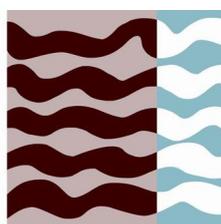


UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Departamento de Producción Vegetal.



ETSIA
Cartagena

PROYECTO FIN DE CARRERA INGENIERÍA AGRNÓMICA

“CONTROL BIOLÓGICO *in vitro* DE DIVERSOS AISLADOS DE *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. OBTENIDOS DE PLANTAS ORNAMENTALES”

Director: Juan Antonio Martínez Fernández

Alumno: Marina Roca García

Septiembre, 2013

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi Profesor Juan Antonio Martínez, por su buena disponibilidad para transmitir y compartir conocimientos, por su incondicional apoyo en la ejecución de este proyecto y por creer en mí y darme ánimo en mis momentos difíciles.

Me gustaría agradecer a mis padres tantas cosas. Para empezar el hogar tan maravilloso que consiguieron crear para mis hermanos y para mí, el cual recuerdo ahora con nostalgia. Es difícil imaginar cómo sería el andar cotidiano sin recordar su comprensión, su apoyo inmenso, su esfuerzo poder llegar a este punto de mi carrera y su amor. Espero que os sintáis orgullosos de mí y ojala el día de mañana yo consiga hacerlo sólo la mitad de bien que vosotros. Os quiero.

Mis hermanos por darme el aliento necesario en los momentos que más lo he necesitado. Vosotros me habéis impulsado a seguir adelante tras mis sueños en muchas ocasiones. Espero estar a la altura de las circunstancias cuando alguno de vosotros lo necesite. Me siento tan orgullosa de mi "Defe" y mi "Josefo". Os adoro.

A mis amigos y compañeros de universidad. A pesar de la distancia yo sé que muchos de vosotros estáis ahí y lo demostráis.

Mis Joak@s, que os voy a decir que no sepáis ya... no sois mis amigos sois parte de mi familia. Con muchos de vosotros he compartido largas horas de estudio en la biblio y hemos sufrido juntos el esfuerzo de luchar por un sueño. Me habéis levantado el ánimo muchísimas veces tanto en mi vida personal como en la estudiantil y sin vosotros esto tampoco lo hubiera podido conseguir. Gracias por no permitir que la distancia rompa este lazo tan bonito y tan fuerte que existe.

A la familia Nieto y Ros por haberme recibido con los brazos abiertos. Gracias por vuestro cariño, apoyo y permitirme compartir como un miembro más el amor de vuestra familia.

Por último y más importante quiero darte las gracias a ti, Jesús. Desde que te cruzaste en mi vida sólo me has aportado cosas buenas. Agradezco los consejos que me das siempre en el momento exacto para no dejarme caer y enfrentarme a la vida en los momentos difíciles. Muchísimas gracias por tu paciencia, comprensión, amor... Gracias por permitirme caminar a tu lado para crear un hogar en el que sólo se puede ser feliz. Significas TODO para mí.

“Hay en el mundo un lenguaje que todos comprenden: es el lenguaje del entusiasmo, de las cosas bien hechas con amor y con voluntad, en busca de aquello que se desea o en lo que se cree”

Paulo Coelho

INDICE

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. ASPECTOS COMERCIALES Y AGRONÓMICOS DE LAS PLANTAS ORNAMENTALES.....	4
2.1. Descripción de las especies y clasificación botánica.....	5
2.1.1. Hortensia.....	5
2.1.1.1. Origen.....	5
2.1.1.2. Clasificación taxonómica.....	5
2.1.1.3. Características morfológicas.....	5
2.1.2. Geranio.....	6
2.1.2.1. Origen.....	6
2.1.2.2. Clasificación taxonómica.....	6
2.1.2.3. Características morfológicas.....	7
2.1.3. Ciclamen.....	8
2.1.3.1. Origen.....	8
2.1.3.2. Clasificación taxonómica.....	9
2.1.3.3. Características morfológicas.....	9
2.1.4. Lantana.....	11
2.1.4.1. Origen.....	11
2.1.4.2. Clasificación taxonómica.....	11
2.1.4.3. Características morfológicas.....	13
2.1.5. Madreselva.....	13
2.1.5.1. Origen.....	13
2.1.5.2. Clasificación taxonómica.....	14
2.1.5.3. Características morfológicas.....	14
2.2. Cultivo y comercialización.....	15
2.2.1. Hortensia.....	15
2.2.1.1. Multiplicación.....	15
2.2.1.2. Condiciones de cultivo.....	15
2.2.1.3. Fertilización y coloración de las flores.....	17
2.2.1.4. Importancia y tendencia del cultivo de hortensia.....	18
2.2.2. Geranio.....	18
2.2.2.1. Multiplicación.....	18

2.2.2.2. Condiciones de cultivo.....	20
2.2.2.3. Fertilización y coloración de las flores.....	21
2.2.2.4. Importancia y tendencia del cultivo de hortensia.....	21
2.2.3. Ciclamen.....	21
2.2.3.1. Multiplicación.....	21
2.2.3.2. Condiciones de cultivo.....	22
2.2.3.3. Fertilización y coloración de las flores.....	23
2.2.3.4. Importancia y tendencia del cultivo de hortensia.....	23
2.2.4. Lantana.....	24
2.2.4.1. Multiplicación.....	24
2.2.4.2. Condiciones de cultivo.....	24
2.2.4.3. Fertilización y coloración de las flores.....	24
2.2.4.4. Importancia y tendencia del cultivo de hortensia.....	25
2.2.5. Madreselva.....	25
2.2.5.1. Multiplicación.....	25
2.2.5.2. Condiciones de cultivo.....	25
2.2.5.3. Fertilización y coloración de las flores.....	26
2.2.5.4. Importancia y tendencia del cultivo de hortensia.....	26
2.3. Importancia económica de la comercialización de plantas ornamentales de maceta para la Región de Murcia.....	27
CAPÍTULO 3. BOTRYTIS BLIGHT EN LOS CULTIVOS DE PLANTAS ORNAMENTALES.....	30
3.1. Descripción del hongo <i>Botrytis cinerea</i>	31
3.1.1. Etimología y clasificación taxonómica.....	31
3.1.2. Características morfológicas.....	32
3.1.2.1. Micelio.....	32
3.1.2.2. Conidióforos o Macroconidióforos.....	33
3.1.2.3. Conidios o Macroconidios.....	33
3.1.2.4. Microconidióforos y Microconidios.....	34
3.1.2.5. Clamidosporas.....	35
3.1.2.6. Esclerocios.....	36
3.1.2.7. Apotecios.....	37
3.2. Aspectos patológicos del hongo y de la enfermedad <i>Botrytis blight</i>	37
3.2.1. Sintomatología y diagnóstico.....	37
3.2.2. Variabilidad genética y fenotípica de los diferentes aislados de <i>B. cinerea</i>	38

3.2.3. Tipo de huéspedes y epidemiología.....	41
3.3. Importancia económica de la incidencia de <i>Botrytis blight</i>	42
CAPÍTULO 4. CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS ORNAMENTALES..	47
4.1. Métodos de control de las enfermedades causadas por <i>Botrytis</i> spp.....	48
4.1.1. Fungicidas de síntesis.....	48
4.1.2. Sustancias naturales de acción fungicida.....	50
4.1.3. Control biológico.....	51
4.1.4. Potenciación de las defensas naturales de las plantas.....	52
4.1.4.1.- Activadores físicos.....	53
4.1.4.1.1.- Atmósferas modificadas.....	53
4.1.4.1.2.- Tratamientos térmicos.....	54
4.1.4.1.3.- Radiación gamma.....	55
4.1.4.1.4.- Radiación ultravioleta.....	55
4.1.4.2.- Activadores químicos.....	57
4.1.4.2.1.- Inducción de etileno tras la respuesta hipersensible.....	57
4.1.4.2.2.- Quitosán.....	57
4.1.4.2.3.- Antioxidantes.....	59
4.1.4.2.4.- Ácido salicílico.....	59
4.1.4.2.5.- Calcio.....	60
4.1.4.2.6.- Laminarina.....	61
4.1.5.- Modificación genética de las plantas.....	61
4.1.5.1.- Plantas transgénicas resistentes a enfermedades.....	61
4.1.5.2.- Fuentes de genes para la bioingeniería de plantas.....	63
4.1.5.3.- Manipulación de la biosíntesis de etileno.....	64
CAPÍTULO 5. APLICACIÓN <i>in vitro</i> DE LAS BACTERIAS <i>Bacillus subtilis</i> Y <i>B. velezensis</i> Y DEL HONGO <i>Trichoderma harzianum</i> EN EL CONTROL DEL CRECIMIENTO DE DISTINTOS AISLADOS DE <i>Botrytis cinerea</i> OBTENIDOS DE PLANTAS ORNAMENTALES.....	66
5.1. Introducción y antecedentes.....	67
5.1.1. <i>Bacillus subtilis</i>	67

