>et al.</i> (2002)
Carbendazin	Benzimidazoles	Inhibición de la división celular	Leroux (2007)

Ingrediente activo	Grupo químico	Modo de acción	Fuente
Clorotalonil	Cloronitrilos (ftalonitrilos)	Productos químicos con actividad multisitio	Vera (2022), Agrios (2016), Bernal (2009), Leroux (2007), Englehard (1980)
Tiofanato metilico	Tiofanatos	Inhibe el desarrollo de las subunidades de β -tubulina en la mitosis	Vera (2022)
Fluxapyroxad	Pirazol-4-carboxamidas	Inhibidor del complejo proteico succinato deshidrogenasa	Agrios (2016), Leroux (2007)
Ciprodinil	Anilino-pirimidinas	Inhibición de la síntesis de aminoácidos y proteínas	Bernal (2009), Leroux (2007)
Cymoxanil	Cianoacetamida-oximas	Modo de acción desconocido	Leroux (2007)
Tebuconazol	Triazoles	Inhibición de la biosíntesis de esterol en las membranas	Leroux (2007)
Thiram	Ditiocarbamatos y relacionados	Productos químicos con actividad multisitio	Agrios (2016), Leroux (2007)
Dietilditiocarbamato	Ditiocarbamatos y relacionados	Productos químicos con actividad multisitio	Leroux (2007)
Fenhexamida	Hidroxianilidas	Inhibición de la biosíntesis de esterol en las membranas	Bernal (2009), Leroux (2007)

Ingrediente activo	Grupo químico	Modo de acción	Fuente
Dicloran	2,6-dinitro-anilinas	Desacoplador de la fosforilación oxidativa	Agrios (2016)
Procimidone	Dicarboxiamida	Afecta la kinasa de histidina activada por mitógeno, en la transducción de la señal osmótica	Leroux (2007)
Dietofencarb	N-fenil carbamatos	Inhibe el ensamblaje de la Beta tubulina en la mitosis celular	Leroux (2007)
Fluazinam	2-6-dinitro-anilinas	Desacoplador de la fosforilación oxidativa	Leroux (2007)
Folpet	Ftalimidas	Productos químicos con actividad multisitio	Leroux (2007)
Captan	Ftalimidas	Productos químicos con actividad multisitio	Diaz <i>et al.</i> (1996), Englehard (1980)
Iprodiona	Dicarboxiamida	Afecta la transducción de señales -MAP histidina Kinasa (os-1, Daf1)	Agrios (2016), Bernal (2009), Diaz <i>et al.</i> (1996)
Fludioxonil	Fenilpirroles	Afecta la transducción de señales -MAP histidina Kinasa (os-2, HOG1)	Bernal (2009), Leroux (2007)

Ingrediente activo	Grupo químico	Modo de acción	Fuente
Vinclozolin	Dicarboxiamida	Afecta la transducción de señales -MAP histidina Kinasa (os-1, Daf1)	Agrios (2016)

Grupo químico y modo de acción información extraída de: FRAC, 2019.

2.4.4.5.1 Fungicidas utilizados para el manejo de *B. cinerea* en la zona florícola del Estado de México

Entre los fungicidas utilizados en la región florícola del Estado de México se encuentran i. a. con diferente modo de acción (García, 2017; SEMARNAT-INECC, s/f). Entre los más utilizados están el pirimetanil y procloraz. El primero pertenece al grupo químico de las anilino-pirimidinas, las cuales afectan la síntesis de metionina. El procloraz pertenece al grupo de los imidazoles, que inhiben la biosíntesis de esterol en las membranas, estos son fungicidas sistémicos con propiedades curativas y protectora (Zhang *et al.*, 2019).

De manera particular el pirimetanil (Figura 5) actúa inhibiendo la síntesis de aminoácidos y proteínas. Se reporta que en cultivos como jitomate, papa, fresa y rosa actúa frente a *B. cinerea* (Acosta, 2023), en los que inhibe el crecimiento micelial, disminuye la germinación de conidios y el desarrollo del tubo de germinación (Debasa, 2020).

Por su parte, el procloraz (Figura 6) afecta la transducción del gen que codifica para la proteína CYP51/ERG11, la cual tiene la función de la eliminación oxidativa de grupos metilo de precursores que después se transforman en el ergosterol, el cual es de importancia en la membrana celular de los hongos. También reduce la elongación del micelio, afecta la eliminación del oxígeno reactivo, resultando en la disminución de la virulencia de los hongos (Zhang *et al.*, 2019).

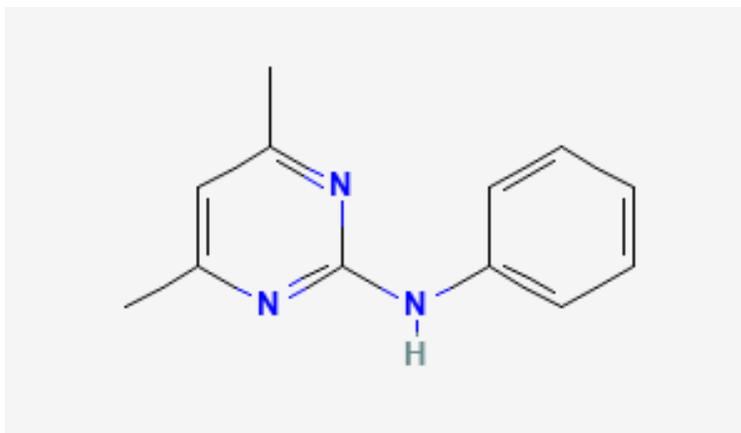


Figura 5. Estructura química de pirimetanil (FRAC, 2024).

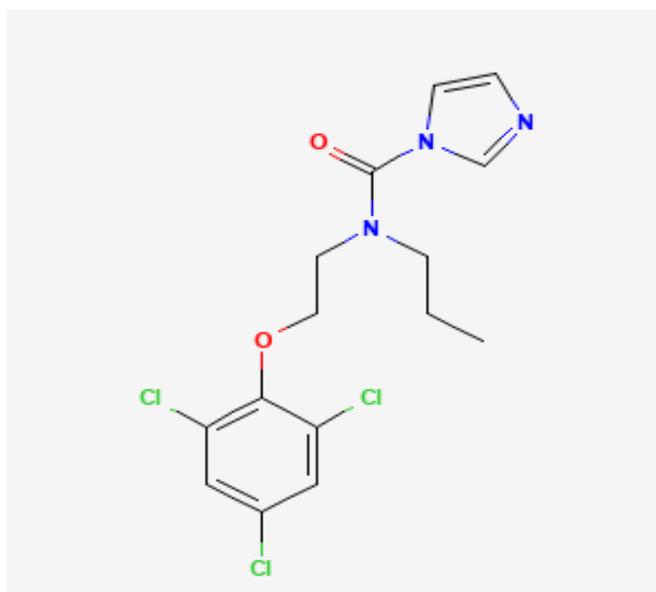


Figura 6. Estructura química de procloraz (FRAC, 2024).

2.5 Resistencia a fungicidas

El mal uso y excesivo de fungicidas químicos en la agricultura acelera significativamente el desarrollo de resistencia, la cual se refiere a la insensibilidad adquirida y heredable de un hongo a un agente antifúngico (o fungicida) específico. Bajo condiciones de campo se refiere a la pérdida de control debido a la alta proporción de cepas resistentes en la población de patógenos. La resistencia es un proceso evolutivo, los fungicidas crean un filtro de resistencia ejerciendo presión de selección dejando a los organismos resistentes y eliminando a los susceptibles (FRAC, 2019).

De acuerdo con el FRAC (2019), existen diferentes mecanismos a través de los cuales se desarrolla la resistencia en los hongos, entre los que se encuentran:

- Alteración bioquímica del sitio de acción: es el mecanismo de resistencia más común. Esta modificación es generada por un cambio en la secuencia genética codificadora de la enzima o proteína que constituye el sitio de acción en el hongo. Es habitual que el hongo resistente porte una mutación genética en el sitio de acción; cuando esto ocurre, la interacción entre el compuesto y el sitio de acción se ve afectada y el compuesto pierde su eficacia fungicida.
- Detoxificación del fungicida: a través de un mecanismo metabólico el hongo es capaz de modificar el fungicida para que ya no sea perjudicial para la célula. Algunos fungicidas necesitan ser metabolizados en la célula del hongo para pasar a la forma activa; no obstante, con el metabolismo alterado el paso de la activación podría no suceder y el fungicida no pasaría a la forma activa.
- Sobreexpresión del sitio de acción: la producción de enzimas adicionales en el sitio de acción (es decir, sobreexpresión del sitio de acción) puede aumentar la probabilidad de que una cantidad suficiente del sustrato fúngico sea capaz de unirse a la enzima del sitio objetivo, por lo que los procesos celulares como la respiración pueden producirse hasta cierto punto.
- Exclusión o expulsión desde el sitio de acción: las bombas de flujo existen naturalmente dentro de la célula para excluir o expulsar sustancias extrañas o para exportar sustancias endógenas. A pesar de estas bombas de flujo, la mayoría de los fungicidas pueden alcanzar concentraciones eficaces dentro de la célula e inhibir los procesos celulares. Ocasionalmente, estos transportadores tienen éxito expulsando suficiente fungicida como para que el aislado tenga una sensibilidad reducida.

2.5.1 Tipos de resistencia

De acuerdo con Latin (2011), existen cuatro tipos de resistencia, estas son; la monogénica, la poligenética, la resistencia cruzada y la múltiple, los cuales se describen a continuación:

- Monogénica: la mutación se da como resultado de un cambio en un solo gen principal, el cambio a población resistente es rápida con presión de selección repetida.
- Poligenética: la mutación se da en genes menores que causan insensibilidad a los fungicidas y el cambio a población resistente es gradual.
- Resistencia cruzada: esta ocurre cuando individuos o una cepa resistente a un fungicida dado es también resistente a otros fungicidas dentro de la misma clase química.
- Resistencia múltiple: ocurre cuando individuos o una cepa resistente a un fungicida, en una cierta clase química, también pose resistencia a una clase química distinta.

2.5.2 Resistencia a fungicidas por parte de *B. cinerea*

De acuerdo con datos del FRAC (2019), *Botrytis* spp. es uno de los hongos que presenta el mayor riesgo de desarrollar resistencia a fungicidas, lo cual ha sido reportado en diversos casos alrededor del mundo. Por ejemplo, en Grecia, China y México existen cepas resistentes de *B. cinerea* a pirimetanil, las cuales presentan mayor capacidad de esporulación en comparación con cepas sensibles (Carvajal, 2019; Sun *et al.*, 2010; Bardas *et al.*, 2008). Algo interesante y bien conocido es la resistencia cruzada encontrada por Latorre *et al.* (2002) en Chile donde aislados resistentes a ciprodinil, también mostraron resistencia a pirimetanil.

En la región florícola de Villa Guerrero, Estado de México, Ponce-González *et al.* (2002) confirmaron la resistencia de *B. cinerea* a los i. a. benomil y tiabendazol al comparar una cepa sensible y cepas provenientes de cultivos de rosa (*Rosa* spp.), gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Andrews.) y gerbera (*Gerbera jamesonii* Adlam.). Para el caso de benomil los autores registraron que la concentración efectiva (CE) 50 y 95 para la cepa sensible fue de 0.055 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente; mientras que para las provenientes de cultivos, la CE₅₀ estuvo entre 250.59 y 81.68 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de lo cual se obtuvo un factor

de resistencia (FR) de entre 4,555.18 y 14,120.45, con relación al testigo susceptible; en lo que respecta a la CE₉₅ estuvo de entre 12,241.09 y 18,279.08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y el FR fluctuó de 24,980.63 a 37, 303.24. Para tiabendazol el aislamiento sensible tuvo una CE₅₀ de 0.028 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y CE₉₅ de 0.327 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente; mientras que en el caso de los aislados de cultivos se obtuvo una CE₅₀ de 88.51 a 129.96 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con un FR de 3,160.00 a 4,440.42, y en una CE₉₅ de 2830.00 a 10, 839.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un FR de 8,635.43 a 33,146.78.

Por otro lado, Camacho (2009) aisló 15 cepas de *B. cinerea* de cultivos de rosa provenientes de los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas, Estado de México, a partir de las cuales realizó pruebas de sensibilidad a los i. a. procloraz, tiabendazol, iprodiona, metalaxil-m y clorotalonil, a partir de lo cual reportó diferentes grados de pérdida de sensibilidad. Como resultados describe que las 15 cepas han perdido sensibilidad a tiabendazol; las cepas de Tenancingo mostraron pérdida de sensibilidad a procloraz (TBc1, TBc2, TBc3, TBc4, TBc5) y cuatro a iprodiona (TBc1, TBc3, TBc4, TBc5); para el caso de las provenientes de Villa Guerrero, una cepa manifestó pérdida de sensibilidad a procloraz (VBc5) y tres a iprodiona (VBc2, VBc4, VBc5); mientras que en el caso de las aisladas de Coatepec Harinas, la autora reporta que todas las cepas manifestaron pérdida de sensibilidad a tiabendazol y clorotalonil, una de las cuales también perdió sensibilidad a metalaxil-m (CBc5).

También en la región florícola del Estado de México, López (2019) determinó la DL₅₀ y la DL₉₅ de tiabendazol para dos cepas de *B. cinerea*, una proveniente de Tenancingo (TBc2) y otra de Villa Guerrero (VBc1). Como resultados reporta que para la cepa TBc2 la DL₅₀ fue de 0.0394 g de i. a. L⁻¹ y la DL₉₅ de 0.8673 g de i. a. L⁻¹; mientras que para la VBc1 la DL₅₀ fue de 0.0576 g de i. a. L⁻¹ y la DL₉₅ 6.047 g de i. a. L⁻¹. Con estos hallazgos la autora demostró que, tomando de base la dosis recomendada por el fabricante del producto (0.6 g de i. a. L⁻¹), se requiere 907.94 y 44.6 % más i. a. para alcanzar una mortalidad del 95 %, para el caso de las cepas VBc1 y TBc2, respectivamente. Resultados similares los obtuvieron Manzanos-Ayala *et. al.* (2009) tras evaluar este mismo i. a. en una cepa aislada del cultivo de rosa del municipio de Coatepec Harinas, se obtuvo que la DL₅₀ fue de 0.0263 g de i. a. L⁻¹ y la DL₉₅ de 3.123 g de i. a. L⁻¹.

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de statice tiene importancia económica en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México, ya que en el año 2020 con una superficie de 32 ha fue capaz de generar \$ MXN 14,985,400. Entre los patógenos que le afectan se encuentra *Botrytis cinerea*, cuyos síntomas se manifiestan como pudrición grisácea de corona, hojas, tallos y flores, pudrición seca de la parte basal, hasta provocar la muerte total de la planta. Derivado de tales daños la productividad y calidad del statice se reduce considerablemente.