5.1.2. <i>Bacillus velezensis</i>	68
5.1.3. <i>Trichoderma harzianum</i>	68
5.2. Materiales y métodos.....	69
5.2.1. Material experimental.....	69
5.2.2. Tratamientos.....	72
5.2.3. Unidad de observación y número de repeticiones.....	73
5.2.4. Definición, tipo y clasificación de las variables.....	73
5.2.5. Establecimiento de la hipótesis.....	74
5.2.6. Análisis estadístico.....	75
5.2.7. Protocolo de las mediciones.....	76
5.3. Resultados y discusión.....	77
5.3.1. Aislado de <i>B. cinerea</i> obtenido de <i>Lonicera japonica</i> - <i>T. harzianum</i>	77
5.3.2. Aislado de <i>B. cinerea</i> obtenido de <i>Cyclamen persicum</i> - <i>T. harzianum</i>	78
5.3.3. Aislado de <i>B. cinerea</i> obtenido de <i>Hydrangea Macrophylla</i> - <i>T. harzianum</i>	79
5.3.4. Aislado de <i>B. cinerea</i> obtenido de <i>Lantana camara</i> - <i>T. harzianum</i>	80
5.3.5. Aislado de <i>B. cinerea</i> obtenido de <i>Lantana camara</i> - <i>T. harzianum</i>	81
5.3.6. Aislados de <i>B. cinerea</i> frente a <i>B. subtilis</i> y <i>B. velezensis</i>	82
5.4. Conclusiones.....	84

CAPÍTULO 6. ESTUDIO DEL EFECTO <i>in vitro</i> DE <i>Bacillus velezensis</i> EN EL DESARROLLO DE DISTINTOS AISLADOS DE <i>Botrytis cinerea</i> OBTENIDOS DE PLANTAS ORNAMENTALES.....	85
6.1. Introducción y antecedentes.....	86
6.1.1. <i>Bacillus velezensis</i>	86
6.2. Materiales y métodos.....	87
6.2.1. Material experimental y tratamientos.....	87
6.2.2. Tratamientos.....	89
6.2.3. Unidad de observación y número de repeticiones.....	89
6.2.4. Definición, tipo y clasificación de las variables.....	90
6.2.5. Establecimiento de la hipótesis.....	91
6.2.6. Análisis estadístico.....	92
6.2.7. Protocolo de las mediciones.....	93
6.3. Resultados y discusión.....	93
6.3.1. Aislado de <i>B. cinerea</i> obtenido de <i>Lonicera japonica</i> - <i>B. velezensis</i>	93
6.3.2. Aislado de <i>B. cinerea</i> obtenido de <i>Cyclamen persicum</i> - <i>B. velezensis</i>	94
6.3.3. Aislado de <i>B. cinerea</i> obtenido de <i>Hydrangea macrophylla</i> – <i>B. velezensis</i>	95
6.3.4. Aislado de <i>B. cinerea</i> obtenido de <i>Lantana camara</i> - <i>T. harzianum</i>	96
6.4. Conclusiones.....	99
CAPÍTULO 7. ESTUDIO DEL EFECTO <i>in vitro</i> DE LAS SUSTANCIAS INHIBITORIAS SEGREGADAS POR <i>Bacillus velezensis</i> EN EL DESARROLLO DE DISTINTOS AISLADOS DE <i>Botrytis cinerea</i> OBTENIDOS DE PLANTAS ORNAMENTALES.....	100
7.1. Introducción y antecedentes.....	101
7.1.1. Sustancias inhibitorias segregadas por <i>Bacillus spp</i>	101

7.2. Materiales y métodos.....	103
7.2.1. Material experimental y tratamientos.....	103
7.2.2. Tratamientos.....	106
7.2.3. Unidad de observación y número de repeticiones.....	107
7.2.4. Definición, tipo y clasificación de las variables.....	107
7.2.5. Establecimiento de la hipótesis.....	109
7.2.6. Análisis estadístico.....	109
7.2.7. Protocolo de las mediciones.....	111
7.3. Resultados y discusión.....	112
7.3.1. <i>Lonicera japonica</i> + <i>B.velezensis</i> - <i>Lonicera japonica</i>	112
7.3.2. <i>Cyclamen persicum</i> + <i>B.velezensis</i> - <i>Cyclamen persicum</i>	113
7.3.3. <i>Hydrangea Macrophylla</i> - <i>B.velezensis</i>	115
7.3.4. <i>Lantana cámara</i> - <i>T. harzianum</i>	117
7.4. Conclusiones.....	121
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES.....	122
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA.....	124

1.

I N T R O D U C C I Ó N

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades fúngicas constituyen uno de los problemas fitosanitarios que afecta a las plantas ornamentales, siendo una de las más importantes la “podrición o podredumbre gris”, también denominada “Botrytis Blight”, cuyo agente causal es el hongo *Botrytis cinerea* Pers. (Jarvis, 1977; Jarvis, 1980; Álvarez, 1982).

Durante los últimos 50 años, el control de *B. cinerea* se ha basado fundamentalmente en el uso de fungicidas de acción protectora y también de carácter sistémico (Almandoz *et al.*, 2000). Sin embargo, la utilización de estos productos se ha vuelto cada vez menor, debido a una serie de motivos tales como: la destrucción de la capa de ozono, la contaminación del ambiente debido al acúmulo de residuos tóxicos en el agua, suelo, plantas y animales, los peligros para la salud de los agricultores que lo aplican y para el consumidor (residuos en las frutas y hortalizas), el exterminio de microorganismos beneficiosos por la alteración del equilibrio biológico y la adquisición de resistencia por parte de los patógenos y conversión en plaga a aquellos no considerados como tales.

Actualmente se prefiere en la agricultura el uso de prácticas más ecológicas como el control biológico, mediante el uso de microorganismos antagonistas, los cuales pueden limitar la iniciación y propagación de las enfermedades causadas por patógenos vegetales mediante mecanismos de competencia, antibiosis, inducción de resistencia, entre otros [Fernández-Larrea, 2001].

El control biológico es definido por Garret (1965) como cualquier condición o práctica por medio de la cual la supervivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de la mediación de cualquier otro organismo no patógeno, excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad. Para ello, es necesario conocer y entender los sistemas de cultivo, la epidemiología de la enfermedad, la biología, ecología y dinámica de población de los antagonistas, definidos como agentes biológicos capaces de interferir en el ciclo biológico de los patógenos de plantas (Parkinson y Waid, 1960).

El mejor aliado en el control biológico de enfermedades de plantas es la gran variedad de microorganismos nativos factibles de utilizarse. Tanto los hongos como las bacterias, son reconocidos como supresores de patógenos de plantas, limitando la severidad de las enfermedades en los cultivos (Blakeman y Fokkema, 1982; Windels y Lindow, 1985).

La mayoría de las especies vegetales sintetizan metabolitos antimicrobiales que inhiben las infecciones por hongos fitopatógenos, ya sea como parte de su programa normal de crecimiento y desarrollo, o en respuesta al ataque de patógenos y otras condiciones de estrés (Morrissey y Osbourn, 1999; Osbourn, 1999; Lambers *et al.*, 2000). Muchos de estos compuestos han sido caracterizados químicamente, y su

importancia, tanto en la prevención como control de enfermedades fúngicas vegetales, ha sido demostrada (Duke, 1990; Jeandet *et al.*, 2002). En este contexto, extractos, aceites esenciales o metabolitos secundarios con actividad antifúngica derivados de plantas, pueden ser utilizados en el control de enfermedades vegetales (Fiori *et al.*, 2000). Los productos naturales de plantas presentan una serie de ventajas con respecto a los fungicidas sintéticos, tales como una baja toxicidad, menor residualidad y una alta selectividad (Tewari, 1990, Rao, 1990, Badei *et al.*, 1996; Bishop y Thornton, 1997), por lo que pueden ser ideales candidatos para su uso como agroquímicos (Duke, 1990; Macías *et al.*, 1998; Aplablaza *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003).

El mejor aliado en el control biológico de enfermedades de plantas es la gran variedad de microorganismos nativos factibles de utilizarse. Tanto los hongos como las bacterias, son reconocidos como supresores de patógenos de plantas, limitando la severidad de las enfermedades en los cultivos (Blakeman y Fokkema, 1982; Windels y Lindow, 1985). En el caso de los hongos, los más utilizados son de la clase Hyphomycetes, y de éstos, varias especies del género *Trichoderma* (Jensen y Wolffhechel, 1995).

El género *Botrytis* ha sido objeto de estudio en diversos trabajos pero la mayoría de ellos relacionados con cultivos de hortalizas y frutales. En este trabajo nos vamos a centrar en el control de la podredumbre gris en plantas ornamentales (*Hydrangea macrophylla*, *Pelargonium*, *Cyclamen persicum*, *Lantana camara* y *Lonicera japonica*) por medio de microorganismos antagonistas (bacterias de poder antagonista constatado), como *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis* o partir de un hongo como *Trichoderma harzianum*.

2. ASPECTOS COMERCIALES Y AGRONÓMICOS DE LAS PLANTAS ORNAMENTALES

CAPÍTULO 2. ASPECTOS COMERCIALES Y AGRONÓMICOS DE LAS PLANTAS ORNAMENTALES

2.1. Descripción de las especies y clasificación botánica

2.1.1. Hortensia

2.1.1.1. Origen

La hortensia común, *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser., (Fig. 2.1) es originaria del Pacífico central, especialmente de la isla japonesa de Honshu. *Hydrangea* es un término que deriva del griego y significa “vaso de agua”, en su alusión a las altas exigencias hídricas, aunque para algunos hace referencia a la forma de sus semillas, que podrían asemejarse a recipientes antiguos usados por los griegos para llevar agua. Desde China fue llevada a Inglaterra en 1789, convirtiéndose pronto en una de las plantas favoritas de los jardines ingleses y adquiriendo a partir de ahí popularidad en el resto del mundo (Arango, 2003).



Figura 2.1. *Hydrangea macrophylla*
Fuente: Roca (2013)

2.1.1.2. Clasificación taxonómica

Pertenece al orden botánico Saxifragales y a la familia *Saxifragaceae*. El género *Hydrangea* comprende unas 90 especies, muchas de ellas comerciales como flores cortadas, bien sea secas o frescas. La mayoría son arbustos pero presentan extraordinaria variabilidad en tamaño, desde formas enanas hasta enormes plantas de varios metros de altura. También incluye formas arborescentes como *H. japonica*, trepadoras siempre verdes como *H. petiolaris*, otras que destacan por la hoja *H. quercifolia*, otras de gran tamaño como *H. paniculata*, otras con enormes penachos de flores como *H. arborescens* y muchos híbridos de *H. macrophylla* que son las mejores para el cultivo en maceta (Arango, 2003).

2.1.1.3. Características morfológicas

Hydrangea macrophylla es un arbusto caducifolio, erguido, de 1-1,5 metros de altura. Posee hojas opuestas de 7-15 cm, pecioladas, de obovadas a elípticas o anchamente ovadas, gruesas, puntiagudas (acuminadas), de margen aserrado. Las flores se disponen en ramilletes terminales globosos o hemisféricos, de 15-25 cm o más de diámetro, más raramente aplanados (cuando hay flores fértiles en la parte central). El color varía de azul a rosa o purpúreo, más raramente blancas, con 4-5 sépalos petaloideos, muy grandes, 4-5 pétalos pequeños, de unos 2-3 mm, dispuestos en forma de valva en el capullo, de color muy similar al de los sépalos, 8-10 estambres, ovario semiínfero y 3-4 estilos cortos y gruesos; en las flores fértiles, el cáliz está

reducido a 4-5 lóbulos cortos. El fruto normalmente no se forma, es una cápsula ovoide, que se abre por la parte apical (López, 2004).

De la parte subterránea o rizoma de algunas hortensias, como por ejemplo de la hortensia arborescente, *Hydrangea arborescens* Gronov. ex L., se obtiene un heterósido, la hidrangina, que tiene propiedades diaforéticas y diuréticas; tiene también algunas saponinas. Por este último motivo las hortensias son ligeramente tóxicas, y pueden causar vértigos y opresión en el pecho, además de reacciones de sensibilidad en la piel (López, 2004).

Florece a partir de mayo y hasta finales de verano, a veces hasta octubre o noviembre, si el clima lo permite. Se cultiva como una planta ornamental en parques y jardines.

2.1.2. Geranio

2.1.2.1. Origen

Los miembros de la familia *Geraniaceae* se distribuyen por todo el mundo encontrándose tanto en zonas frías como en zonas tropicales: Europa, la zona del Mediterráneo, Asia Central, Australia, África, Norte América, Centro América y Suramérica (Zimmerman, 1998a). En lo que se refiere al género *Pelargonium* más de un 90% de las aproximadamente 280 especies dentro del género son originarias de Suráfrica (Fonteno, 1992; Laughner, 1993) mientras que las especies pertenecientes al género *Geranium* proceden principalmente de Asia Central.

Las principales especies utilizadas para la obtención de los geranios zonales (*Pelargonium x hortorum*) (Fig. 2.2) se encuentran creciendo de forma natural en las provincias del este de Sudáfrica. En esta región, las lluvias son consistentes y se encuentra a mitad de camino entre las regiones de veranos extremos y de lluvias invernales.

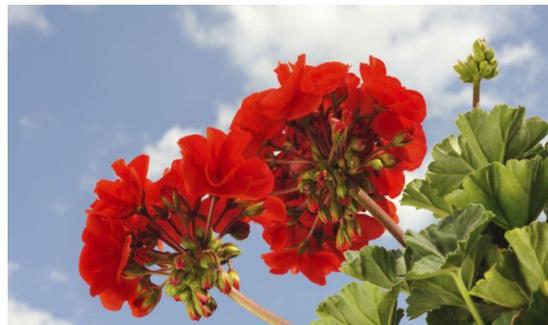


Figura 2.2. *Pelargonium*
Fuente: Roca (2013)

2.1.2.2. Clasificación taxonómica

Taxonómicamente el geranio se clasifica dentro de la familia *Geraniaceae* Juss. Según distintos autores, esta familia incluye entre cinco y once géneros a los que pertenecen unas 750 especies (Zimmerman 1998a). Los géneros más conocidos son *Erodium* y *Geranium* a nivel de plantas silvestres y *Pelargonium* en cuanto a plantas de jardines.

Cuando nos referimos al geranio, en realidad, estamos hablando de numerosas especies y dos géneros distintos: *Pelargonium* y *Geranium*. Los nombres de estos

géneros normalmente se confunden debido a que el término 'geranio' es el nombre común de ciertas especies de *Pelargonium*. La diferencia entre ambos géneros fue establecida por L'Héritier, las principales características que los distinguen son la presencia en *Pelargonium* de un tubo nectario (Harney, 1976; Laughner, 1993) y la diferencia en el número de estambres (Abo El-Nil, 1990). Los nombres proceden del griego y se refieren a las formas semejantes a picos de aves que adquieren sus frutos. Así la palabra "Geranium" proviene de geranos que significa grulla y "Pelargonium" deriva de pelargos, que significa cigüeña (Laughner, 1993).

El gran número de especies incluidas dentro del género *Pelargonium* L., se divide en la actualidad en dieciséis subgéneros o secciones (Van Der Walt, 1977). La clasificación de los individuos pertenecientes a este género varía a medida que se van realizando estudios para conocer mejor las relaciones que existen entre ellos. Estas dificultades se deben a que los geranios que actualmente conocemos son híbridos con una herencia compleja que proceden de cruzamientos realizados entre diferentes especies durante siglos. Los primeros intentos de clasificación se basaron en variables macroscópicas centrándose en caracteres morfológicos, anatómicos, palinológicos y ecológicos (Van Der Walt, 1977; Van Der Walt y Vorster, 1981). Con la aparición de nuevas técnicas se han realizado estudios cariológicos (Yu y Horn, 1998), quimiotaxonómicos (Lis Balchin, 1997) y a nivel de material genético con el empleo de RAPDs [Random Amplified Polimorphic DNA] (Renou *et al.*, 1997), ASAP [Arbitrary Signatures from Amplification Profiles] (Starman y Abbitt, 1997) y análisis del DNA mitocondrial y cloroplástico (Bakker *et al.*, 2000).

2.1.2.3. Características morfológicas

Botánicamente la familia *Geraniaceae* está formada por plantas herbáceas aunque pueden ser arbustos o medio arbustos con tallos gruesos y carnosos (Zimmerman, 1998a; Anónimo, 1999).

Las plantas del género *Pelargonium* son plantas vivaces de follaje perenne (a diferencia de las plantas pertenecientes al género *Geranium*) semirresistentes, casi siempre arbustivas. Tienen una base leñosa pero los nuevos brotes son tiernos. En condiciones favorables pueden alcanzar más de un metro de altura. Hay algunas variedades llamadas "variedades enanas" que no alcanzan más de 25 centímetros de altura y hay otros más pequeños llamados "miniaturas" (Nessmann, 1998).

Toda la planta está cubierta por una fina capa pilosa. Los pelos glandulares del tallo, peciolo y hoja producen las características fragancias de terpenos de estas especies. El tallo es grueso, más ramificado en la base de la planta. Presenta parejas de estípulas verdes en forma de triángulos que se unen de forma persistente en la zona de la yema. Las hojas son gruesas, curvadas en la base y con un aspecto aterciopelado. Pueden llegar a tener más de diez centímetros de envergadura, son palmeadas y tienen de tres a cinco lóbulos poco profundos con un borde ondulado. Se unen al tallo mediante un peciolo largo (Nessmann, 1998). Las hojas se sitúan en el tallo de forma alterna en la parte superior y opuesta en la zona inferior (Zimmerman, 1998a). Las

tonalidades verdes varían en función de la variedad y suelen tener una 'zona' característica en el centro del haz y paralela al borde de la hoja. A esta característica le debe su nombre el de geranio zonal (*Pelargonium x hortorum*). La banda es debida a la presencia de antocianinas y puede ser de color negro, castaño, rojo, bronce o carmín. Algunas especies destacan por sus hojas teñidas de blanco o amarillo, pueden ser variegadas, bicolores e incluso tricolores (Nessmann, 1998) (Fig. 2.3).