En dicha región, el principal método de manejo es el químico utilizando fungicidas entre los cuales se encuentra benomil y tiabendazol, a los que de acuerdo con estudios anteriores el patógeno ha desarrollado resistencia; además, se ha reportado la pérdida de sensibilidad a procloraz, clorotalonil, iprodiona, por lo que se corre el riesgo de desarrollar resistencia a estos i. a. En este sentido, se debe hacer un empleo adecuado de fungicidas con una rotación y una complementación con otros métodos. Por lo que se planteó por objetivo aislar al agente causal de la pudrición grisácea en la inflorescencia de statice y evaluar la sensibilidad *in vitro* a fungicidas y a productos de bajo impacto ambiental.

4. HIPÓTESIS

Botrytis cinerea es el agente causal de la pudrición grisácea en inflorescencias de *statice* en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México, el cual ha perdido sensibilidad a los fungicidas utilizados para su manejo en la región.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Aislar al agente causal de la pudrición grisácea en la inflorescencia de *statice* y evaluar su sensibilidad *in vitro* a fungicidas y a productos de bajo impacto ambiental.

5.2. Objetivos específicos

Aislar y purificar al agente asociado a la pudrición grisácea en la inflorescencia de *statice*.

Identificar morfológica y molecularmente al hongo asociado a la pudrición grisácea en *statice*.

Determinar la patogenicidad del hongo asociado a la pudrición grisácea en *statice*.

Evaluar la sensibilidad *in vitro* del agente causal de la pudrición grisácea en *statice* a fungicidas y a productos de bajo impacto ambiental.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Ubicación de la investigación

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

6.2. Colecta de material vegetal enfermo

La colecta de material vegetal se realizó en la localidad de San Diego, municipio de Villa Guerrero, Estado de México, ubicada en 19.009035 norte, -99.654215 oeste, con una altitud de 2,159 msnm. Para lo cual se realizaron muestreos en cultivos comerciales de statice y se colectaron plantas con signos y síntomas de la enfermedad conocida como la pudrición grisácea de la flor, para posteriormente realizar el aislamiento del patógeno. Para esto se colectaron 10 plantas completas, considerando aquellas que presentaron los siguientes síntomas: pudrición en la flor (Figura 7-A), tallo (Figura 7-B y C) o corona (Figura 7-D) y marchitamiento total o parcial de la planta. Las plantas se transportaron al Laboratorio de Fitopatología, donde se realizó un lavado de las raíces con agua potable, para posteriormente colocarlas en un recipiente en hidratación hasta su análisis.

6.3. Preparación de medio de cultivo

Se preparó medio de cultivo papa, dextrosa, agar (PDA, marca BD Bioxon®), para lo cual se utilizaron 39 g de medio de cultivo y se mezcló con 1 L de agua destilada en un matraz Erlenmeyer; enseguida se procedió a la esterilización en autoclave (Felisa®) a 120 °C y presión de 1.5 kg cm² durante 15 minutos. Una vez terminado el proceso de esterilización se dejó enfriar el medio hasta ser tolerable al tacto para su manejo y en condiciones asépticas bajo una campana de flujo laminar vertical (Scorpion Scientific®) se vació en cajas de Petri de cristal estériles (Kimax®); al solidificar se sellaron y se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio (21 ± 2 °C, 72 ± 5 % HR) para su conservación hasta su posterior uso.



Figura 7. Síntomas típicos de la pudrición grisácea en plantas de statice colectadas en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México: A) flores pudrición grisácea; B) tallo con pudrición en la base; C) tallo con necrosis en todo el largo del tallo y amarillamiento de hojas superiores al daño; D) corona dañada con necrosis y desarrollo de moho gris producido de la parte necrosada.

6.4. Aislamiento y purificación de *Botrytis cinerea*

De las muestras de flor y corona se realizaron cortes de 0.5 cm de la zona cercana a la parte enferma, enseguida se aplicó un proceso de desinfección con NaClO al 2 % durante 1 minuto, al finalizar se realizó un triple enjuague con agua destilada estéril, se secó con papel

absorbente estéril, y se sembraron cuatro cortes de tejido en cajas de Petri con medio PDA (Figura 8). Las siembras se mantuvieron a temperatura ambiente (21 ± 2 °C) y se revisaron diariamente; una vez que se detectó crecimiento micelial se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo PDA como parte del proceso de purificación.

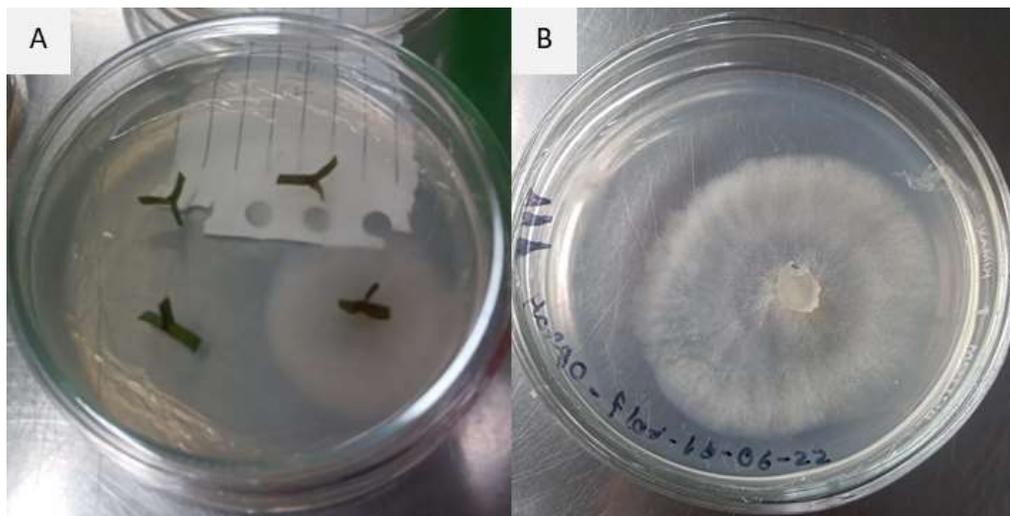


Figura 8. Siembras en medio de cultivo PDA de tejido de statice con síntomas de pudrición grisácea y purificación. A) Siembra de cuatro fragmentos de tejido, B) purificación.

6.5. Obtención de cultivos monospóricos

A partir de los aislamientos obtenidos se realizaron cultivos monospóricos. Esta técnica consistió en colocar 15 mL de agua destilada estéril a la colonia de *Botrytis* spp. con crecimiento de 20 días, posteriormente con una varilla de aluminio estéril se desprendieron y dispersaron los conidios y una alícuota de 1 mL de la suspensión fue transferida a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, a partir de la que se realizaron tres diluciones seriadas tomando cada tubo una alícuota de 1 mL que se incorporó en medio de cultivo PDA y se dispersó con una varilla de aluminio estéril. Las siembras se revisaron cada 24 horas; una vez que se detectó crecimiento micelial, por separado se transfirieron las seis colonias monospóricas de mayor tamaño a una nueva caja de Petri con medio de cultivo PDA.

Cada 24 h, con el apoyo de un marcador indeleble de punto fino, se trazó el crecimiento radial hasta que al menos un monospórico cubrió por completo el medio de cultivo de la caja de Petri. Posteriormente se tomaron fotografías y se determinó el área de crecimiento micelial

con el programa ImageJ (versión 1.43). Los datos se analizaron con una regresión lineal simple con el programa InfoStat versión estudiantil, y a partir de esta información se determinó la tasa de crecimiento micelial.

6.6. Identificación

6.6.1. Identificación morfológica

Las cepas del patógeno se identificaron a nivel de especie de acuerdo con sus características morfológicas con el apoyo de claves taxonómicas y literatura especializada (Terrones-Salgado *et al.*, 2019; Álvarez, 2012; Camacho, 2009; Carbú, 2006; Barnet y Hunter, 1998), se consideraron las características culturales de las colonias crecidas en medio de cultivo PDA tales como color y textura del micelio, así como características morfológicas entre estas: la agrupación de los conidios en los conidióforos, así como su tamaño y forma; tamaño y forma de microconidios y esclerocios. Para obtener el tamaño se midieron y promediaron 30 de cada una de estas estructuras por medio del uso de un microscopio compuesto (Carl Zeiss®).

6.6.2. Identificación molecular

Se transfirió una porción del crecimiento micelial de los aislados para realizar la extracción de ADN. Se empleó el Kit de extracción E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Enseguida se realizó la amplificación de las regiones internas de los genes ribosomales 18S–5.8S y 5.8S–28S con los primers universales ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White *et al.*, 1990).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador TProfessional estándar (Biometra®, Alemania) en un volumen final de 25 µL con los siguientes reactivos: Taq DNA Buffer PCR 1X, MgCl₂ 0.75 mM, dNTP's 0.2mM, Platinum Taq DNA polymerase 1U (Invitrogen®, USA), 10 µM de cada primer y 80 ng de ADN total. El programa de amplificación fue el siguiente: 96 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 45 s, seguido de una extensión final a 72 °C por 4 min. Se verificó la presencia del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, la tinción se

realizó con bromuro de etidio (5 mg L⁻¹) y los geles se documentaron en el fotodocumentador Gel Doc (Bio-Rad®, USA).

Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones (5'– 3' y 3'– 5') por la compañía Macrogen (<https://dna.macrogen.com/>). Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit versión 7.0.0. (Hall, 1999). El análisis filogenético se realizó utilizando el programa en MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021), utilizando el procedimiento de máxima verosimilitud (ML). El modelo de sustitución de nucleótidos utilizado fue Kimura 2 parámetros y el análisis de bootstrapping fue de 100 repeticiones, usando 27 secuencias referidas en el cuadro 6. Se utilizó a la secuencia de *Pestalotiopsis ellipospora* MFLUCC 12-0282 (JX398980) como grupo externo.

Cuadro 6. Datos de las secuencias de *Botrytis* spp. utilizadas para el análisis filogenético.

Especie	Cepa	Número de acceso al GenBank	Fuente
<i>B. aclada</i>	PRI006a	AJ716295	
<i>B. calthae</i>	CBS 175.63	AJ716302	
<i>B. cinerea</i>	SAS56	AJ716294	
<i>B. elliptica</i>	BE9714	AJ716300	
<i>B. convoluta</i>	9801	AJ716304	
<i>B. ficariarum</i>	CBS 176.63	AJ716296	Staats <i>et al.</i> (2005)
<i>B. hyacinthi</i>	0001f	AJ716297	
<i>B. paeoniae</i>	0003k	AJ716298	
<i>B. polyblastis</i>	CBS287.38d	AJ716291	
<i>B. porri</i>	MUCL3234b	AJ716293	
<i>B. tulipae</i>	BT9830	AJ745713	
<i>B. squamosa</i>	PRI026a	AJ716299	

Especie	Cepa	Número de acceso al GenBank	Fuente
<i>B. californica</i>	X503	KJ937038	
<i>B. californica</i>	X655	KJ937039	
<i>B. californica</i>	X1348	KJ937041	Saito <i>et al.</i> (2016)
<i>B. californica</i>	X1482	KJ937042	
<i>B. cinerea</i>	X622	KJ937045	
<i>B. cinerea</i>	207cb	KU173120	
<i>B. cinerea</i>	207e	KU173121	
<i>B. cinerea</i>	407cb	KU173122	
<i>B. cinerea</i>	407da	KU173123	
<i>B. cinerea</i>	207a	KU173124	Wang <i>et al.</i> (2002)
<i>B. cinerea</i>	111bb	KU173125	
<i>B. cinerea</i>	101V3Dd	KU173126	
<i>B. cinerea</i>	207db	KU173128	

6.7. Determinación de patogenicidad

La patogenicidad de las cepas obtenidas se determinó en plantas de *statice* cultivadas en laboratorio.

6.7.1. Siembra de plantas de *statice*

Para la germinación y desarrollo de las plantas de *statice* se utilizó como sustrato una mezcla de turba y perlita en una composición de 2:1, el cual se humedeció y colocó en sacos de tela de manta y se sometió a un proceso de esterilización a 120 °C y presión de 1.5 kg cm² durante 15 minutos por tres ciclos. Cabe señalar que entre ciclos se dejó enfriar el sustrato a temperatura ambiente.

Una vez concluido el proceso de esterilización se realizó la siembra, para esto el sustrato estéril fue colocado en una charola para germinación de 120 cavidades. En cada cavidad se colocó una semilla de *L. sinuatum* variedad Qis White (BallSed®), posteriormente se mantuvo a temperatura de 21 ± 2 °C por alrededor de un mes con dos riegos por semana con agua potable. Pasado este tiempo se realizó el trasplante colocando una plántula en vasos de unicel de volumen de 355 mL. Las plántulas se mantuvieron en una incubadora de crecimiento de plantas, con temperatura de 22 °C y con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 oscuridad (Figura 9), continuando con dos riegos por semana.

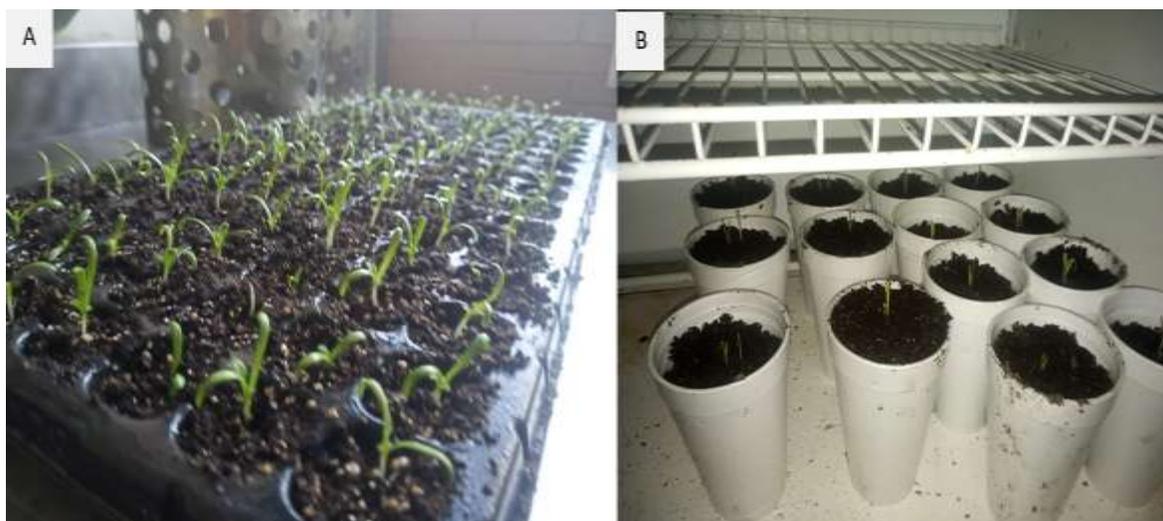


Figura 9. Incubación de plántulas de statice. A) Charola de 120 cavidades con plántulas de statice un mes después de la siembra, B) trasplante e incubación.

6.7.2. Cepas de *Botrytis* spp.

Se determinó la patogenicidad de las cepas de *Botrytis* aisladas, las cuales se cultivaron en medio PDA durante cinco días.

6.7.3. Inoculación de *Botrytis* spp.

El proceso de inoculación se realizó en plantas de statice de tres meses de edad. Para esto, en la zona apical se colocó un disco de medio de cultivo de 5 mm de diámetro con crecimiento de *Botrytis* spp. (Figura 10), utilizando pinzas de disección previamente esterilizadas. Es importante señalar que se tuvo el cuidado de que el micelio estuviera en contacto directo con la planta. El testigo consistió en plantas a las que se colocó un disco de medio de cultivo

estéril. Las plantas se colocaron en cámaras húmedas realizadas con charolas de plástico de 37 cm de diámetro, y se mantuvieron con dos riegos por semana, e incubaron a temperatura de 21 ± 2 °C y humedad relativa de 75 ± 5 %.

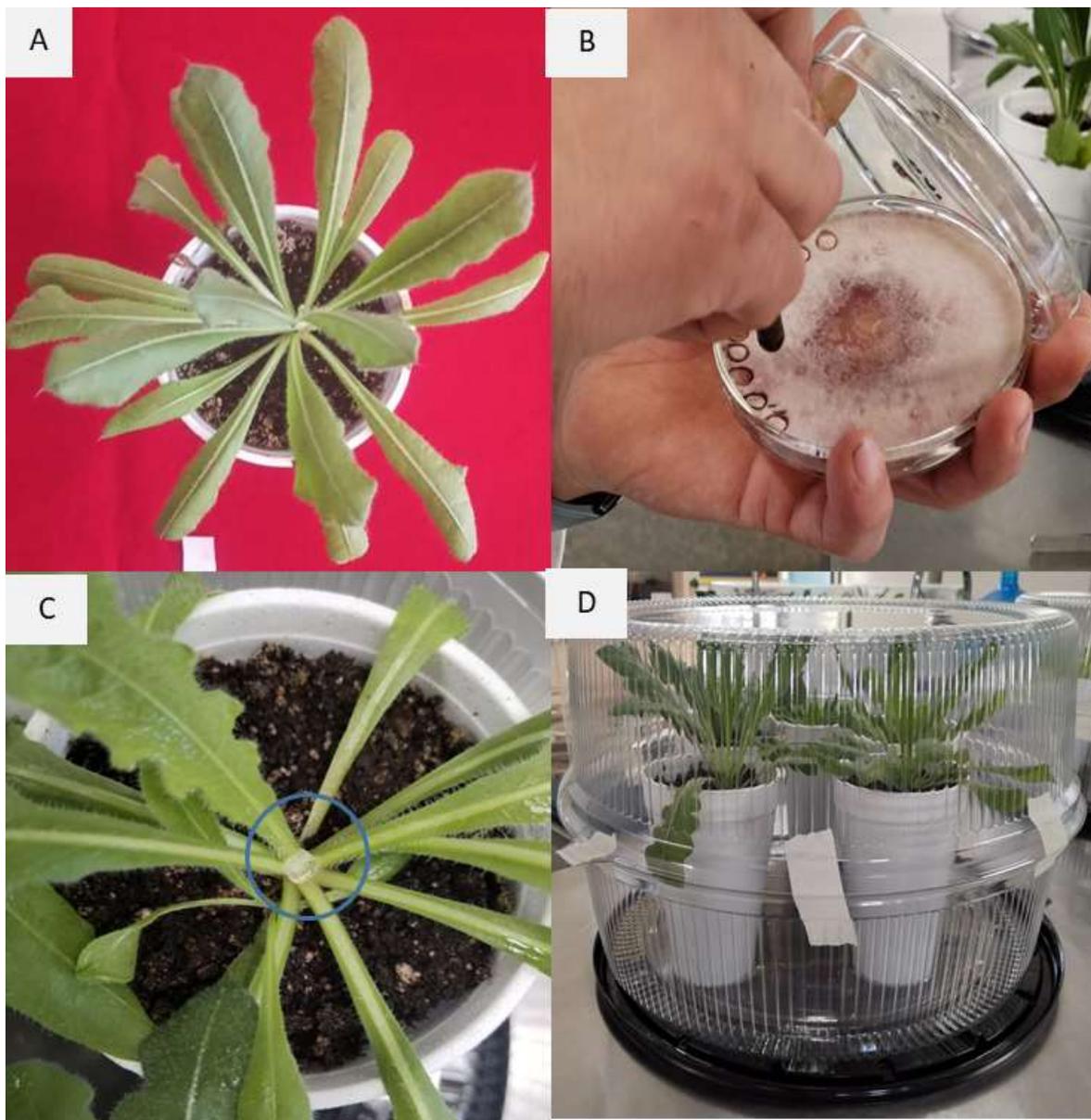


Figura 10. Proceso de inoculación. A) Plantas de statice de tres meses de edad; B) recorte de discos de medio PDA con crecimiento de *Botrytis* spp.; C) inoculación de las plántulas; D) cámara húmeda.

6.7.4. Recuperación del patógeno

Con la finalidad de comprobar que los síntomas desarrollados en las plantas correspondían al patógeno inoculado, se realizó un proceso de recuperación del patógeno al término del periodo de evaluación. Para esto, a partir de las plantas que manifestaron síntomas, se realizaron cortes de tejido enfermo de aproximadamente 0.25 cm², los cuales se sometieron a un proceso de desinfestación con NaClO al 2 % durante 1 minuto; posteriormente se realizó un triple enjuague con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril, y se sembraron en cajas de Petri con medio PDA. Las siembras se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio (21 ± 2 °C, 72 ± 5 % HR) y se revisaron diariamente; una vez que se detectó crecimiento micelial, se confirmó la identidad del hongo bajo microscopio compuesto.

6.7.5. Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron incidencia y severidad. Para el registro de la incidencia las plantas se revisaron diariamente para registrar el número de plantas enfermas a través del tiempo. La severidad se determinó al séptimo día después de la inoculación (ddi); para esto, se tomaron fotografías de las zonas dañadas de cada planta y se determinó el área de daño a través del programa ImageJ (versión 1.43).

6.7.6. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con ocho repeticiones. El número de tratamientos estuvo en función de las cepas del patógeno aisladas. Los datos de severidad se sometieron a un ANOVA de una vía y comparación de medias Tukey ($p < 0.01$) a través del programa InfoStat, versión estudiantil.

6.8. Determinación de la sensibilidad *in vitro* a fungicidas

Se determinó la sensibilidad *in vitro* del patógeno a: extracto de canela, complejo de extracto de citrex, cloruro de dimetil alquil bencil amonio + dimetil dioctil decil cloruro de amonio, pirimetanil y prochloraz, utilizados a la dosis mínima recomendada por el fabricante del producto (Cuadro 7).

Cuadro 7. Fungicidas y productos de bajo impacto ambiental evaluados frente a *Botrytis* spp.

Producto comercial	Marca	Ingrediente Activo	i. a. (mL L⁻¹)
Cinnasure	AgroSciences®	Complejo de extracto de Canela 70 %	3.5
Citrex	AgroSciences®	Complejo de extracto de Citrex 70 %	0.7
Full-Gro	AgroSciences®	Cloruro de Dimetil Alquil Bencil Amonio 15 %	0.15
		Dimetil Dioctil Decil Cloruro de Amonio 10 %	0.10
Scala	Bayer Cropscience®	Pirimetanil 54.6 %	1.9
Sportak	FMC Corporation®	Procloraz 45 %	0.22

6.8.1. Preparación de medio de cultivo

Se preparó medio de cultivo PDA como se mencionó en el apartado 6.3. Una vez estéril y a una temperatura aproximada de 50 °C se adicionó el producto correspondiente y se mantuvo en agitación en una parrilla de calentamiento (Thermo Scientific®) hasta que se disolvieron por completo; enseguida se vaciaron en cajas de Petri.

6.8.2. Siembra del patógeno

Una vez solidificado el medio de cultivo con fungicidas se procedió a la siembra del patógeno, para esto se colocó en el centro de la caja de Petri un disco de medio de cultivo de 8 mm con crecimiento de *Botrytis* spp. de siete días de edad. El testigo consistió en la siembra del patógeno en medio de cultivo libre de fungicidas. Las siembras se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 72 ± 5 % HR y luz natural (Figura 11).

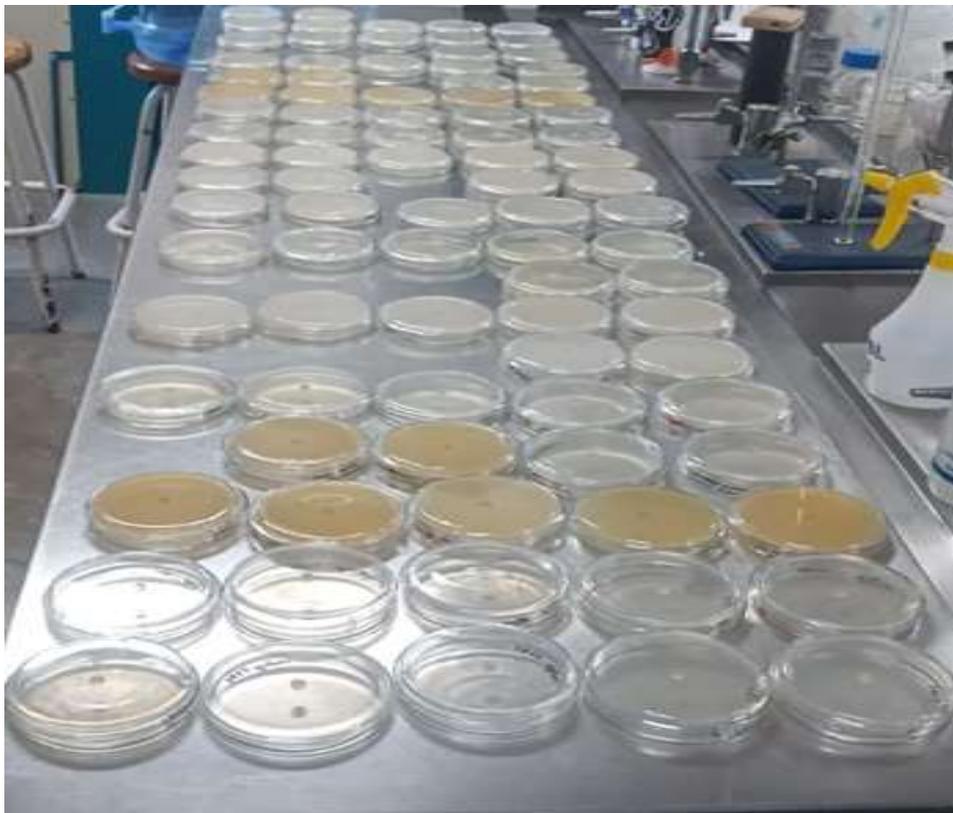


Figura 11. Condiciones de laboratorio bajo las cuales se mantuvieron las siembras para la determinación de sensibilidad a fungicidas y a productos de bajo impacto ambiental.

6.8.3 Variables evaluadas

Seis días después de la siembra (dds) se determinó el área de crecimiento micelial; para lo cual con un marcador indeleble de punto fino se marcó el crecimiento radial del hongo (Figura 12), se tomaron fotografías y se determinó el área de crecimiento con programa ImageJ (versión 1.43).

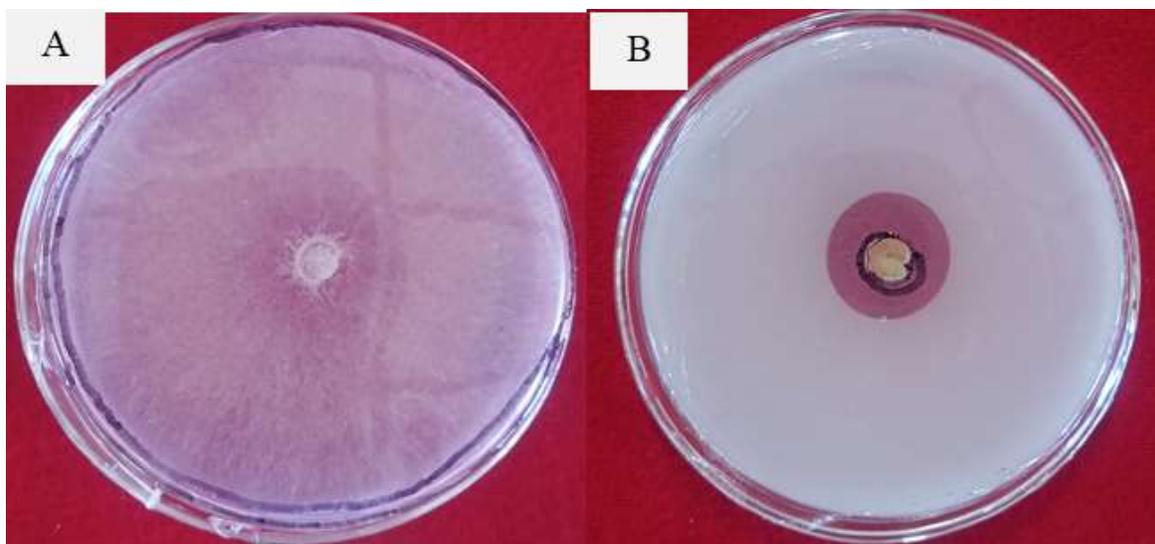


Figura 12. Trazo del área de crecimiento radial de *Botrytis* spp. seis días después de la siembra. A) Testigo; B) Scala.

6.8.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un diseño completamente al azar con seis tratamientos por cepa, con siete repeticiones. Los datos de crecimiento micelial se sometieron a un ANOVA de una vía y comparación de medias Tukey ($P < 0.01$) a través del programa InfoStat, versión estudiantil.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento del patógeno

A partir de las siembras realizadas de tejido enfermo de flor de statice se obtuvieron dos colonias de hongos nombradas como C1R1 y C2R5.

7.2 Selección de cultivos monospóricos

De cada colonia se obtuvieron cultivos monospóricos, para C1R1 cinco; y en el caso de C2R5 debido a la escasa concentración de esporas se obtuvieron dos. A partir de cada colonia se seleccionó uno considerando la tasa de crecimiento. En el caso del aislamiento C1R1 se seleccionó al monospórico I, por presentar la mayor tasa de crecimiento con $0.783 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$, y en el caso de C2R5 al monospórico II, cuya tasa de crecimiento fue de $0.428 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tasa de crecimiento (cm^2) de los cultivos monospóricos de los aislamientos.