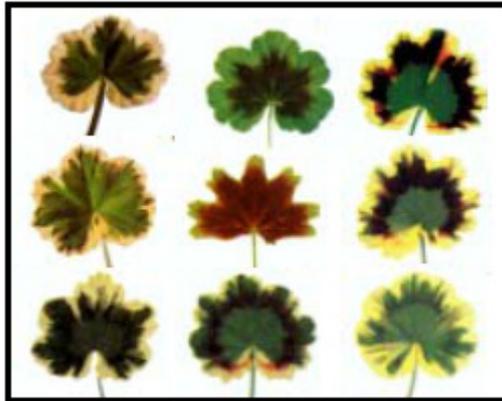


Figura 2.3. Variegación en las hojas de geranio zonal.
Fuente: Alonso (2002).

Las especies del género *Pelargonium* tienen una inflorescencia compuesta redondeada situada al final de un largo pedúnculo floral. Las inflorescencias contienen docenas de flores pentámeras y están agrupadas en umbelas densas y compactas (Nessmann, 1998). Las flores pueden ser de tres tipos: simples, con 5 pétalos; semidobles que tienen de 6 a 15 pétalos y dobles donde se observan más de 16 pétalos (Horn, 1994). Los colores de flores son claros y brillantes con tonalidades muy variadas que incluyen el blanco, el crema, el naranja, el rosa, el salmón, el rojo, el malva, morado y combinaciones de estos. En muchas ocasiones poseen un color más intenso en el interior de los pétalos (Mitchell *et al.*, 1998; Zimmerman, 1998b). Las flores se abren desde mayo hasta octubre sin ninguna interrupción (Nessmann, 1998).

Los frutos tienden a curvarse en forma de pico y son esquizocarpos, es una forma de fruto entre dehiscente e indehiscente donde cada uno de los cinco mericarpos contiene una semilla. Cuando los frutos maduran se escinden y pueden ser diseminadas por el viento o por animales. La cápsula del fruto tiene un color verde y cuando madura se torna marrón (Zimmerman, 1998a).

2.1.3. Ciclamen

2.1.3.1. Origen

El ciclamen (Fig. 2.4) es una de las más populares plantas de floración invernal en Europa. Su nombre deriva de la palabra griega *Kyclos*, que significa circular y hace referencia a la redondez del tallo que sostiene la cápsula de las semillas (Grey-Wilson, 1997).



Figura 2.4. *Cyclamen persicum*
Fuente: Roca (2013)

Dentro del género *Cyclamen* (familia de las *primuláceas*), se engloban varias especies, la mayoría de ellas procedentes del oeste de Asia Menor, desde el sur de Turquía hasta Jordania. También se encuentran presentes, en las islas griegas de Rodas, Karpos y Creta así como en el Norte de África.

Cyclamen fue introducido en España en los años 40 por un jardinero austriaco que se asentó en Madrid, D. Rudolf Klobuznik, y que consiguió mediante mezcla de variedades que soportara y se adaptara a las inclemencias de la climatología de la Península Ibérica (Jiménez y Caballero, 1990).

2.1.3.2. Clasificación taxonómica

La taxonomía del género *Cyclamen* está sin resolverse, en gran parte por su heterogeneidad genética. Una primera clasificación de las variedades de este género puede hacerse de acuerdo con el número de cromosomas de su genotipo, así hay dos tipos de ciclamen los Diploides y los Tetraploides. Los Diploides a los que pertenecen las razas pastel y los híbridos, son plantas de características muy regulares, de mata compacta, flores grandes, hojas matizadas, especialmente adaptadas al cultivo en maceta pequeña y de ciclo corto de producción. Los Tetraploides, a los que pertenecen las variedades holandesas de flor y mata grande, especialmente indicado para la floración de otoño y cultivo en grandes macetas, siendo su ciclo de cultivo de más de un año (Masramón, 1983).

En definitiva a la hora de agrupar los tipos varietales, pueden encontrarse diversas clasificaciones, siendo una de ellas la siguiente (Jiménez y Caballero, 1990):

- Tipo pastel. Desarrollados en Alemania, Francia y Bélgica son los de mayor importancia en el mercado. Destacan las variedades Johann Strauss y Johann Brahms.
- Tipo clásico o de flor grande. Engloban los denominados Aaalsmeer, con series como Rosa de Zalendorf, Arlequín, Sylphide y Cardinal.
- Híbridos F1. Con diferentes líneas propias de cada casa de semillas: Firmament, Virgo, Concerto, Carmen, Pastourelle y Rosamunde.
- Tipo miniatura. Las variedades que tienen importancia creciente son Syrius, Willie, Brigitte, Collete y Anglia.
- Tipo rococó. Fue muy cultivado hace 20 años.

2.1.3.3. Características morfológicas

El ciclamen es una planta de porte herbáceo, las flores tienden a disminuir de tamaño conforme aumenta la edad de la planta. La altura de la planta es de 30 a 40

centímetros y presenta debajo de los cormos raíces fibrosas (Espinosa y Rodríguez, 2006).

El cormo de *Cyclamen persicum* es redondo y deprimido por los polos, de superficie áspera, algo fisurado y suberoso (estructura de corcho) cuando madura (Fig. 2.5) con un sistema radicular numeroso, emitido desde la base.



Figuras 2.5. Cormos de ciclamen (*Cyclamen persicum*).
Fuente: Espinosa (1998).

El ciclamen es una pseudomonocotiledónea debido a que sólo un cotiledón se encuentra en el embrión. La primera hoja verdadera se desarrolla en forma opuesta al cotiledón. Los cotiledones se asemejan a las hojas verdaderas (Espinosa y Rodríguez, 2006).

Las hojas suelen ser redondas, con ligera forma acorazonada y de aspecto carnosos, en el haz su coloración forma dibujos en verde y blanco mármol. Los peciolos son carnosos, de diferentes longitudes y confieren a la vegetación forma circular. Todas las hojas de ciclamen son basales (nacen directamente del tubérculo); cuando emergen, la lámina de la hoja está plegada hacia dentro, con las dos mitades situadas lado a lado, pero a medida que la hoja aumenta de tamaño se expande (Espinosa y Rodríguez, 2006).

El cáliz consiste de cinco sépalos simples y pequeños; iguales en tamaño y forma; y generalmente elípticos, lanceolados, con un ápice puntiagudo, unidos en la base, cerca de donde el cáliz se conecta con el pedúnculo. Los sépalos siempre son glandulares, en ocasiones muy densamente. Los sépalos se aprietan estrechamente en la pared del tubo de la corola y generalmente son más o menos de la misma longitud que el tubo; cuando la corola se cae, éste se pierde (Espinosa y Rodríguez, 2006).

La corola es la parte más llamativa de la flor, a menudo con un color brillante. En flores normales existen cinco pétalos fusionados en la base, en un tubo corto ligeramente globoso que aloja los estambres y el ovario. El color de la corola va de blanco a rosa, en algunas ocasiones se presenta un rojo carmín; las formas más pálidas a menudo manifiestan una zona rosa o morada alrededor de la boca. Los pétalos varían en forma, desde oblongo a elíptico o estrechamente lanceolado, de moderada a notablemente torcidos, de 2 a 3,7 centímetros de largo (mucho más largos en algunas variedades).

El fruto de ciclamen es globoso, bastante duro, hasta la madurez, y se describe a menudo como leñoso, pero la cápsula es carnosa. Cuando madura, el fruto se hiende regularmente en el ápice en 10 dientes pequeños y triangulares que se vuelven hacia atrás para descubrir las semillas (Espinosa y Rodríguez, 2006).

Las semillas en desarrollo están embebidas en una pulpa blanca que se torna más suave a medida que el fruto madura; inicialmente las semillas son blancas, pero antes de que los frutos maduren son de color miel y después se vuelven café oscuro. Su número varía un poco de cápsula a cápsula y de especie a especie. Las semillas de ciclamen son de 3 a 4 milímetros de largo y de 2 a 3 milímetros de ancho. Contienen un pequeño embrión recto con un solo cotiledón, que está encerrado en un endospermo (Espinosa y Rodríguez, 2006).

2.1.4. Lantana

2.1.4.1. Origen

Lantana pertenece a la familia de las *verbenáceas*, también es conocida como “bandera española”, “ou i tomaca”, “confite”, “frutillo”, “flor de duende”, “flor de sangre”, “tres colores”, “yerba de cristo”, “cariquito” (Fig. 2.6).

Es una planta originaria del Caribe, África oriental, Suráfrica, Asia meridional, Australia y las islas del Pacífico (Holm *et al.*, 1977).

Está incluida en la lista de *las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo* de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Esta especie se ha naturalizado en las zonas tropicales y regiones cálidas de todo el mundo. En el altiplano de Kenia se puede encontrar a lo largo de senderos, campos abandonados, y explotaciones agrícolas. También se ha naturalizado en los Estados Unidos, en particular en los llanos costeros del Atlántico, desde Florida a Georgia (Lyons y Miller, 1999).



Figura 2.6. *Lantana camara*
Fuente: Roca (2013)

Lantana por su gran poder de expansión se ha adaptado perfectamente al clima de la Península Ibérica, especialmente a la costa mediterránea.

2.1.4.2. Clasificación taxonómica

La familia *Verbenaceae* incluye alrededor de 75 géneros y especies de 3.000 hierbas, arbustos y árboles de zonas tropicales y subtropicales del mundo (Conn, 1992).

Day *et al.*, (2003) resume la compleja taxonomía inherente a la familia *Verbenaceae* y al género *Lantana*. Este género se compone de 150 especies de arbustos y hierbas, nativas de América tropical, África y Asia (Conn, 1992; Dayet *et al.*, 2003). Holm *et al.*, (1979) registró que nueve de estas especies son malas hierbas en varias áreas tropicales y subtropicales. Por lo que finalmente se puede dividir el género *Lantana* en cuatro secciones distintas (Munir, 1996). Nos centraremos en dos de estas secciones, ya que son las más comerciales: la Calliorheas que incluye *L. montevidensis* y la sección Camara, que incluye *L. camara*. Ambas secciones se diferencian entre otras cosas en el número de cromosomas haploides, en el caso de la primera sección es de 11 y la segunda de 12.

La identificación de los tipos de *Lantana* por el color de la flor es difícil, ya que hay que fijarse tanto en el color de las yemas de interior como en las flores interiores y exteriores (Fig. 2.7). Tanto las flores de *L. camara* como las de *L. montevidensis* están disponibles en una gama similar de colores (lila, rosa, rojo, naranja, amarillo y blanco). Ambas especies son generalmente plantas pequeñas y compactas.

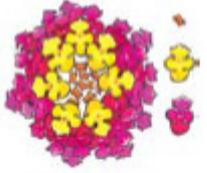
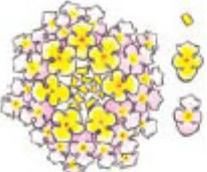
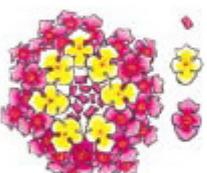
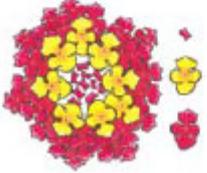
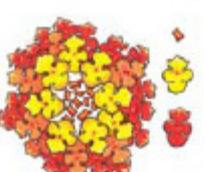
		<p><i>L. camara rosa</i></p> <p>Brote: rosa/pergamino Anillo medio: amarillo con pétalos amarillo pálido Anillo exterior: naranja con pétalos de rosa pálido a oscuro</p>
		<p><i>L. camara blanca</i></p> <p>Brote: crema Anillo medio: amarillo con pétalos amarillo pálido Anillo exterior: naranja o amarillo con pétalos lila pálido</p>
		<p><i>L. camara rosa con filo rojo</i></p> <p>Brote: rosa o rojo oscuro Anillo medio: naranja con pétalos de amarillo pálido a naranja Anillo exterior: naranja con pétalos de rosa a rojo</p>
		<p><i>L. camara roja</i></p> <p>Brote: rojo sangre Anillo medio: amarillo con pétalos amarillo Anillo exterior: rojo con pétalos rojos</p>
		<p><i>L. camara naranja</i></p> <p>Brote: naranja Anillo medio: amarillo anaranjado con pétalos amarillos Anillo exterior: naranja con pétalos naranjas</p>

Figura 2.7. Identificación de *Lantana* por el tipo de color
 Fuente: Adaptación Johson (2005).

2.1.4.3. Características morfológicas

La planta cuenta con un sistema de raíces poco profundo formado por una raíz corta con raíces laterales que se ramifican. Lantana es un arbusto muy ramificado crece de 2 a 4 m de altura (Auld y Medd, 1987; Conn, 1992). Es capaz de llegar a subir hasta 15 m de altura (Conn, 1992), si es compatible con la vegetación circundante (Swarbrick *et al.*, 1998).

Cuando la planta es joven presenta tallos cuadrados en la sección transversal y de 24 mm de diámetro; en cambio en la madurez llega a ser más redondeada, gris-marrón y su diámetro es de unos 150 mm (Swarbrick *et al.*, 1998; Parsons y Cuthbertson, 2001).

Las hojas son de 2-12 cm de largo y de 1,5-4 cm de ancho, su tamaño depende de la variedad. Su disposición a lo largo de los tallos es un tanto especial ya que crece una frente a la otra. (Holm *et al.*, 1977; Stanley y Ross, 1986; Conn, 1992; Munir, 1996; Swarbrick *et al.*, 1998; Parsons y Cuthbertson, 2001). Las bases de las hojas son redondeadas, puntiagudas o en forma de corazón y los márgenes dentados (Conn, 1992; Swarbrick *et al.*, 1998). Las hojas de la variedad de floración rosa de *L. camara* son de color verde pálido, mientras que los de la variedad de floración rojo son más oscuros (Auld y Medd, 1987). La cara superior de las hojas a menudo se arruga y se encuentra cubierta de pelos rígidos afilados, mientras que la parte inferior puede o no puede estar cubierto de pelos cortos y suaves (Conn, 1992).

Las inflorescencias (racimos de 20-40 flores) son aproximadamente 2,5 cm de diámetro. Las yemas florales se abren desde el exterior (con combinaciones de colores: blanco, crema, amarillo, naranja, rojo, morado y rosa), hacia el centro de la inflorescencia a medida que maduran (Conn, 1992; Swarbrick *et al.*, 1998; Parsons y Cuthbertson, 2001) (Fig. 2.7).

El fruto es una drupa (erróneamente conocida como baya), de 4-8 mm de diámetro, cuando está inmaduro es verde y duro, convirtiéndose en púrpura brillante tirando a negro una vez madurado (Auld y Medd, 1987; Parsons y Cuthbertson, 2001). Los frutos nacen en racimos, los cuales contienen unos 20. Cada fruto contiene una "semilla" de color pálido, dura y de 1,54 mm de largo (Holm *et al.* 1977; Swarbrick *et al.*, 1998; Parsons y Cuthbertson, 2001).

2.1.5. Madreselva

2.1.5.1. Origen

La madreselva (*Lonicera japonica*; Suikazura 水鬘 o スイカズラ en japonés) es una especie botánica perteneciente a la familia de las



Figura 2.8. *Lonicera japonica*
Fuente: Anónimo (2011).

Caprifoliáceas (Fig. 2.8). Es nativa del este de Asia incluyendo Japón y Corea (Gleason y Cronquist, 1991). A partir de este área de distribución natural se ha extendido a Hong Kong (Thrower, 1976), Inglaterra (Clapham *et al.*, 1962), Gales (Martin, 1982), Portugal (De Baceler *et al.*, 1987), Córcega (Jeanmonod y Burdet, 1992), Hawaii (Wagner *et al.*, 1989), Brasil (Bove, 1993), Argentina (Bonaventura *et al.*, 1991) y el territorio continental de Estados Unidos, principalmente a través de la introducción de la horticultura.

El término madreselva se ha usado durante mucho tiempo para designar a las especies integrantes del género *Lonicera*. El término "Lonicera" fue usado por primera vez por Linneo en 1753 adaptando al latín el apellido "Lonitzer", en honor del botánico Lonitzer (1528-1586).

En España se cultiva profusamente, a veces de modo reiterado y abusivo, para formar setos y cubrir muros y vallas en casi todas las provincias. A menudo se asilvestra, naturalizándose en orlas forestales, matorrales aclarados y lugares alterados sobre todo en el norte de Cataluña y en el País Vasco, en menor medida en el resto de la Península, Baleares y Canarias (Devesa, 2007).

2.1.5.2. Clasificación taxonómica

Lonicera es un género de más de 180 especies que se presentan como arbustos o lianas trepadoras de hoja perenne o caduca. Todas presentan hojas opuestas y flores con la corola bilabiada y con el tubo de la corola, en general bastante largo. La mayoría de las flores suelen ofrecer aromas y néctares muy dulces para atraer polinizadores (Brickell y Zuk, 1997).

Hay cuatro variedades de madreselva que se consideran las más populares:

- Madreselva etrusca (*Lonicera etrusca*)
- Zapaticos (*Lonicera implexa*)
- Madreselva del bosque (*Lonicera peryclimenum*)
- Madreselva japonesa (*Lonicera japonica*)

2.1.5.3. Características morfológicas

Madreselva japónica es una planta perenne en algunas regiones y muy vigorosa. Sus tallos son de color rojizo a marrón y van de 1 a 5 cm de diámetro pudiendo llegar muchos hasta los 10 cm en plantas viejas (Webb *et al.*, 1988).

Las hojas principales van de ovadas a oblongas, comúnmente sus dimensiones son de 2,5 a 12 cm de largo por 1,5 a 6 cm de ancho según la especie. Las hojas que sostienen flores normalmente tienden a ser más pequeñas. Tienden a cambiar de color con la edad partiendo de un profundo azul-verdoso a un amarillo-verdoso (Webb *et al.*, 1988).

Las flores son axilares en pares, fragantes, con pedúnculos 0.5-2.5 cm de largo. Toda la corola es 2.0-5.0 cm de largo y el tubo de la corola 1.0-3.0 cm. El labio inferior protuberante se compone de dos lóbulos y el superior de cuatro lóbulos. Los estambres y el estilo son aproximadamente iguales en longitud a la corola (Webb *et al.*, 1988). Los pétalos son de colores distintos dependiendo de la especie que se trate pueden variar de blanco a rojizos, amarillentos... (Webb *et al.*, 1988).