Aislamiento	Monospórico	Tasa de crecimiento ($\text{cm}^2 \text{ día}^{-1}$)
C1R1	I*	0.783
	II	0.682
	III	0.315
	IV	0.763
C2R5	I	0.342
	II*	0.428

* Monospórico seleccionado

7.3. Identificación a nivel de especie

7.3.1. Identificación morfológica

La cepa C1R1 el micelio cultivado en PDA creció formando colonias de manera uniforme, sin generar anillos, con una apariencia algodonosa casi nula, con un micelio compacto pegado al PDA, e hifas septadas (Figura 13-D), micelio de color blanco o hialino al comienzo de su crecimiento (Figura 13-A), pero virando a color rosado cuando el crecimiento es joven (Figura 13-B) y tornando un color entre vino y morado intenso cuando el crecimiento es maduro. Los conidióforos fueron escasos, levantándose directamente del micelio, septados, ramificados, los conidios se encontraron de manera escasa y dispersa en forma de uva con una dimensión promedio de 5.4 μm de largo y 6.1 μm de ancho (Figura 13-E), los esclerocios fueron muy escasos incluso nulo en algunas siembras comenzando con un color blanco y cambiando a negro cuando estos envejecían, de forma irregular con dimensión promedio de 2.2 mm de largo y 1.7 mm de ancho, los microconidioforos fueron abundantes con gran cantidad de microconidios, estos con una forma circular y dimensiones promedio de 2.2 μm de largo y 2.0 μm de ancho (Figura 13-F).

La cepa C2R5 su micelio cultivado creció formando colonias uniformes rara vez formo anillos, con una apariencia algodonosa, un micelio creció un poco levantado del medio al PDA (Figura 14-A), con un micelio septado (Figura 14-D), de color hialino al inicio de su desarrollo tornándose blanco o grisáceo conforme envejecía. Los conidióforos fueron abundantes llegando a cubrir la caja en algunas siembras, septados, ramificados, los conidios fueron abundantes encontrándose por toda la caja, con forma de uva con una dimensión promedio de 9.3 μm de largo y 6.0 μm de ancho (Figura 14-E), los esclerocios fueron abundantes, dispersos por toda la caja, comenzando con un color blanco al inicio y virando a un color negro al envejecer, de forma irregular con una dimensión promedio de 2.0 mm de largo y 1.7 mm de ancho (Figura 14-C), los microconidioforos fueron escasos con desarrollo bajo de microconidios, estos con una forma circular y dimensiones promedio de 1.5 μm de largo y 1.3 μm de ancho (Figura 14-F).

Cuadro 9. Características morfológicas de macroconidios, microconidios y esclerocios de *B. cinerea*, cepas C1R1 y C2R5.

Cepa	Estructura	Largo ^β	Ancho ^β	Forma
C1R1	Macroconidios*	6.0-9.2 (5.4)	5.4-7.1 (6.1)	En forma de uva
	Microconidios*	0.9-3.8 (2.2)	0.9-3.3 (2.0)	En forma circular
	Esclerocios ^α	0.7-4.2 (2.2)	0.7-3.7 (1.7)	Irregular
C2R5	Macroconidios*	6.7-12.4 (9.3)	5.3-6.9 (6.0)	En forma de uva
	Microconidios*	0.9-3.2 (1.5)	0.8-2.8 (1.3)	En forma circular
	Esclerocios ^α	0.9-4.4 (2.0)	0.7-2.4 (1.5)	Irregular

* Unidad de medida de macro y microconidios: μm

^α Unidad de medida de los esclerocios: mm

^β El promedio de la medición de 30 estructuras se indica entre paréntesis.

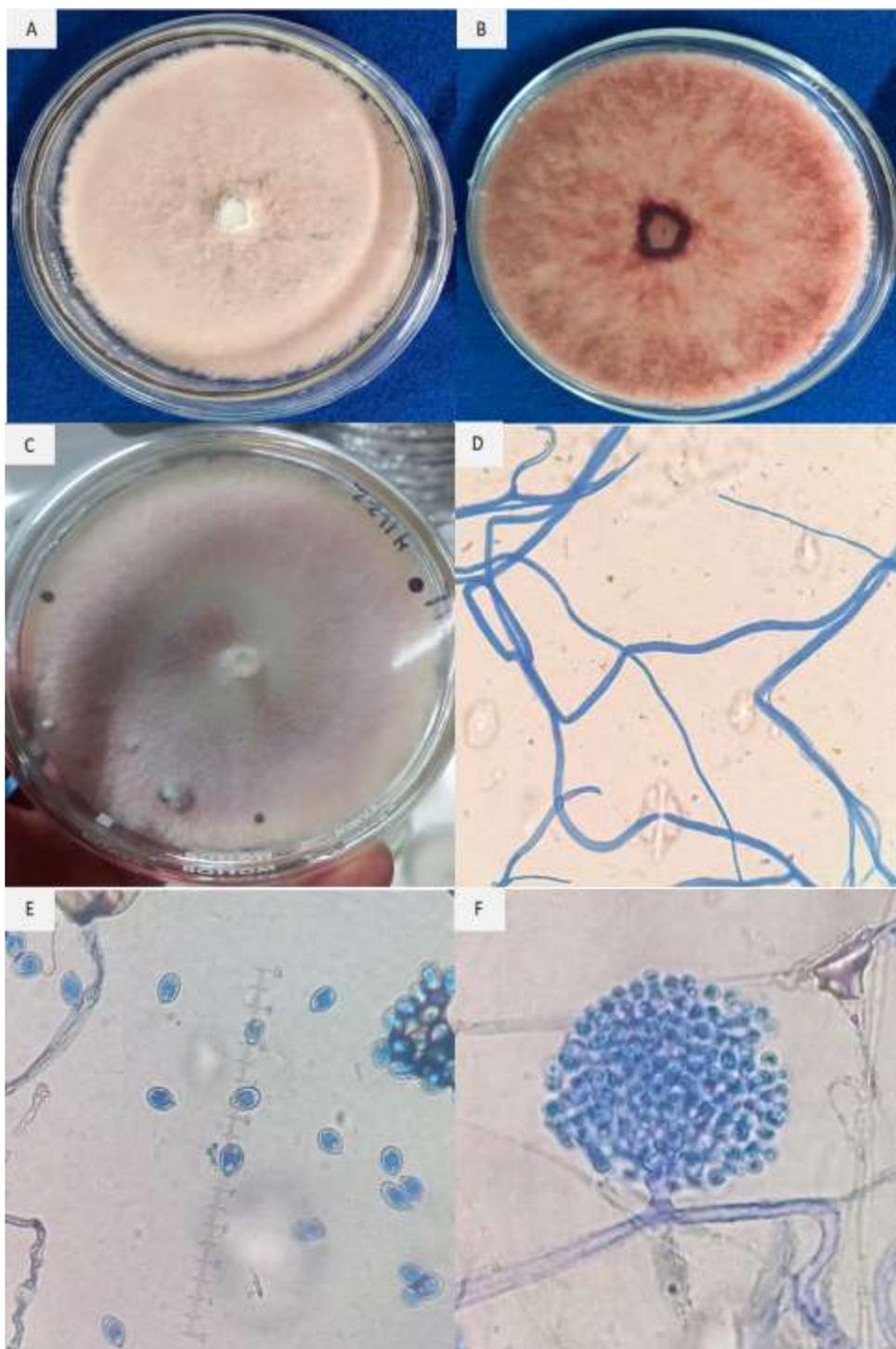


Figura 13. Características culturales y morfológicas de la cepa de *B. cinerea* C1R1 en medio de cultivo PDA. A) Vista frontal de la caja de Petri; B) reverso de la caja de Petri; C) presencia de esclerocios en medio de cultivo; D) micelio septado y ramificado (40X); E) macroconidios en forma de uva (100X); F) microconidioforo y microconidios de forma circular (100X).

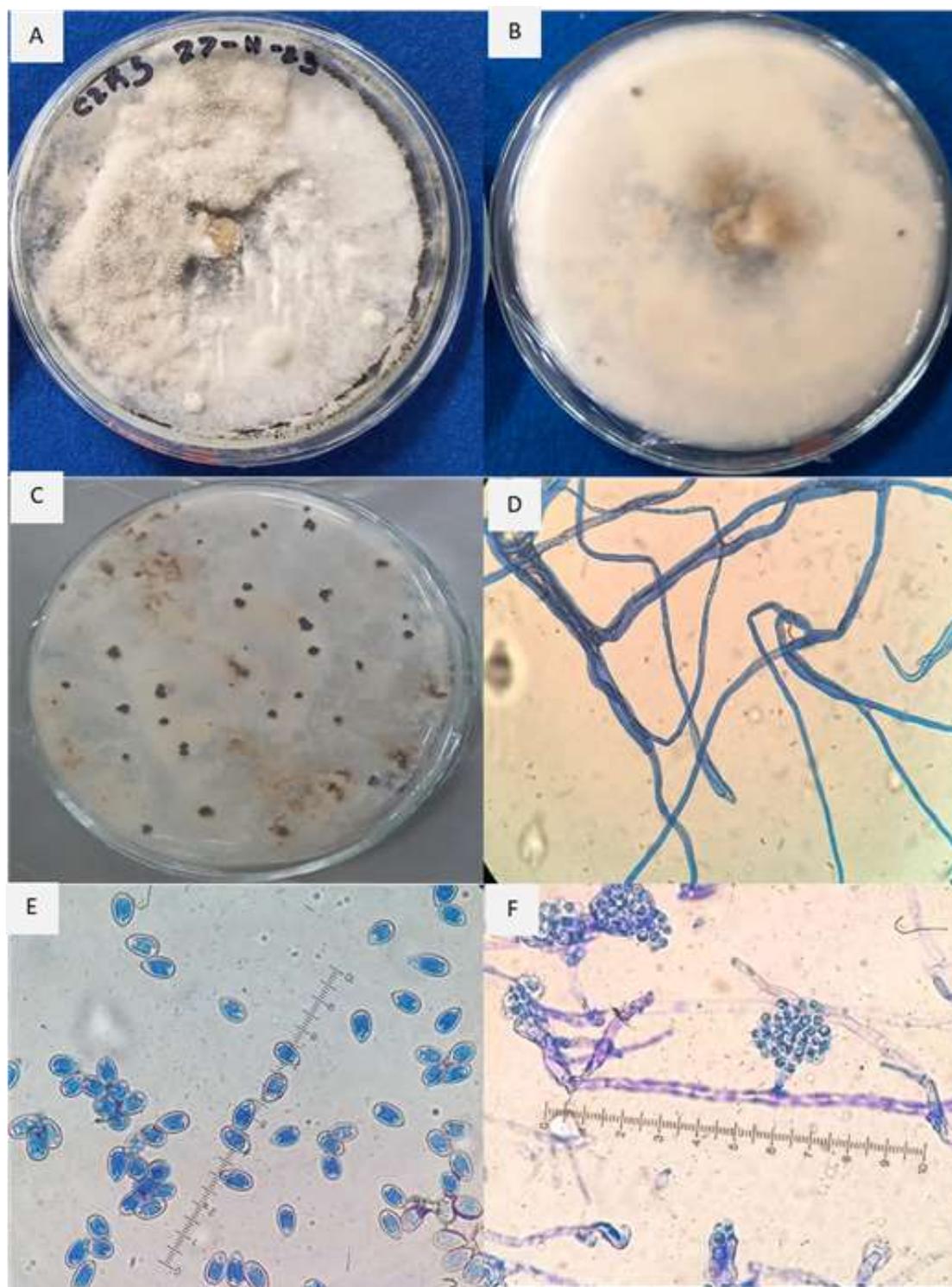


Figura 14. Características culturales y morfológicas de la cepa C2R5 en medio de cultivo PDA. A) Vista frontal de la caja de Petri; B) reverso de la caja de Petri; C) presencia de esclerocios en medio de cultivo; D) micelio septado y ramificado (40X); E) macroconidios en forma de uva (100X); F) microconidioforo y microconidios de forma circular (100X).

7.3.2. Identificación molecular

De acuerdo con las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de la amplificación de la región ITS y el EF-1 α , alineadas con la base de datos del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés NCBI), las dos cepas correspondieron al hongo *Botrytis cinerea* (Cuadro 10). Esto fue confirmado a partir del análisis filogenético de las secuencias de la región ITS (Figura 15).

Cuadro 10. Identificación molecular de *Botrytis cinerea* utilizando los cebadores universales ITS4 e ITS5, y el factor de elongación-1 α (EF-1 α) EFI-728F y EFI-986R, alineados con especies de la base de datos del NCBI (2023).