El fruto de 4 a 6 mm de diámetro, es una baya dura, globosa y de color verde cuando está inmadura y negra cuando ha madurado. Las 2 ó 3 semillas son aproximadamente de 0,2 cm de diámetro de ovadas a oblongas, con un plano cóncavo en su superficie interior y con tres crestas en la parte posterior (Webb *et al.*, 1988).

2.2. Cultivo y comercialización

2.2.1. Hortensia

2.2.1.1. Multiplicación

La hortensia es una planta fácil de propagar por medios vegetativos, las estacas y esquejes enraízan y brotan fácilmente, siempre y cuando se encuentren con humedad, temperatura y luminosidad adecuadas como se describe más adelante (Valdés, 2011).

La multiplicación se realiza a partir de esquejes de 8-10 cm de longitud, aunque si no se dispone de suficiente material vegetal pueden emplearse esquejes de menor tamaño, cogiendo 1 cm a cada lado de la hoja y dividiendo el tallo en dos partes de forma longitudinal; no obstante estos últimos tardan más tiempo en dar una planta vendible. Los esquejes se colocarán sobre sustrato de turba, turba y arena o arena sola, aunque a veces también se emplea la tierra de brezo, lo importante es que el sustrato este bien drenado. Con calor de fondo de 18-20 °C el trasplante podrá llevarse a cabo a los 30-40 días (Ballester *et al.* 1997). Puede aplicarse ácido indol-butírico (AIB) para favorecer el enraizamiento, y una vez que éste se produzca, se trasplanta a maceta de 10 cm. Para plantas plurifloras de dos años el esquejado se realiza de abril a junio, para las de un año, de enero a marzo y para las unifloras algo más tarde que en el caso anterior (Valdés, 2011).

2.2.1.2. Condiciones de cultivo

En condiciones adecuadas una hortensia puede vivir de 8 a 10 años cuando se cultiva en macetas. En cambio si se planta en plena tierra su vida es indefinida ya que las raíces tienen espacio ilimitado para extenderse y la planta no envejece.

La hortensia es una planta de temperaturas frescas, que crece óptimamente a temperaturas nocturnas de entre 11 y 15°C y diurnas entre 18 y 20°C. Bajo estas condiciones produce tallos largos, follaje vigoroso y grandes flores (Arango, 2003). Las

hortensias soportan temperaturas muy bajas y sólo los fríos muy intensos pueden causar leves daños a las partes menos lignificadas de los tallos. Por el contrario, el calor muy intenso puede causar la interrupción brusca de la floración (Valdés, 2011).

Esta planta prefiere una intensidad lumínica moderada, no le va bien vivir a pleno sol todo el año (salvo en las zonas costeras del norte); deberá disponer de una sombra sobre todo en las horas centrales del día, y a ser posible que sea parcial (Valdés, 2011).

En cuanto a las necesidades hídricas decir que la planta necesita grandes aportaciones de agua y humedad constante en el terreno o sustrato, pero éste debe tener un buen drenaje para evitar encharcamiento y así enfermedades de tipo criptogámicas y asfixia radicular. Con frecuencia, el exceso de sol induce en estas plantas síntomas de marchitez que se confunden con deshidratación, pero que desaparecen cuando baja el sol. Las hortensias sometidas a estrés hídrico se recuperan rápidamente; sin embargo, es importante evitar esta condición que puede incidir más tarde en la longitud y calidad de las flores. De hecho, los productores de hortensia en maceta en países como Francia y Alemania que tienen restricciones al uso de reguladores de crecimiento, logran reducir el tamaño de estas plantas, restringiendo el suministro de agua (Valdés, 2011).

El método corriente de producción en invernadero trata de imitar el proceso natural: propagación y sustitución del frío natural del invierno por un período controlado de 6-8 semanas, seguido de 12-14 semanas de forzado en el invernadero, consiguiéndose así plantas en floración. La temperatura más propicia para la formación de los botones florales (transformación de meristemo vegetativo en meristemo floral) para la mayoría de los cultivares de hortensia se sitúa entre 15 y 18°C. Ciertas variedades forman sus botones florales con mayor rapidez a una temperatura de 21°C mientras que para otros cultivares 12 a 15°C parece suficiente (Ballester *et al.*, 1997).

El tiempo necesario para la transformación del meristemo vegetativo en meristemo generativo es del orden de 6 a 9 semanas dependiendo de los cultivares y las temperaturas. Aunque los valores medios de las temperaturas diurna y diaria son importantes para la iniciación floral, se ha comprobado que la temperatura nocturna influye de forma más decisiva, siendo el intervalo de valores nocturnos entre 11 y 18°C el más favorable para promover el proceso iniciador (Shanks y Link, 1951).

Existe una interacción entre la temperatura y el fotoperiodo con la floración y el crecimiento de la hortensia. El crecimiento vegetativo de esta planta se potencia con los días largos, mientras que el régimen de días cortos (8-12 horas) promueve la floración. Con temperaturas de 13-18,5°C la iniciación floral de esta especie es independiente del fotoperíodo (Ballester *et al.*, 1997).

Con un intervalo de temperatura nocturna de 18,5-21°C, si las condiciones son de día corto (8 horas de luz), se produce una iniciación floral rápida, mientras que con

fotoperiodo de día largo (más de 14 horas de luz) se puede retrasar la iniciación y a una temperatura de 15°C, la longitud del día no influye en la inducción de la floración de la hortensia (Litlere y Strome, 1975).

Con temperaturas más elevadas son necesarios días cortos para obtener una floración adecuada. Con temperaturas nocturnas de 21-26,5°C, si las condiciones son de día largo se produce un severo retraso en la floración, llegando a impedirse la floración durante más de 4 meses si se proporcionan 24 horas de luz. No obstante, si con el mencionado intervalo de temperaturas se aplica un fotoperiodo de días cortos (8 horas de luz), se induce rápidamente la floración (Ballester *et al.*, 1997). Si la temperatura excede 26,5°C, se impide la iniciación floral mediante la inhibición de la diferenciación meristemática, independientemente del tratamiento fotoperiódico. Es por eso que en zonas cálidas las plantas se cultivan al aire libre para disminuir la temperatura del cultivo para que las temperaturas otoñales ayuden a promover la iniciación floral (Ballester *et al.* 1997).

La intensidad de luz también es un factor relevante en la iniciación floral de la hortensia, sobre todo si se desea obtener brotes vigorosos que den lugar a inflorescencias de gran tamaño, para lo cual es preciso mantener más de 20.000 lux durante la fase de iniciación. Con intensidades luminosas inferiores a la señalada se produce un retraso del proceso, aumentando la aparición de brotes no floríferos (Litlere y Strome, 1975). Una buena intensidad luminosa durante días cortos favorece a una formación más rápida de los botones florales, mientras que una iluminación débil durante días cortos tendría el efecto contrario (Bailey, 1989).

2.2.1.3. Fertilización y coloración de las flores

La hortensia es una planta de requerimientos nutricionales intermedios, que además son específicos según el color de las flores que se desee producir. En la producción de hortensias es importante comprender los efectos de la fertilización sobre el cambio de color en las flores, de rosa a azul. Los sépalos de todas las hortensias excepto las blancas tienen un pigmento rojo que se torna a azul al reaccionar con el aluminio. Así, la disponibilidad relativa de este elemento es el principal factor determinante sobre el color de las flores, de manera que a menos que se tomen medidas para evitar la absorción de aluminio, las flores de color rosa eventualmente se tornarán azules. De la misma manera, a menos que exista suficiente aluminio para reaccionar completamente con la antocianina o pigmento, las flores tomarán un color morado azulado que no resulta atractivo en la mayoría de variedades. La disponibilidad de aluminio está directamente relacionada con el pH de la solución del suelo: entre 5-5,5 es alta y los sépalos pueden ser azules; mientras que con rasgos de 6,0-6,5, éstos conservan un color rosa. El fósforo también interfiere con la absorción de aluminio; los niveles altos de este elemento, así como los de nitrógeno promueven la presencia de sépalos de color rosa claro, mientras que los niveles bajos de ambos combinados con abundante potasio, promueven sépalos azules claros aunque exista suficiente aluminio disponible en el sustrato. (Arango, 2003).

2.2.1.4. Importancia y tendencia del cultivo de hortensia

Hortensia es una de las plantas que más se cultiva y se comercializa en la industria de viveros y floricultura (Bailey, 1992), siendo bien valorada por sus grandes flores de vivos colores. Constituyen un producto de vivero de gran interés comercial en días comprendidos desde Semana Santa hasta el Día de la Madre (Bailey, 1989).

Comúnmente se le conoce como planta de maceta, pero en las regiones húmedas de España es más conocida como arbusto de jardín ampliamente distribuido, sobre todo en la costa norte. En la Región de Murcia las plantas de maceta y plantas de jardín como ficus, palmeras, flor de pascua, hortensia, cipreses, adelfas, hibiscos, buganvillas y van en aumento (Ochoa *et al.*, 2008). De cualquier modo, la hortensia, teniendo unos mínimos de cuidados, se puede dar en cualquier parte de España, exceptuando las zonas del interior donde por el crudo frío invernal no se podrían obtener flores.