Cepa	Cebadores	Especie identificada	Secuencia homóloga*	Porcentaje de similitud
C1R1	ITS	<i>B. cinerea</i>	MT573470.1	100
	EF-1 α	<i>B. cinerea</i>	OP222678.1	97.26
C2R5	ITS	<i>B. cinerea</i>	MT573470.1	100
	EF-1 α	<i>B. cinerea</i>	OP222678.1	98.17

* Número de acceso al NCBI

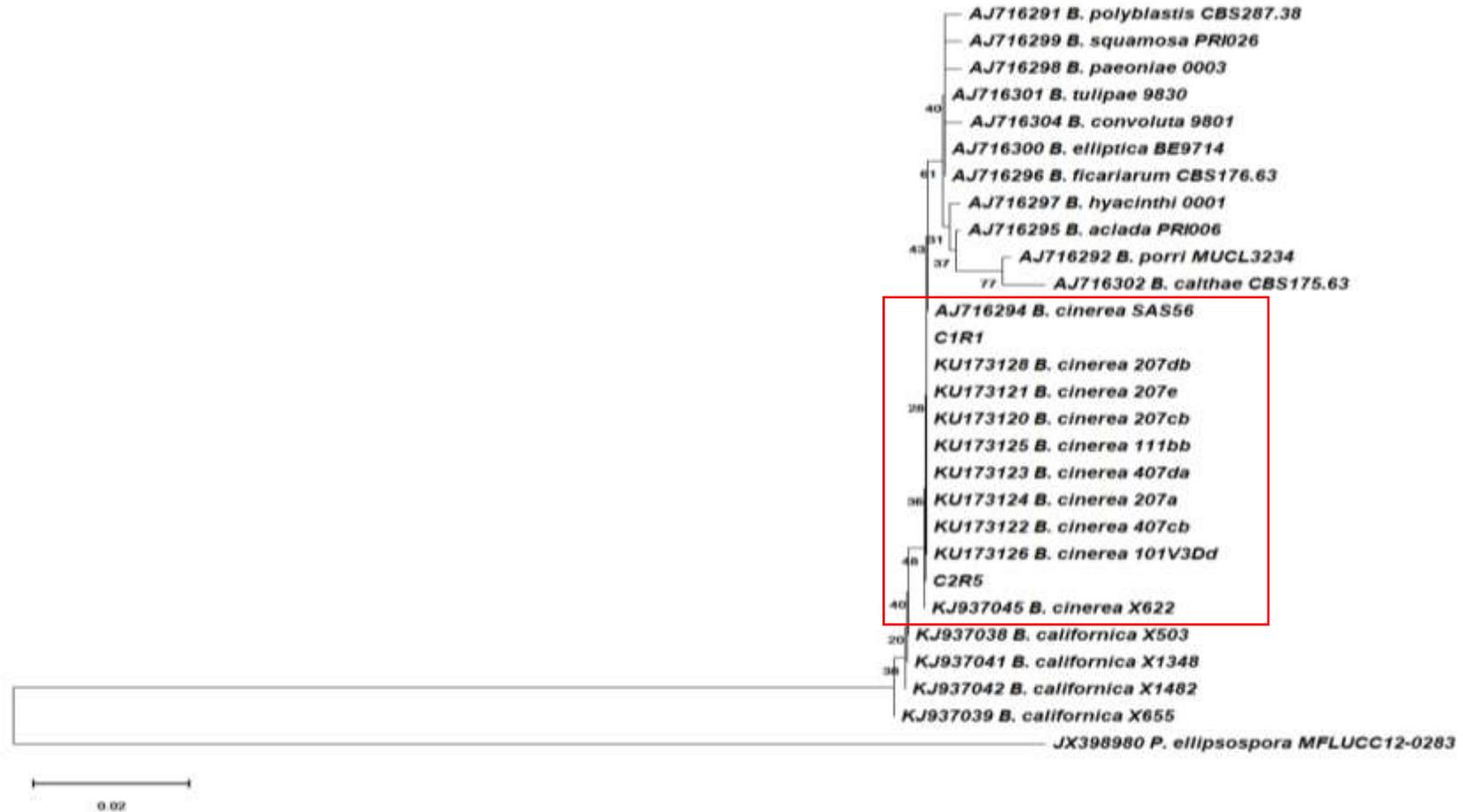


Figura 15. Relaciones filogenéticas aplicando los algoritmos Neighbor-Joining a una matriz de distancias entre pares estimada mediante el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL), construidas con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Kimura de 2 parámetros con 27 secuencias de nucleótidos de la región ITS del género *Botrytis* y *Pestalotiopsis ellipsospora* MFLUCC 12-0282 (JX398980) como grupo externo.

7.4 Patogenicidad

7.4.1 Síntomas registrados

A partir del tercer ddi de *B. cinerea* se observó necrosis del tejido en la zona del disco de medio de cultivo con el que se realizó la inoculación (Figura 16-A). Conforme avanzó el tiempo, la parte necrosada se extendió hacia la corona; posteriormente se presentó marchitamiento de la planta y las hojas comenzaron a tornarse de color amarillo hasta presentarse la muerte de estas (Figura 16-B). En general el tejido dañado se tornó color café oscuro (Figura 16-C y D) y fue común observar micelio y conidios del hongo.

7.5 Incidencia

Los primeros síntomas se registraron a partir del tercer ddi en las plantas inoculadas con ambas cepas de *B. cinerea*. Para el caso de C2R5, el 100 % de las plantas manifestaron algún síntoma. En el caso de las plantas inoculadas con C1R1, el 37.5 % desarrolló síntomas, aumentando a 62.5 % al cuarto ddi; es importante señalar que a partir de este momento el porcentaje de plantas enfermas no avanzó. Por su parte, las plantas del testigo no manifestaron ningún síntoma durante los siete días de evaluación (Cuadro 11).

Cuadro 11. Incidencia de la pudrición grisácea provocada por *B. cinerea* en plantas de statice hasta el día siete ddi.

Tratamiento	Días después de la inoculación				
	3	4	5	6	7
Testigo	0	0	0	0	0
C1R1	37.5	62.5	62.5	62.5	62.5
C2R5	100	100	100	100	100



Figura 16. Avance de la pudrición grisácea, enfermedad provocada por *B. cinerea* en plantas de statice. A) planta con necrosis inicial en la zona de inoculación; B-C) necrosis extendida en la corona y las hojas, y marchitez; D) muerte de hojas.

7.6 Severidad

Las cepas de *B. cinerea* C1R1 y C2R5 presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$) en cuanto al área de daño; siendo la más patogénica la C2R5 que en promedio provocó 2.7 cm^2 de daño, en comparación con la C1R1, cuyo daño promedio fue de 0.4 cm^2 (Figura 17). Por otro lado, se comprobó que el agente causal correspondió al patógeno inoculado debido a que se realizó en el 100 % de las plantas que manifestaron síntomas para C2R5 y del 90% para C1R1.

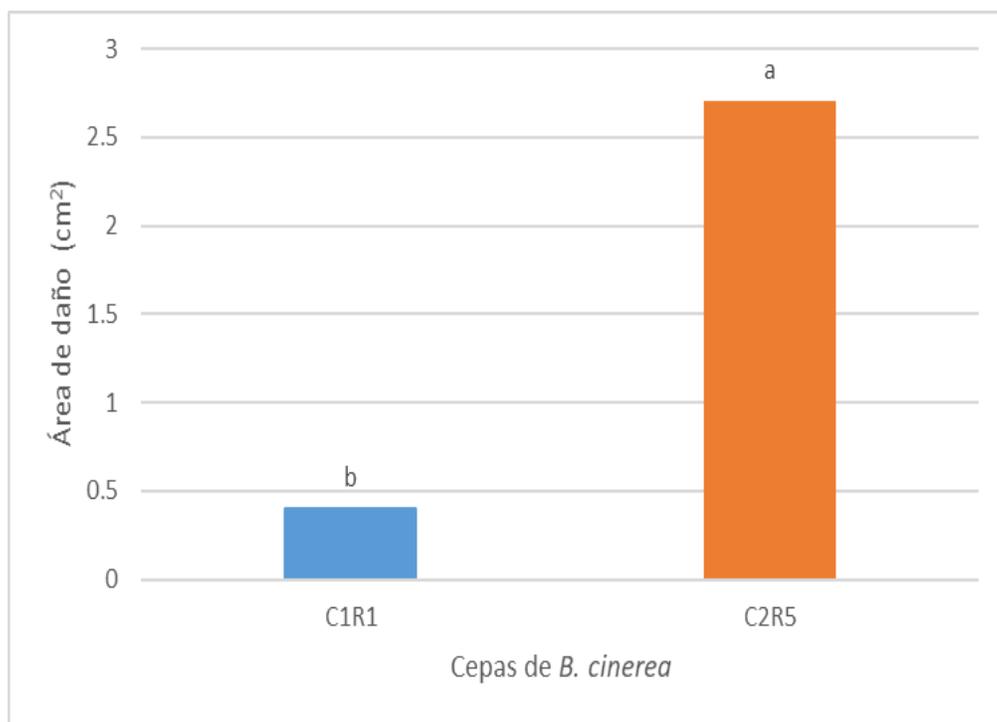


Figura 17. Área de daño (cm²) de *B. cinerea*, cepas C1R1 y C2R5 en plantas de statice. Barras con letra diferente, indican diferencias estadísticas ($p < 0.01$).

7.7 Sensibilidad *in vitro* a fungicidas

Derivado de las dos réplicas realizadas para ambas cepas de *B. cinerea*, el análisis de varianza mostró que al sexto dds no hubo diferencias estadísticas significativas ($p > 0.01$) en el área de crecimiento micelial con cada uno de los fungicidas evaluados ni el testigo (Anexos 1 y 2).

Al término del periodo de evaluación, el área de crecimiento micelial de la cepa C1R1 con fungicidas fue estadísticamente diferente al testigo ($p < 0.01$), en el cual el promedio de crecimiento fue de 51.20 cm². En lo que respecta a los tratamientos con fungicidas, el patógeno solo presentó crecimiento con Scala, en el que se registró un área promedio de 0.13 cm², lo que muestra pérdida de sensibilidad (Figura 18). Destaca que los demás productos (Sportak, Full-Gro, Cinnasure, Citrex) se consideran efectivos a nivel *in vitro* a las dosis evaluadas debido a que inhibieron el 100 % del crecimiento a la dosis evaluada (Cuadro 12).

Cuadro 12. Área de crecimiento micelial (cm²) al sexto dds de *B. cinerea* cepa C1R1 en medio de cultivo PDA con fungicidas y productos de bajo impacto ambiental.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm ²)*
Testigo	51.20 ^a
Scala	0.13 ^b
Sportak	0 ^b
Full-Gro	0 ^b
Cinnasure	0 ^b
Citrex	0 ^b

*Medias con letra diferente indican diferencias estadísticas ($p < 0.01$).

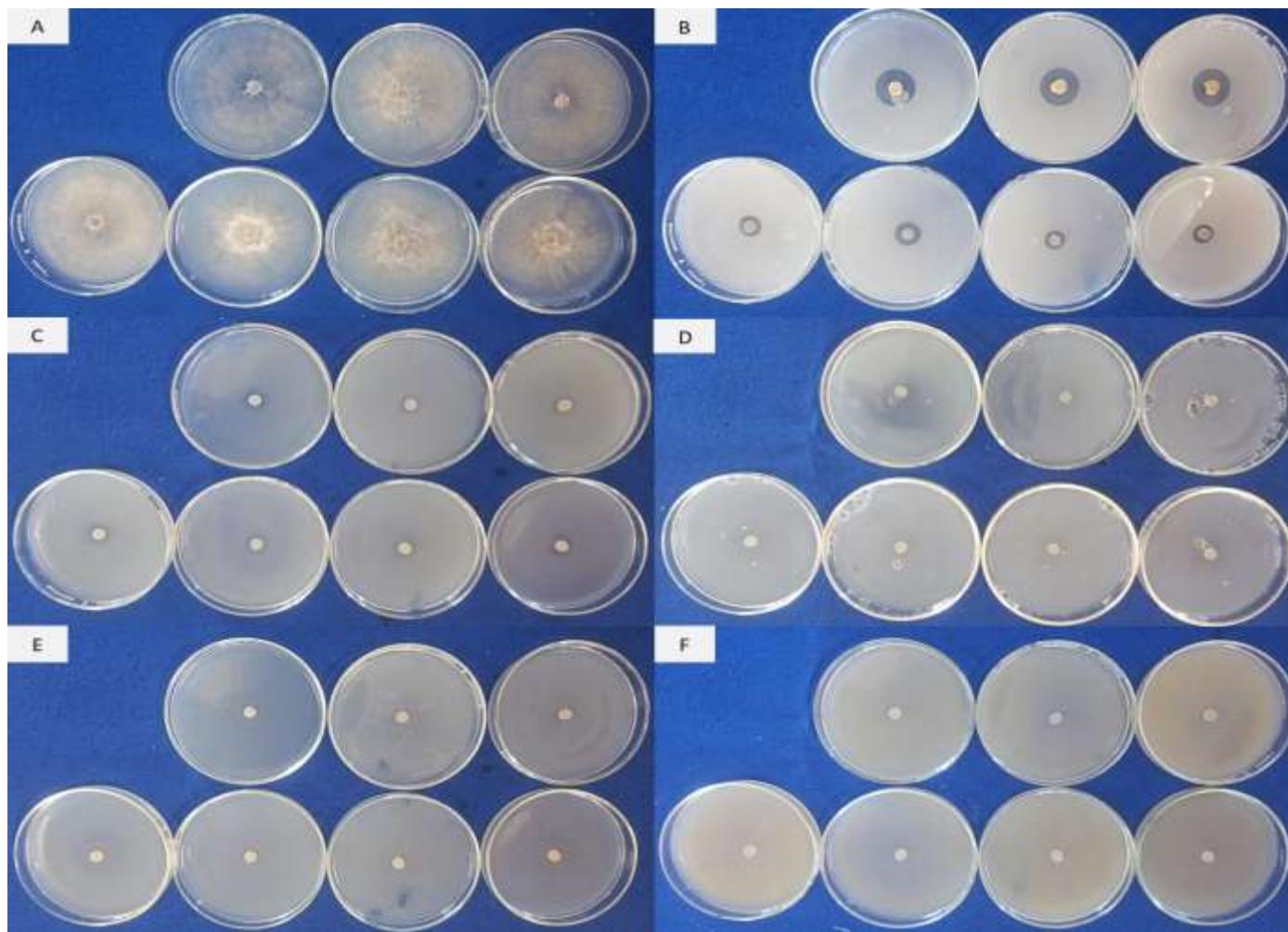


Figura 18. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cepa C1R1. A) Sin fungicida, B) Scala, C) Sportak, D) Full-Gro, E) Cinnasure, y F) Citrex.

En lo que respecta a la cepa C2R5, el análisis estadístico reveló diferencias significativas ($p < 0.01$) entre el testigo y los tratamientos con fungicidas. El testigo creció en promedio 63.61 cm^2 ; solo se presentó crecimiento con el fungicida Scala a la dosis recomendada por el fabricante, en el que presentó un crecimiento de 0.33 cm^2 , lo que también evidencia pérdida de sensibilidad (Cuadro 13). Otro aspecto importante es que al comparar el área de crecimiento con la cepa C1R1, la C2R5 resultó ser menos sensible.

Cuadro 13. Área de crecimiento micelial (cm^2) al sexto dds de *B. cinerea* cepa C2R5 en medio de cultivo PDA con fungicidas y productos de bajo impacto ambiental.

Tratamiento	Área de crecimiento micelial (cm^2)*
Testigo	63.6 ^a
Scala	0.33 ^b
Sportak	0 ^b
Full-Gro	0 ^b
Cinnasure	0 ^b
Citrex	0 ^b

*Medias con letra diferente indican diferencias estadísticas ($p < 0.01$).

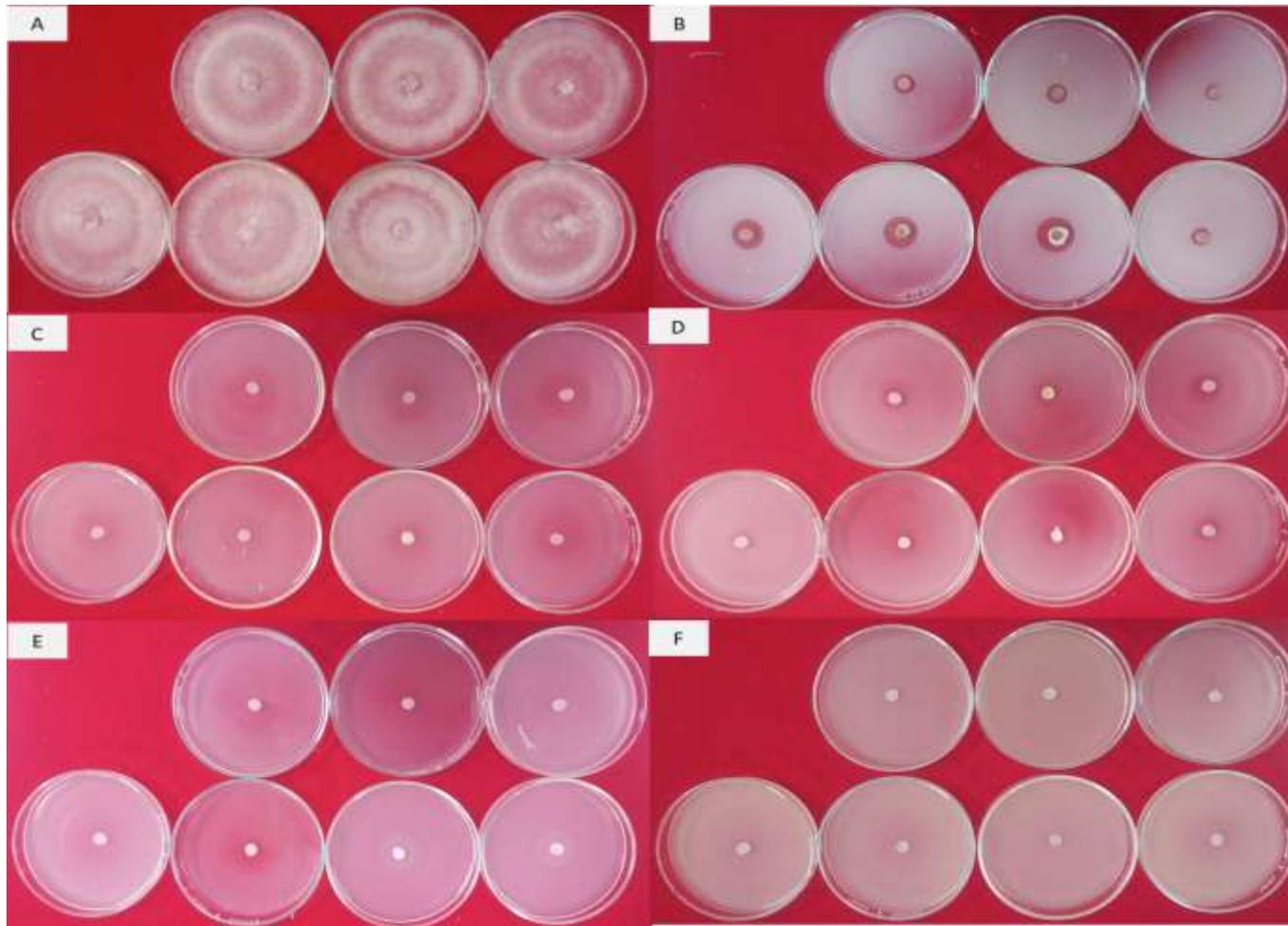


Figura 19. Crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea* cepa C1R1. A) Sin fungicida, B) Scala, C) Sportak, D) Full-Gro, E) Cinnasure, y F) Citrex.

8. DISCUSIÓN

Botrytis cinerea es el agente causal del moho gris en más de 200 especies vegetales de importancia económica alrededor del mundo (Staats *et al.*, 2005) entre las que se encuentra el statice, cultivo donde provoca daños en toda la planta desde tallos, corona, hojas e inflorescencias; además, se ha reportado como parte del complejo del damping-off en plántulas (Strider, 1973). A nivel mundial existen reportes científicos de la enfermedad en países como Colombia (Díaz *et al.*, 1996; Buitrago y Saavedra, 1982) y Estados Unidos (Englehard, 1980); no obstante, a pesar de que los daños son recurrentes sobre el cultivo de statice en las zonas productoras de México, no existen reportes formales al respecto.

Derivado del presente estudio se obtuvieron dos cepas de *B. cinerea* a partir de inflorescencias de un cultivo comercial de statice proveniente del municipio de Villa Guerrero, Estado de México, las cuales presentaban síntomas de pudrición; de manera complementaria la identidad del patógeno fue confirmada a través de su identificación morfológica (Cuadro 9) y molecular (Figura 15). Las cepas obtenidas presentaron diferencias en cuanto a las características de crecimiento en el medio de cultivo PDA, tales como la textura, color, producción de macro y microconidios, y esclerocios (Figura 13 y 14). En ambas cepas los macroconidios tuvieron forma de uva tal como lo señalan diversos autores (Camacho, 2009; Carbú, 2006; Barnet y Hunter, 1998); en lo que respecta al tamaño de estas estructuras, para la cepa C1R1 en promedio las dimensiones fueron de 5.4 x 6.1 μm , mientras que para la C2R5 de 9.3 x 6.0; pese a las diferencias, están dentro del intervalo reportado por Camacho (2009) que fue de 13.0 x 8.1 μm .

Otra de las estructuras que se encontraron con frecuencia a nivel *in vitro* fueron los microconidios cuya forma fue circular, con tamaño promedio de 2.2 x 2.0 μm para C1R1 y de 1.5 x 1.3 μm para C2R5; cabe señalar que estos se desarrollaron en colonias envejecidas, lo cual puede deberse a la disminución de la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo; al respecto Álvarez (2012) señala que tales estructuras tienden a desarrollarse ante la deficiencia de nutrientes u otras condiciones adversas como el bajo contenido de O₂.

Fue común el desarrollo de esclerocios de color negro, lo cual es reportado frecuentemente en la literatura (Álvarez, 2012; Barnet y Hunter, 1998). La cepa C2R5 tendió a desarrollarlos

en mayor medida que la C1R1; en cuanto al tamaño, los valores promedio fueron de 2.2 x 1.7 mm para C1R1 y 2.0 x 1.5 mm para C2R5, en todos los casos su forma fue irregular; además, el tamaño coincidió con lo señalado por Terrones-Salgado *et al.* (2019) quienes reportaron dimensiones de 1.2-3.1 x 0.9-2.5 mm.

En cuanto a las características culturales en medio PDA, al inicio del crecimiento la C1R1 presentó micelio compacto color blanco que conforme maduró viró a rosado hasta alcanzar tonalidad vino o morado (Figura 13); por su parte, la cepa C2R5 presentó coloración blanca con una apariencia algodonosa y tornándose grisácea al envejecer (Figura 14). Es importante destacar que en la literatura se reporta que las colonias de este hongo pueden presentar diversas características en medio de cultivo PDA; por ejemplo, algunas pueden presentar anillos concéntricos, otras apariencia algodonosa, o con micelio compacto de color grisáceo (Hernández, 2022; Mendoza, 2021; Camacho, 2009), con lo cual coincide la cepa C2R5, no así las características de la C1R1. A pesar de tales variaciones, la identificación fue comprobada a través de técnicas moleculares, para lo cual se alinearon las secuencias del factor de elongación-1 α y la región ITS en la base de datos del GenBank (NCBI, 2023), a partir de lo cual se identificó un porcentaje de similitud entre el 98.17 al 100 % con *B. cinerea* (Cuadro 10); esto se corroboró a través del dendrograma construido con las secuencias de la región ITS (Figura 15) utilizando como referencia las citadas por Saito *et al.* (2016), Staats *et al.* (2005) y Wang *et al.* (2002).

Como resultado de las pruebas de patogenicidad se produjo pudrición de corona y en hojas cercanas al sitio de inoculación, que conforme el paso del tiempo progresó hasta ocasionar la muerte de las plantas (Figura 16), lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Díaz *et al.*, 1996; Buitrago y Saavedra, 1982; Englehard, 1980) (Figura 16); en adición, fue común la presencia de moho gris conformado por micelio y esporas del patógeno (Gauthier *et al.*, 2021; Staats *et al.* 2005). Los síntomas fueron evidentes al tercer ddi; en el caso de la cepa C2R5 en el 100 % de las plantas, mientras que con la C1R1 fue de 37.5 %, alcanzando un máximo de 62.5 % a los 7 ddi (Cuadro 11). Al respecto es interesante destacar que existen estudios que hacen referencia al periodo de incubación de este patógeno, en los que se reportan diferencias en función de la especie vegetal; por ejemplo en uva (*Vitis vinifera* L.) Latorre *et al.* (2002) registraron la manifestación de los primeros síntomas a las 24 horas

después de la inoculación (hdi) en flores, y en frutos entre las 24 y 48 hdi; por otro lado, en flores de rosa (*Rosa hybrida*) Mendoza (2021) señala que los primeros síntomas se observaron a las 24 hdi; mientras que en el caso de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi) el patógeno indujo marchitez y necrosis en retoños después de 10 días posteriores a la inoculación (Montiel-Frausto *et al.*, 2021); las diferencias en cuanto al tiempo en el que se manifiestan los síntomas en diversos cultivos pueden estar asociadas con el grosor del tejido vegetal y con la producción de fitotoxinas (Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

Para el manejo del patógeno el método más empleado es el químico; lo cual representa un serio problema, ya que con base en reportes del FRAC (2019) *B. cinerea* es un hongo fitopatógeno que tiene la capacidad de desarrollar resistencia en un lapso de tiempo lo suficientemente corto como para ser una seria amenaza en más de una clase de fungicida; a partir de esto y en adición con los resultados de estudios de sensibilidad y resistencia a fungicidas realizados en la zona florícola del sur del Estado de México, en la presente investigación se planteó la hipótesis de que tal fenómeno podría estar ocurriendo en cepas del cultivo de statice provenientes del municipio de Villa Guerrero, de manera particular en el caso de pirimetanil (Sacala) y prochloraz (Sportak), que son algunos de los productos que más se utilizan en dicha región. Lo anterior fue confirmado para pirimetanil, al cual fue evidente la pérdida de sensibilidad por parte de las cepas aisladas, las cuales presentaron un área de crecimiento micelial de 0.13 y 0.33 cm², para el caso de la C1R1 y C2R5, respectivamente (Cuadros 12 y 13).

Otro aspecto de relevancia es que las anilipirimidinas (clase a la que pertenece el i. a. pirimetanil) son clasificadas dentro del nivel de riesgo medio para la selección de resistencia (FRAC, 2019). En este orden de ideas, derivado de estudios realizados en países como Grecia, China y México se ha documentado que existen cepas de *B. cinerea* resistentes (Carvajal, 2019; Sun *et al.*, 2010; Bardas *et al.*, 2008); además, se han reportado casos de resistencia cruzada, lo que implica que aun cuando no se tengan antecedentes de aplicaciones de pirimetanil, al aplicar fungicidas del mismo grupo químico es posible que se presente resistencia; este hecho se registró en un estudio realizado en Chile donde a partir de uva de mesa aislaron cepas resistentes a ciprodinil, las cuales también manifestaron resistencia a pirimetanil (Latorre *et al.*, 2002).

En el caso de procloraz (Sportak) utilizando 0.22 mL i. a. L⁻¹ el crecimiento del hongo fue nulo, lo que implica que a nivel *in vitro* fue efectivo frente a las cepas estudiadas (Cuadros 12 y 13). Tales resultados coinciden con los reportes en México de Santiago *et al.* (2017) quienes al utilizar el mismo producto con dosis de entre 0.50-1.25 mL 100 mL⁻¹ de medio PDA se lograron una inhibición del 100 %. Del mismo modo Camacho (2009), aisló cepas de *B. cinerea* de la región florícola del Estado de México, entre sus hallazgos reportó que al utilizar de 2.5 mL L⁻¹ de producto comercial el 100 % (n=5) de las cepas evaluadas provenientes de Tenancingo presentaron pérdida de sensibilidad, mientras que en el caso de las aisladas del municipio de Villa Guerrero el 80 % fue sensible (n=4), con lo que se evidencia que los resultados no son generalizados ni en la zona ni en el mundo; al respecto de esto último en Venezuela Carrero *et al.* (2003) demostraron mayor sensibilidad a procloraz que a otros fungicidas utilizando 3000 ppm, con lo que se inhibió totalmente el crecimiento del hongo a nivel *in vitro*.

Respecto a los productos CinnaSure, Citrex y Full-Gro, considerados de bajo impacto ambiental, en el presente estudio se registró que inhibieron el 100% del crecimiento micelial de ambas cepas. Con respecto al producto a base de canela (70 %) (CinnaSure), existen otros estudios que han demostrado la efectividad del EA, uno de estos es el realizado por Hernández (2022) quien realizó evaluaciones a nivel *in vitro* de un extracto acuoso obtenido en el laboratorio, usando una concentración de 15 % (peso/volumen), obteniendo inhibición del 100 % en dos cepas con antecedentes de pérdida de sensibilidad a tiabendazol (López, 2019). Otros autores que también muestran la efectividad de la canela son los realizados por Pazmiño-Miranda *et al.* (2017) quienes registraron la reducción de la incidencia y severidad en un 75 y 88.2 %, respectivamente, de *B. cinerea* en un cultivo de fresa, esto tras realizar aplicaciones de una solución de extracto etanólico con una dosis de 15 mL L⁻¹, con lo que - en adición con los hallazgos del presente estudios- se demuestra que es una alternativa sustentable para el manejo del patógeno

Otro de los productos que en este estudio presentó buena efectividad fue el Citrex. Al respecto, se ha reportado que existe cierta variabilidad otras investigaciones; por ejemplo, Rueda *et al.* (2013) evaluaron en tomate a nivel de campo un producto comercial (Inver-

Agroinsums®) a diferentes dosis (0, 666, 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm), a partir de que reportaron que las dosis más efectivas fueron 666 y 8000 ppm, debido a que se logró retardar la manifestación de síntomas. En contraste, Roldán (2011) evaluó la manifestación de la enfermedad en plantas de zarzamora desde la época de floración hasta la cosecha, como resultados reportó que al aplicar extracto de semilla de cítricos (Ecocitro®) a dosis de 1.5 L ha⁻¹ se obtuvieron resultados insatisfactorios, ya que obtuvieron el nivel más alto de incidencia en flores y en fruto llegando a ser cerca del 0.8 % de la incidencia, así como en frutos almacenados por 7 días. Por su parte, Alarcón-García *et al.* (2015) reportaron efecto antifúngico del extracto de limón a nivel *in vitro* en fresa a una concentración de 11000 ppm, con lo que se alcanzó una inhibición entre 24-28 % del hongo a los 10 días después de la siembra.