El cultivo de hortensia en maceta tiende a aumentar el número de variedades de tipo cima globular y racimosa. *Hydrangea macrophylla* «Innocence», es una nueva variedad registrada como marca comunitaria que supone una auténtica revolución única en el mercado, ya que florece varias veces de mayo a octubre y se caracteriza por ser muy resistente al frío, ser su flor mucho más dura que las otras y por su particularidad de ir aumentando de tamaño (Namesny, 2010).

Otras especies de hortensia se están haciendo cada vez mas hueco en nuestros mercados son *H. quercifolia* u hortensia de hoja de roble, impresionante arbusto procedente de ciertas áreas de Norteamérica que además de panículas de flores color blanco roto nos regala la maravilla de un follaje original que permanece en intenso tono ladrillo desde mediado el otoño hasta casi el fin del invierno. Otra especie es *H. paniculata*, cuyo nombre específico es revelador del tipo de inflorescencia que emite, esta vez también en el mismo tono que la anterior pero con variedades en blanco puro muy hermosas. Sin olvidarnos de *H. serrata*, *H. arborescens* o *H. aspera* (Valdeón, 2008).

2.2.2. Geranio

2.2.2.1. Multiplicación

Comercialmente el geranio zonal (*Pelargonium x hortorum* Bailey) se produce de forma tradicional mediante esquejes aunque cada vez está tomando más importancia la multiplicación mediante semillas (Alonso, 2002).

Los cultivares reproducidos mediante esqueje pueden ser diploides o tetraploides; sin embargo, la mayoría de los cultivares comercializados son

tetraploides y la mejora de plantas se está centrando en ellos (Craig, 1993). Los métodos de producción más utilizados son: la producción de plantas directamente a partir de esquejes de cultivares conocidos enraizados o no, comprados a propagadores especializados y el cultivo de esquejes de plantas sanas que se utilizan como plantas madre y de las cuales se toman esquejes para la producción (Kesser, 1998). Los esquejes utilizados para la producción son preferentemente esquejes de yemas apicales con al menos tres nodos ya que la planta final se obtiene dos semanas antes que si los esquejes son de yemas laterales (Ogleeve, 1998). Hay ciertas variedades de geranio que requieren de un pinzado, que puede ser manual o químico, para una formación más ramificada de la planta. En ambos casos se debe realizar cuando la planta no esté muy desarrollada (Calvo Vergés, 2001). La mayoría de las variedades de geranio enraízan fácilmente cuando se multiplican mediante esqueje. Para aumentar el porcentaje de enraizamiento la base de los esquejes se impregna con hormonas en forma de polvo (1-naftalenacetamida, 2-metil-1- naftalenacetamida, ácido 2-metil-1-naphthaleneacetico, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético) (Abo El-Nil, 1990). Durante el período de enraizamiento la temperatura óptima es de 20°C a nivel radicular. De esta forma se consigue un perfecto enraizamiento en 20-25 días. Una vez enraizados se puede disminuir la temperatura gradualmente.

La multiplicación se puede realizar casi en cualquier época del año, ya que agarran con facilidad, aunque la mejor época es el otoño (Alonso, 2002).

La propagación mediante semillas se utiliza para algunos geranios zonales diploides mejorados para este propósito. Su cultivo es más sencillo y crecen más vigorosamente que las variedades multiplicadas por esqueje ya que poseen vigor híbrido y están relativamente libres de enfermedades gracias al método de propagación. Sin embargo, las variedades que se reproducen por semilla carecen de características muy apreciadas en los geranios tetraploides que suelen tener flor doble e inflorescencias y hojas más grandes. Por otra parte necesitan un ciclo de desarrollo más largo ya que florecen aproximadamente cuatro meses después de su siembra (Abo El-Nil, 1990). Las semillas que proceden de casas comerciales están limpias, cubiertas mediante un producto fungicida y escarificadas (normalmente con un ácido) para asegurar una rápida germinación. El porcentaje de germinación del geranio suele ser de un 80% para la mayoría de los cultivares pero puede llegar a ser del 90-95% si se dan las condiciones adecuadas aunque los lotes de semillas pueden diferir en el porcentaje de germinación. La temperatura óptima de germinación es entre 22 y 25°C. (Armitage y Kaczperski, 1992).

Existe una patente sobre una nueva forma de propagación: el uso de semillas artificiales. Consiste en el uso de embriones somáticos deshidratados o bien encapsulados en gel hidratado. Esta técnica permite unir las ventajas de la multiplicación vegetativa con las de la propagación mediante semillas. Se pueden multiplicar genotipos tetraploides, que perderían sus características de interés al ser multiplicados mediante semillas, sembrando los embriones somáticos encapsulados o deshidratados de la misma forma que las semillas. Los embriones somáticos encapsulados en gel hidratado, necesitan almacenarse en condiciones de refrigeración

especiales y su vida está restringida a unos pocos meses. En cambio, los embriones somáticos desecados se adaptan mejor a condiciones de almacenamiento a largo plazo y son más fáciles de manejar, de transportar y de sembrar con equipos automatizados (Marsolais *et al.*, 1991).

2.2.2.2. Condiciones de cultivo

Las plantas de geranios no tienen una vida mayor de los cuatro años (Alonso, 2002).

La luz es un factor clave para el desarrollo y calidad del geranio. Podemos considerarla una planta de día neutro, es decir, la duración del fotoperiodo no tiene consecuencias directas en el proceso de floración. Por otro lado, lo que sí influye en la floración, es la intensidad de luz. El geranio puede trabajar perfectamente con grandes cantidades de luz. A pesar de que el abanico idóneo de trabajo iría de los 35.000 hasta los 45.000 Lux, es capaz de asumir hasta 60.000 Lux. A partir de estos 60.000 Lux sería aconsejable sombrear la planta. La intensidad de luz tiene una gran importancia en el comportamiento vegetativo de la planta tanto por exceso como por defecto. La carencia de luz da como consecuencia una planta débil y con una escasa floración, así como también disminuirá la intensidad de color tanto de hoja como de flor. Por el contrario, observamos que grandes cantidades de luz resultan en una disminución del pedúnculo y del pecíolo. Además, también se obtendrán hojas más pequeñas y un brote más pequeño y menos florecido. La temperatura es el segundo aspecto clave para un buen desarrollo del geranio (Alonso, 2002).

En la producción de la planta, es esencial controlar la temperatura durante todo el periodo de producción, puesto que grandes oscilaciones entre las temperaturas de día y noche disminuirán la calidad del producto. Se ha observado que la temperatura óptima se comprende entre los 16 y los 24°C. Si la planta se expone a temperaturas inferiores a 12°C, el crecimiento vegetativo queda parado. Por otro lado, la velocidad de desarrollo del geranio también disminuye a medida que la temperatura aumenta por encima de 28°C. Así pues, aumentar la temperatura no acelera la floración del geranio, más bien atrasa el crecimiento. Las mejores ratios de crecimiento se dan cuando la oscilación de temperatura entre día y noche es mínima, obteniendo los mejores resultados cuando la temperatura de día es, incluso, ligeramente más fresca que por la noche.

La humedad relativa óptima para el geranio la encontramos entre el 60 y el 80%, evitando pues valores más altos, puesto que aumentaría el riesgo de enfermedades (Alonso, 2002).

A pesar de que el geranio tolera mejor la carencia de agua que el exceso de hidratación, no proporcionarle una buena hidratación dará como resultado una planta pequeña y más susceptible a plagas y enfermedades. Así pues, la dosis de agua tiene que ser la adecuada. Por otro lado, aportar agua en defecto o en exceso nos podría ayudar puntualmente a regular el crecimiento de la planta.

En cuanto al método de riego, se aconseja regar mediante gotero y evitar siempre el riego por aspersión o por encima la planta, puesto que esto ayudaría a la posible propagación de enfermedades (Alonso, 2002).

2.2.2.3. Fertilización

La fertirrigación se considera la mejor opción para aportar los nutrientes necesarios a la planta, que es esencial para su buen desarrollo y rendimiento. Niveles insuficientes en uno o más elementos pueden limitar el rendimiento o el potencial del geranio. Por otro lado, un exceso de abono puede llevar a la fitotoxicidad de la planta. Así pues, debemos trabajar con una solución nutritiva u otra en función de las sales que ya contenga el agua de riego. Se estima que entre 0,7 a 1,2 g/L deben ser aportados en el riego. Los niveles de abono a aportar son los siguientes: 150-200 ppm N; 120-200 ppm K₂O y 50-70 ppm MgO, a un pH de 5,8-6,2. La formulación de la solución nutritiva debe tener un buen balance entre los macroelementos y oligoelementos (Alonso, 2002).

2.2.2.4. Importancia y tendencia del cultivo del geranio

El geranio es una de las plantas de jardín más importantes en los mercados nacional y europeo. En el conjunto de la Comunidad Europea se producen unos 600 millones de plantas anuales, siendo Alemania y Francia los más importantes países consumidores, con un volumen de ventas de 250 y 200 millones de plantas respectivamente (Llauradó y Estopá, 2003).