Con relación al uso de sales cuaternarias, producto que resultó ser efectivo en el presente estudio contra *B. cinerea* (Cuadros 12 y 13), existen pocos estudios que hacen referencia a su efectividad frente a hongos fitopatógenos, uno de estos es el realizado por Saavedra (2013) quien menciona que es efectivo para reducir la concentración de esporas; no obstante, esto lo aplicó para la desinfección de pasillos. Cabe destacar, aunque en la literatura reportan que las sales cuaternarias tienen menor eficacia contra hongos (Chavarro, 2009). Por otro lado, se debe hacer énfasis que las sales cuaternarias son ampliamente utilizadas como parte del proceso de desinfección de espacios, materiales, herramientas y/o de manos, esto con el fin de reducir la entrada de agentes contaminantes a áreas de producción; por ejemplo, se reporta una solución de 600 ppm para desinfectar calzado dentro de invernaderos y como desinfectante para manos, equipo de seguridad y herramientas con una solución de 100 ppm (Ortiz, 2016). En el caso de la desinfección de charolas que se puede aplicar sumergiéndolas en una solución de sales cuaternarias con una concentración de 1500 ppm, y con esa misma concentración es posible sanitizar invernaderos, además de la desinfección de heridas o cortes de material vegetal en jitomate (Espínola, 2018).

9. CONCLUSIONES

Con base en la identificación morfológica y molecular, y en adición con las pruebas de patogenicidad se concluye que *Botrytis cinerea* es el agente causal de la enfermedad conocida como “pudrición grisacea” en inflorescencias de statice en el municipio Villa Guerrero, Estado de México.

Las dos cepas de *B. cinerea* aisladas de statice presentaron la capacidad de producir microconidios y macroconidios, aunque la concentración dependió de la cepa.

La cepa C2R5 fue la más patogénica, con una incidencia del 100% al tercer ddi y una severidad 675 veces mayor que la cepa C1R1.

Las cepas C1R1 y C2R5 presentan pérdida de sensibilidad *in vitro* al fungicida pirimetanil, tomando de base la dosis recomendada por el fabricante del producto.

Los productos CinnaSure, Citrex y Full-Gro, considerados de bajo impacto ambiental, a nivel *in vitro* presentaron una inhibición total del crecimiento de *Botrytis cinerea*, por lo que representan una alternativa sostenible para el manejo de la enfermedad en el cultivo de statice en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, R. M. (2023). Los fungicidas y su manejo estratégico. Coppel. México, P.181.
- Agrios, G. N. (2016). Fitopatología. 2ª. Ed. Limusa. México, p. 856.
- Aguilar-Cascante, F- (2000). Análisis de las fuentes de contaminación en un laboratorio de cultivo de tejidos: detección y medidas de control. Instituto Tecnológico De Costa Rica. Disponible en línea: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/12>
- Alemán, M. N. (2015). Generalidades sobre algunos cultivos ornamentales para complementos de flor. Granja. Revista Agropecuaria pp. 114-118. Disponible en línea: <https://revistas.grancanaria.com/index.php/GRANJA/article/download/9946/9455>
- Alonso, B. A. (2020). Actividad antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). URI: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/105592>
- Álvarez, B. H. A. (2012). Efecto del manejo nutricional del calcio en la expresión de *Botrytis cinerea* en flores y tallos de *Rosa* sp. s.l., Universidad Nacional de Colombia. 256 p. Disponible en línea: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/20628>.
- Anabalón, M. E. B. (2016). Efecto de la luz uv-c 254 nm, sobre la población de *Botrytis cinerea*, presente en la superficie de arándanos (*Vaccinium corymbosum*). Universidad de Concepción Facultad de Ingeniería Agrícola. Disponible en línea: <https://repositorio.udec.cl/items/17dbc53a-c32a-42cd-80b5-30d9d1adc919>
- Anderson, D. y Tisserat, N. (1994). Bacterial leaf spot of *statice* by *Pseudomonas andropogonis*. Department of Plant Pathology, Kansas State University, Manhattan 66506. Plant Disease. 78: 1218. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Abstracts/PD_78_1218C.htm
- Arias, T. J. K. y Jerez, R. P. A. (2008). Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá. Tesis de Licenciatura. Pontificia

- Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá Colombia. 156 p. Disponible en línea: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8230/tesis223.pdf?sequence=1>.
- Bardas, G. A., Myresiotis, C. K. and Karaoglanidis, G. S. (2008). Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. The American Phytopathological Society. Vol. 98, No. 4 pp. 443-450. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0443>
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi (4th ed). Mac Millan Publishing Co. New York, USA. 218 p. 10.1094/PHYTO-98-4-0443
- Barrera, N. L. L. y García, B. L. J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. Aislado de papaya (*Carica papaya*). Revista UDO agrícola 8(1): 33-41. 2008. Disponible en línea: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3094829>
- Bernal, R. (2009). *Botrytis cinerea* moho gris: importante patógeno en diferentes cultivos bajo protección. Revista INIA [Instituto Nacional De Investigación Agropecuaria]. No 20, pp. 41-43. Disponible en línea: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429220710102856.pdf>
- Bu, S., Munir, S., He, P., Li, Y., Wu, Y., Li, X. and He, Y. (2021). *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*. Biological Control, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104568>
- Buitrago, J. E. y Saavedra, L. A. (1982). Pudrición de flores y de la corona del *Statice* (*Limonium sinuatum* Mill.), causado por *Botrytis cinerea* fr. Tesis. de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.
- Buriticá, C. P. (1999). Directorio de patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural del Instituto Colombiano Agropecuario, y Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Medellín, Colombia. 329 p. Disponible en línea:

https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/16404/40484_25553.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Camacho, L. M. D. (2009). Aislamiento de cepas de *Botrytis cinerea* en el cultivo de *Rosa* sp. en la zona de Villa Guerrero, Estado de México y la evaluación de su sensibilidad *in vitro* a fungicidas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

Camargo, P. A. A. y Rodríguez, L. N. F. (2008). Respuestas fenotípicas de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* a la disponibilidad de agua en el suelo. Acta Biológica Colombia 13(39): 133-148. Disponible en línea: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120548X2008000300011&script=sci_arttext

Carbú, E. de los M. M. (2006). Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis doctoral. Universidad de Cadiz. Disponible en línea: <https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/15678/MCarbuEspinosa.pdf?sequence=1>

Carrero, C., Cedeño, L., Quintero, K., Pino, H. y Rodríguez, L. (2003). Identificación y sensibilidad *in vitro* a fungicidas del agente causal de la podredumbre del tallo en plántulas de *Eucalyptus cinerea* en Mérida, Venezuela. Interciencia, 28(11): 656-659. Disponible en línea: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003001100008

Carrillo, C. B. (2020). Evaluación de agentes de control biológico de *Botrytis*, causante de la podredumbre gris en vid (*Vitis vinífera* L) Tesis de grado. Universidad Autónoma de Querétaro. Disponible en línea: <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/2549#:~:text=El%20objetivo%20del%20estudio%20fue%20evaluar%20la%20eficiencia,en%20frutos%20de%20uva%20y%20plantas%20de%20vid.>

Carvajal, S. V. A. (2019). Identificación filogenética de aislados de *Botrytis* sp. asociados a berries y su sensibilidad a fungicidas. Tesis de grado. Universidad Autónoma Chapingo. Disponible en línea: <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/ad8552a4-63e7-4ad6-865f-1ec2963c7371/content>

Catalogue of Life. (2023). *Limonium sinuatum* (L.) Mill. Disponible en línea: <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/72FJN>.

Catalogue of life. (2024). *Botrytis*. Disponible en línea: <https://www.checklistbank.org/dataset/281951/taxon/MQKP>

Chavarro, E. P. (2009). Desinfección química. Revista Química Útil. 13: 15-17. Disponible en línea: <https://www.mollabs.com/pdf/Desinfeccion.pdf>.

Cobo, A. M., Abriouel, H., Lucas, R. L, Ben, O., N., Valdivia, E. and Gálvez, A. (2008). Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. International Journal of Food Microbiology, 25(6): 762-770. Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002008000853>

CONABIO [Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad]. (2009). Plumbaginaceae, *Limonium sinuatum* (L.) Mill. Estátice. Disponible en línea: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/plumbaginaceae/limoniumsinuatum/fichas/ficha.htm#9.%20Referencias>.

De Blas, I. O. (1992). Morfología de *Limonium sinuatum* (L.) Miller (Plumbaginaceae). Rev. Biol Trop., 40 (1): 11-17 Disponible en línea: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/24454/24649>.

De Souza, E. L. (2016). The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. Trends in Food Science and Technology, 56: 1–12. Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224416301017>

Debasa, L. I. (2020). Propiedades inhibitorias de la bencilaminopurina en aislados de *Botrytis cinerea* con distinta sensibilidad a ciprodinil. Memoria del trabajo de fin de grado. Universidad de Coruña. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/2183/27192>

- Díaz, C. N., Barrera, J. M. y Garcés, de G. E. (1996). Contribución al control de *Botrytis cinerea* Pers. en stative (*Limonium sinuatum* Mill) variedad Midnigth blue. Acta Biológica Colombiana 3(2): 7-18, Disponible en línea: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/20714/42620>.
- EcuRed. (S.f.) *Limonium*. EcuRed: Enciclopedia cubana. Disponible en línea: https://www.ecured.cu/index.php?title=EcuRed:Enciclopedia_cubana&action=info.
- Edwards, S.G. y Seddon, B. (1992). *Bacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected Chinese cabbage. (pp.267-271) Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands. Disponible en línea: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19932332887>
- Elad, Y. y Shtienberg, D. (1995). *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. Integrated Pest Management Reviews 1: 15-29. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1007/BF00140331>
- Englehard A. (1980). Symptoms and control of *Botrytis* on stative. Ornamentals North west archives. University of Florida (IFAS). 4(2): 10-11. Disponible en línea: <https://agsci.oregonstate.edu/sites/agscid7/files/horticulture/osu-nurserygreenhouse-and-christmas-trees/onn040210.pdf>
- Espínola, A. L. (2018). Producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de alta tecnología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Disponible en línea: <https://repositorio.uaaan.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/45333/K65505%2Esp%C3%ADnola%20Alvarado,%20Luis.pdf?sequence=1>
- Felicia, W. X. L., Rovina, K., Vonnie, J. M., Aqilah, M. N. N., Erna, K. H., and Mailin, M. (2022). Consolidating plant-based essential oils onto polysaccharides-based coatings: Effect on mechanisms and reducing postharvest losses of fruits. Applied Food Research, 2(2), 100226. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100226>

Fernández, A. F. J. (2006). Aplicación de la proteómica a la caracterización de mecanismos de patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Utilización y evaluación de nuevos fungicidas. Tesis doctoral. Universidad de Cadiz. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/10498/15676>

FRAC [Fungicide Resistance Action Committee]. (2019). Consulta de FRAC. Pathogen risk list. Disponible en línea: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>

FRAC [Fungicide Resistance Action Committee]. (2024). Consulta de FRAC. Clasificación de fungicidas y bactericidas según el modo de acción. Primera edición. Disponible en línea: <https://www.frac.info/>

FRAC [Fungicide Resistance Action Committee]. (2024). Consulta de FRAC Code list 2023. Disponible en línea: <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management>

FRAC [Fungicide Resistance Action Committee]. (2024). Consulta de Poster FRAC de modos de acción de los fungicidas. Disponible en línea: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-mode-of-action-poster/frac-moa-poster-2024.pdf>

Fuentes, L. M. A. (2013). Estudio del crecimiento de "*Botrytis cinerea*" Pers. ex. Fr. y del desarrollo de las podredumbres de frutos de tomate con el uso de aceites esenciales. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/10317/3589>

García, V. R. (2017). *Botrytis cinerea* en el cultivo de *Rosa hibrida* en la zona florícola sur del Estado de México y la evaluación de su sensibilidad *in vitro* a fungicidas. Capítulo de libro. Disponible en línea: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/68560>.

García, S. M. D., y Serrano, H. (2011). La flor de papel *Limonium sinuatum* (L.) Mill. (Plumbaginaceae) estática. Disponible en línea: <https://tecnoagro.com.mx/no.-69/la-flor-de-papel-limonium-sinuatum-l-mill-plumbaginaceae-estatica>

Alarcón-García, Y., Trejo-Márquez, M. A., Corrales-Salinas, A., y Pascual B. S. (2015). Desarrollo de un envase activo adicionado con aceites esenciales de cítricos para el control de la podredumbre en fresa. Revista Iberoamericana de Tecnología

- Postcosecha, 16(2): 222-227. Disponible en línea: <https://www.redalyc.org/pdf/813/81343176011.pdf>
- Gauthier, N., Leonberger, K., Boice, M., y Kaiser C. (2021). Enfermedades por *Botrytis*. Hoja informativa de Fitopatología. Universidad de Kentucky. Disponible en línea: <https://plantpathology.ca.uky.edu/files/PPFS-GEN-19-S.pdf>
- GenBank. (2023). GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, EE. UU.) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41: 95–98.
- Hernández, L. A. N., Bautista, B. S., y Velázquez del Valle, M. G. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2): 119-123. Disponible en línea: <https://doi.org/10.35196/rfm.2007.2.119>
- Hernández, U. B. K. (2022). Efectividad *in vitro* de extractos acuosos de *Allium sativum* y *Cinnamomun zeylanicum* frente a *Botrytis cinerea* proveniente de *Rosa hybrida*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/113007>
- Hernández-Rodríguez. A., Heydrich-Pérez, M., Velázquez-del Valle, M. G., y Hernández-Lauzardo. A. N. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 42-49. Disponible en línea: <https://www.redalyc.org/pdf/612/61224107.pdf>
- Herrera, R., y Carolina, A. (2012). Evaluación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Thymus vulgaris* l (tomillo) frente a *Botrytis cinerea* de la variedad de rosa butterscotch (Doctoral dissertation, Universidad Internacional SEK). Disponible en línea: <http://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/1753>

- Hugo, W. B., and Russell, A. D. (1982). Types of antimicrobial agents, Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation (pp.8-16). Oxford: Blackwell.
- Jimenez, E. V., y Mosquera, O. M. (2014). Actividad antifúngica *in vitro* de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* (Moho gris). Salud Soc Uptc. 1(2):16-21. Disponible en línea: <https://doi.org/10.19053/19092407.3495>
- Jones, J. B., and Engelhard, A. W. (1984). Crown and leaf rot of stative incited by a bacterium resembling *Pseudomonas caryophylli*. Plant Disease 68: 338-340. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n04_338.pdf.
- Kim, Y., Hur, J., and Park, S. (2019). Biocontrol of *Botrytis cinerea* by chitin-based cultures of *Paenibacillus elgii* HOA73. European Journal of Plant Pathology, 15: 253-263. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-019-01768-1>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16:111-120. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kong, P., Richardson, P., and Chuanxue, H. (2020). Burkholderia sp. SSG is a broadspectrum antagonist against plant diseases caused by diverse pathogens. Biological Control, 151: 1-13. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104380>
- Lagos, P. M. R. (2018). Efecto del aceite de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) en *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro* e *in vivo*. Tesis de licenciatura. Universidad Técnica de Ambato. Disponible en línea: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/29168>
- Latin, R. (2011). A practical guide to turfgrass fungicides. The American Phytopathological Society. pp 270.
- Latorre, A. B., y Rioja, M. E. (2002). Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. Facultad de Agronomía e Ingeniería

- Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile. Ciencia e Investigación Agraria. 29(2): 67-72. Disponible en línea: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2193162>
- Latorre, B. A., Spadaro I., and Rioja M. E. (2002). Occurrence of resistance strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*, 21: 957–96. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00074-1](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00074-1)
- León, M. M. E., Pagador, S., Yupari A. I., y Díaz O. J. L. (2023). Actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de molle (*Schinus molle*) y muña (*Minthostachys mollis griseb*) sobre *Botrytis cinerea*. 48(6): 29. Disponible en línea: https://www.interciencia.net/wpcontent/uploads/2023/07/02_6977_Com_Pagador_v48n6_7.pdf
- Leroux, P. (2007). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. *In*: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N. (eds) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Dordrecht. Disponible en línea: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_12
- Llanos, M. A. K. (2017). “Control de *Botrytis cinerea* pers. en fresa (*Fragaria x ananassa Duch.*) cv. aromas mediante fungicidas biológicos y químicos en Hualar” Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Agraria la Molina. Disponible en línea: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3018>
- López, F. H. (2023). Aislamiento de *Trichoderma asperellum* y su efectividad *in vitro* frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/139362>
- López, A. N. (2019). Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* pers. fr. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/99923>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J. and Crous, P. W. (2014). Pestalotiopsis revisited. *Studies in Mycology*, 79(1): 121–186.

<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>

Manzanos-Ayala, L. D., López-Aguilar, N., Domínguez-Arizmendi, G. y García-Velasco, R. (2009). Efectividad *in vitro* de tiabendazol frente a *Botrytis cinerea*. Suplemento de la Revista Mexicana de fitopatología. 37: 29-30.

Matsumoto, J., Okamura, N., and Ohki, S. T. (1997). Cucumber Mosaic and Broad Bean Wilt Viruses isolated from *Limonium sinuatum* and *Rudbeckia x hybrida*. Annals of the Phytopathology Society of Japan 63:13-15. Disponible en línea: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/63/1/63_1_13/_pdf

Matute, C. P. F. (2019). Control Biológico del moho gris (*Botrytis cinera* en cultivo de fresa (*Fragaria vesca* L.) mediante hongos filamentosos antagonistas. Tesis de grado. Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca. Disponible en línea: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18147/1/UPS-CT008620.pdf>

Melgarejo, N. P., García-Jiménez, J., Jordá, G. M. C., López, G. M. M., Andrés, Y. M. F., y Duran-Villa, N. (2010). Patógenos de plantas descritos en España. Segunda Edición. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino Sociedad Española de Fitopatología. Madrid, España. 854 p. Disponible en línea: <https://citarea.cita-aragon.es/bitstream/10532/2230/1/apb08.pdf>

Mena, V. L., Tamargo, S. B., Sala, O. E., Plaza, P. L. E., Blanco, H. Y., Otero, G. A., y Sierra, G. G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). Revista Cubana de Plantas Medicinales 20(1): 106-116. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-479620150001000010&script=sci_arttext

Mendoza, A. J. (2021). Efectividad *in vitro* de aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* y *Syzygium aromaticum* frente a *Botrytis cinerea* Pers. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/113003>

Memenza, Z. M. E. (2009). Control Biológico *in vitro* de *Botrytis cinerea* (Pers) mediante el uso de hongos antagonistas, en vid (*Vitis vinifera*). Tesis de Grado. Universidad

Nacional Mayor de San Marcos. Disponible en línea:
<https://core.ac.uk/download/pdf/323352566.pdf#:~:text=El%20presente%20trabajo%20tuvo%20como%20finalidad%20controlar%20in%20vitro%20a>

Mónaco, C., Dal Bello, G., Rollan, M. C., Lampugnani, G., Arteta, N., Abramoff, C., y Stocco, M. (2006). Levaduras antagonistas como agentes de control biológico de la podredumbre gris del tomate en poscosecha. *Fitosanidad*, 10(2). Disponible en línea: <https://agris.fao.org/search/en/providers/122597/records/64724a192c1d629bc979cde0>

Montiel-Frausto, L. B. F. y Vásquez-López, A. (2021). *Botrytis cinerea*, agente causal de muerte de retoños de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 44(2): 261-264. Disponible en línea: <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.2.261>

Nakkeeran, S., Priyanka, R., Rajamanickam, S., and Sivakumar, U. (2020). *Bacillus amyloliquefaciens* alters the diversity of volatile and non-volatile metabolites and induces the expression of defence genes for the management of *Botrytis* leaf of *Lilium* under protected conditions. *Journal of Plant Pathology*, 102: 1179-1189. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00602-6>

Ortiz, O. E. C. (2016). Manejo de las principales plagas y enfermedades del tomate *Solanum lycopersicum* L. bajo sistema de producción de malla sombra en el Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de grado. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Disponible en línea: <https://oai.uaaan.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/7946/K%2063907%20Ortiz%20Cervantes%2C%20Omar%20Eustorgio.pdf?sequence=5&isAllowed=y>

Pavone, D. (2020). *Botrytis cinerea*, un hongo patógeno de plantas que amenaza los cultivos agrícolas y la seguridad alimentaria. Artículo de Divulgación. Tecnovita. Disponible en línea: <https://tecnovitaca.com/wpcontent/uploads/2021/05/BotrytiscinereaPDF.pdf#:~:text=Botrytis%20cinerea,%20un%20hongo%20pat%C3%B3geno%20de%20plantas%20que%20amenaza%20los>

- Pazmiño-Miranda, P., Velástegui-Espín, G.P., Curay, S. Yáñez-Yáñez, W., y Vásquez, C. (2017). Efecto de los extractos hidro-etanólicos de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y cola de caballo (*Equisetum arvense* L.) sobre la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en fresa. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(1), 29-38. Disponible en línea: http://www.scielo.org.bo/pdf/jsab/v5n1/v5n1_a04.pdf
- Ponce-González, F., García-Aguirre, M. G., Lozoya-Saldaña, H., y Herrera-Suárez, T. (2002). Resistencia de *Botrytis cinerea* (Pers.) Fr., a dos fungicidas benzimidazoles utilizados en la floricultura. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 8(1): 95-105. Disponible en línea: <https://revistas.chapingo.mx/horticultura/revista/articulos/rchshVIII229.pdf>
- Ren, L., Zhou, J., Yin, H., Qin, N., Yao, F., Ma, D., y Zhao, X. (2022). Antifungal activity and control efficiency of endophytic *Bacillus velezensis* ZJ1 strain and its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology*, 104: 575-589. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01056-8>
- Rochette, M., Machrafi, Y., Cossus, L., Nguyen, T., Antoun, H., Droit, A. y Tweddell, R. (2022). *Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol ability against *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 170: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104925>
- Roldán, O. N. (2011). Evaluación del efecto de programas de manejo del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers.) en precosecha en la incidencia en poscosecha en zarzamora en el estado de Michoacan. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología agrícola. Disponible en línea: <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/2560d56d-3a85-4ab8-8b27-d1958d24d6b4/content>
- Rodríguez, E. C., Segarra, G., Borrero, C., Torras, J., Noguera, R., García, S. C., y Trillas, M. I. (2008). Utilización del agente de control biológico " *Trichoderma asperellum*" cepa T34 contra enfermedades de los cultivos. *Phytoma España: La Revista Profesional de Sanidad Vegetal*, 203: 39-41. Disponible en línea: <https://dialnet.uni-rioja.es/servlet/articulo?codigo=2739781>

- Rueda, P. E. O., Rochín, B. J. E., Valdez, D. R. D., López, E. J., y Huez, M. A. L. (2013). Evaluación de extracto de cítricos en el control de enfermedades foliares de tomate saladette indeterminado (*Lycopersicon esculentum* mill var. roma). Disponible en línea:
https://dagus.unison.mx/publicaciones/congresos/XVI%20Congreso%20Internacional%20de%20Ciencias%20Agr%20C3%ADcolas/ICA%202013%20_RUEDA%20PUE NTE.pdf#:~:text=estudio%20consisti%20en%20evaluar%20extractos%20de%20c%20C3%ADtricos%20a%20diferentes%20dosis
- Ruiz, B. M. R. (2018). Aplicación de quitosano con aceites esenciales contra *Botrytis cinerea* Pers. “Moho Gris” en *Lycopersicon esculentum* P. Mill “Tomate”. Tesis de grado. Universidad Ricardo Palma. Disponible en línea: <https://hdl.handle.net/20.500.14138/1677>
- Ruiz, M., y Ramos, J. (2021). Evaluación antifúngica *in vitro* de quitosano con aceites esenciales de *Citrus x aurantifolia* (Christm.) Swingle “limón sutil” y *Origanum vulgare* L. “orégano” contra *Botrytis cinerea* Pers. “moho gris”. *Agroindustrial Science*, 11(3), 269-273. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2021.03.03>
- Saavedra, C. T. (2013). Evaluación se genotipos de tomate indeterminado (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo invernadero en la comarca lagunera. Tesis de grado. Universidad Agraria Antonio Narro. Disponible en línea: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2381/TERESA%20SAAVEDRA%20CASTILLO.pdf?sequence=1>
- Saito, S., Margos, D., Michailides, T. J. y Xiao, C. L. (2016). *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. *Mycologia*, 108(2), 330–343. <https://doi.org/10.3852/15-165>
- Salazar, P. E. (2019). Estudio de resistencias a biocidas y antibióticos en bacterias resistentes aisladas de frutas y verduras. Universidad de Jaén. Disponible en línea: <https://hdl.handle.net/10953.1/21392>

Santiago, E. E., Guerrero, D. E. M., Vilchis, R. Z., Martínez J. C. Trejo, L. I. T., y Leyva S. G. M. (2017). Efectividad *in vitro* de fungicidas biológicos, químicos y alternativos contra *Botrytis cinerea* (Pers.) de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). Ciencias de la Biología, Agronomía y Economía. Disponible en línea: https://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencias%20de%20la%20Biologia%20Agronomia%20y%20Economia%20T-II/HCBAE_TII_3.pdf

SEMARNAT-INECC [Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático]. (s/f). Estudio sobre el uso de plaguicidas en México compilación 1980-2018. Disponible en línea: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728079/141_2022_Estudios_plaguicidas_Mexico_19802018.pdf#:~:text=Si%20bien%20el%20uso%20generalizado%20de%20los%20plaguicidas%20en%20M%C3%A9xico

SIACON [Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta]. (2022). Consulta de la superficie sembrada y valor de la producción del Estado de México y a nivel nacional. Versión 2020.

Staats, M., Van Baarlen, P. y Van Kan, J. A. L. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22(2): 333-346. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>

Strider, D. L. (1973). Damping-off of statice caused by *Botrytis cinerea* and its control. *The Plant Disease Reporter*, 57(11): 969.

Sun, H. Y., Wang, H. C., Chen, Y., Li, H. X., Chen, C. J., and Zhou, M. G. (2010). Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. *Plant Dis.* 94:551-556. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0551>

Taborda, A. L. A., Sánchez, O. M. S., Bonilla, C. C. R., y Huertas, D. C. (2015). Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa. *Acta Agronómica*, 64(1): 93-99. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n1.35773>

- Tamuram, K., Stecher G., and Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tan, Y. 1991. Monument through soil of a biological control agent, *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biological and Biochemistry* 23:821-825. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90092-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90092-X)
- Téllez, P. J. A. (2022). *Botrytis* spp.: estado actual del biocontrol. Universidad Jorge Tadeo Lozano Facultad, Ciencias Naturales e Ingeniería Bogotá, Colombia. Disponible en línea: <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/30992/T%c3%a9llez%20J.%202022.%20Botrytis%20spp.%20estado%20actual%20de%201%20biocontrol..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Terrones-Salgado, J., Nieto-Ángel, D., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortiz, D., García-Velasco, R., Vallejo-Pérez, M. R., y Sánchez-García, P. (2019). *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(3): 365-382. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>
- Valido, P. A. (2022). Caracterización de cianobacterias aisladas de suelos como agentes de control biológico. Facultad de Ciencias Experimentales Universidad de Almería. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/10835/14860>
- Velosa, M., Ramírez, S., Miño, J., Uricochea, J., Ramírez, J., y González, C. (2003). Manejo biológico de la pudrición del fruto (*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr.) en la mora (*Rubus glaucus* Benth) en condiciones de laboratorio. Memorias del XXIV Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Armenia, Quindío, Colombia. 3-4 p. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/21304>.
- Vera, J. J. J. (2022). Efectos de los fungicidas en el control del moho gris *Botrytis cinerea* en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Trabajo de titulación. Universidad Técnica de Barbahoyo. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Disponible en línea:

<http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/13162/EUTBFACIAGING%20AGRON-000434.pdf?sequence=1>

- Wang, X., Kramer, E., Glawe, D.A., and Okubara, P.A. (2002). Fruit colonization and biological control of postharvest *Botrytis* bunch rot by wild vineyard yeasts from Washington State. *Phytopathology* 108(6): 691-70. <https://doi.org/10.1094/phyto-09-17-0306-r>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal Rna genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wolcan, S., Ronco L., y Alippi H. (1994). Mancha de la hoja de *Limonium sinuatum* en la Argentina. Disponible en línea: <http://revista-vieja.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/viewFile/949/698>.
- Zhang, J., Li L., Lv, Q., Yan L., Wang, Y., and Jiang, Y. (2019). The Fungal CYP51s: Their functions, structures, related drug resistance, and inhibitors. *Frontiers of Microbiology*. 10: 691.

11. ANEXOS

Anexo 1. Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* cepa C1R1 al sexto dds, en las réplicas 1 y 2 con los tratamientos testigo, Scala, Full-Gro, Sportak, Cinnasure y Citrex.

Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2
Testigo	45.55 ^a	56.85 ^a
Scala	0.27 ^a	0 ^a
Full-Gro	0 ^a	0 ^a
Sportak	0 ^a	0 ^a
Cinnasure	0 ^a	0 ^a
Citrex	0 ^a	0 ^a

Medias con una letra común indican que no existen diferencias significativas ($p > 0.01$).

Anexo 2. Área de crecimiento micelial (cm²) de *B. cinerea* cepa C2R5 al sexto dds, en las réplicas 1 y 2 con los tratamientos testigo, Scala, Full-Gro, Sportak, Cinnasure y Citrex.

Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2
Testigo	63.61 ^a	63.61 ^a
Scala	0.25 ^a	0.41 ^a
Full-Gro	0 ^a	0 ^a
Sportak	0 ^a	0 ^a
Cinnasure	0 ^a	0 ^a
Citrex	0 ^a	0 ^a

Medias con una letra común indican que no existen diferencias significativas ($p > 0.01$).