En España se consumen anualmente unos 15 millones de plantas lo que supone un volumen de negocio de 18 millones de euros. El 60 % de las ventas corresponde al geranio de tipo zonal o zonale (*Pelargonium x hortorum*), el 35% corresponde al geranio del tipo hiedra o peltatum (*Pelargonium x hederæfolia*) y el 5 % restante corresponde al geranio de pensamiento o grandiflorum (*Pelargonium x grandiflorum*) (Llauradó y Estopá, 2003).

2.2.3. Ciclamen

2.2.3.1. Multiplicación

En la actualidad la reproducción del ciclamen se realiza principalmente por semilla. La propagación por partida de bulbos resulta demasiado laboriosa y poco práctica, y sólo se efectúa con el propósito de mantener clones específicos con fines de mejoramiento (Espinosa y Rodríguez, 2006).

La propagación vegetativa en ciclamen es muy compleja. En el caso de *Cyclamen persicum* se ha detectado que algunos brotes florales pueden desarrollarse en los lados del cormo, inclusive se desarrollan raíces y hojas, sin embargo este proceso es muy lento. La inducción de un proceso acelerado de estos brotes permitiría

una propagación vegetativa con bastante potencial. Es importante mencionar que los cotiledones cortados de los cormos enraízan bien, pero las hojas verdaderas no. La división del cormo es un método más complicado y con más riesgos en cuanto a incidencia de enfermedades se refiere, así como también presenta un alto riesgo de perder la planta madre (Espinosa y Rodríguez, 2006).

La principal forma de propagación del ciclamen es por semilla, que se obtiene generalmente por polinización cruzada. Cuando el fruto se encuentra suave al tacto y de color café la semilla debe presentar una coloración café brillante. Ése es el momento recomendable para cosechar. La semilla se cubre con sustrato con pH próximo a 6. Se recomienda aportar un abono completo con microelementos y fertirrigar con pequeñas concentraciones de nutrientes. Se recomienda cubrir la bandeja con un plástico transparente que garantizará una buena temperatura y evitará que la tierra se seque. El tiempo de germinación es de cuatro semanas. La aparición de las primeras hojas se produce entre los 80 y 90 días de la siembra (Espinosa y Rodríguez, 2006).

2.2.3.2. Condiciones de cultivo

Aunque ciclamen se trata de una planta anual, puede durar años. Criar un ciclamen no es tarea fácil, pero sobre todo es difícil hacerlo reflorece, aunque esta planta puede vivir y florecer a lo largo de unos 4-5 años y cada año que pasa producirá mayor cantidad de flores (Espinosa y Rodríguez, 2006).

El rango de temperaturas puede variar en función del estado fisiológico en el cual se encuentre la planta. La temperatura óptima para la germinación de la semilla de ciclamen es de 15°C. Se recomienda evitar temperaturas por arriba de 23°C, ya que tienden a inhibir la germinación y provocan que la plántula tenga un crecimiento desigual. Después de la germinación de la semilla, la temperatura óptima para el crecimiento de ciclamen es de 18 a 20°C, aunque en el verano puede soportar hasta 30°C, siempre y cuando se cuente con un buen sistema de riego; mientras que en invierno toleran hasta 13°C si la humedad es baja (Espinosa y Rodríguez, 2006).

Necesita mucha iluminación y una buena ventilación todo el año, pero protegido de las corrientes. El nivel de luz que satisface al ciclamen en la etapa de crecimiento es de 40 mil luxes. Para proveerle este nivel de luz se les debe colocar sombra de abril a octubre (Espinosa y Rodríguez, 2006).

Antes de la siembra se recomienda remojar las semillas en agua (a 24°C) durante toda una noche, después debe conservarse húmedo el sustrato. Se sugiere una humedad relativa de 80 a 90%. Hay que llevar mucho cuidado con excederse con el agua ya que podría provocarse la podredumbre del tubérculo (Espinosa y Rodríguez, 2006).

El pH ideal es de 5.6 a 5.8. Debido a que éste no es estable durante el crecimiento de ciclamen es necesario monitorearlo periódicamente.

Para el crecimiento de la planta, el ciclamen prefiere un sustrato que siempre este húmedo, pero que también drene bien, con la mejor aireación u oxigenación posible y buena conductividad de calor, de lo contrario se produce un crecimiento débil y se promueve la presencia de enfermedades. Se debe evitar que el sustrato quede seco, pues se provocaría marchitamiento severo, amarillamiento de hojas y aborto de botones florales (Espinosa y Rodríguez, 2006).

2.2.3.3. Fertilización

Las aportaciones de elementos nutritivos a ciclamen se cifran en miligramos por planta. Según estos autores se cifran en: 613 mg/planta para el nitrógeno, 169 g/planta para el pentóxido de fósforo y 1.190 mg/planta para el óxido de potasio (cantidades aproximadas para 12 ó 13 meses de cultivo).

Con frecuencia, un exceso de nitrógeno provoca un importante desarrollo foliar. Para los ciclámenes miniaturas cultivados en siete u ocho meses los requerimientos de nitrógeno oscilan entre 200 y 300 miligramos por planta (Espinosa y Rodríguez, 2006).

2.2.3.4. Importancia y tendencia del cultivo de ciclamen

El uso tradicional de ciclamen en Europa varía de un país a otro. Una tendencia importante que se viene presentando en el noroeste de Europa es el empleo del ciclamen en exteriores. Para muchos países de Europa del Sur se trata de algo normal pero en Alemania y los Países Bajos dicha tendencia está ofreciendo grandes oportunidades a productores, distribuidores y consumidores (Espinosa y Rodríguez, 2006).

El ciclamen muestra su belleza y pureza estando solo o en combinación con otras plantas. Con un mínimo esfuerzo y gracias a las bondades del ciclamen es posible producir plantas de un color intenso. Las variedades más cercanas a los tipos botánicos, como *Cyclamen hederifolium*, vienen teniendo una mayor atención por parte de los consumidores.

El número de productores está disminuyendo y el tamaño medio de sus explotaciones es cada vez mayor. Casi el 100% de los grandes productores siembran ciclamen por contrato. Realizan acuerdos por números, precios y formas del producto. Estos contratos necesitan de variedades "programables" y los productores hacen lo que el comerciante espera que hagan, es decir, flores a tiempo para los grandes pedidos. Los productores más pequeños venden directamente al consumidor, lo que les permite obtener unos mejores precios (Espinosa y Rodríguez, 2006).

2.2.4. Lantana

2.2.4.1. Multiplicación

Lantana se puede multiplicar por semillas (plantadas entre 16-18°C) o por esquejes leñosos obtenidos a finales de verano y después de la floración. Es necesario proteger los esquejes en un invernadero templado con elevada humedad ambiental (Johnson, 2005).

2.2.4.2. Condiciones de cultivo

Viven varios años en regiones subtropicales, pero en zonas templadas se la cultiva como planta anual (Johnson, 2005).

Lantana camara crece bien en zonas cálidas, templadas, subtropicales y tropicales (Swarbrick *et al.* 1998). Por debajo de 5°C no se produce crecimiento y la planta es sensible a las heladas (Thaman, 1974; Stirton, 1977; Winder, 1980, Swarbrick *et al.*, 1998), si éstas son severas puede llegar a matar las hojas y los tallos (Van Oosterhout, 2004). Stirton (1977) observó que la planta resistía una temperatura media anual por debajo de 12,5°C en el sur de África, mientras que Graaff (1987) registró que algunas variedades podían soportar heladas leves, siempre y cuando éstas fueran poco frecuentes. El límite superior de temperatura para el crecimiento de *L. camara* no se ha investigado.

Lantana camara crece mejor en condiciones de humedad constante, especialmente en áreas que reciben más de 900 mm de lluvia (Swarbrick *et al.*, 1998; Ensbey, 2003). Además, *L. camara* puede tolerar los climas secos (Parsons y Cuthbertson, 2001), aunque la floración ocurre generalmente en condiciones de alta humedad del suelo y del aire (Swarbrick *et al.*, 1998).

La planta necesita mucha iluminación. Si la situamos a pleno sol la floración será mayor.

En cuanto al sustrato lo ideal sería una mezcla de 60% de akadama y 40% de arena o greda volcánica. Se puede utilizar como mezcla alternativa 40% de turba, 10% de mantillo y 50% de arena (en este caso evitaremos el riego demasiado frecuente). En macetas, una combinación de turba y arena a partes iguales le irá perfectamente (Johnson, 2005).

2.2.4.3. Fertilización

Los arbusto durante el período de primavera, desarrollan nuevos brotes y preparan las flores, recordamos entonces de dar, ya desde el invierno, una buena dosis de humus o de estiércol maduro, o añadir abono granular de lenta liberación al

terreno a la base de las plantas. Durante la primavera podemos escoger un abono rico en azufre o potasio, de mezclar al agua del riego cada 20-25 días (Johnson, 2005).

2.2.4.4. Importancia y tendencia del cultivo de lantana

Lantana camara es considerada como una de las 75 especies alóctanas consideradas como invasoras en España. Es considerada como una especie de reciente introducción que, si bien aún no está generando una interferencia directa con las comunidades nativas de espacios naturales (se encuentra colonizando biótopos ruderales y aparece de modo casual), presentan un fuerte comportamiento invasor en numerosas regiones del Globo en cuyos ecosistemas están produciendo importantes problemas de conservación (Sanz-Elorza *et al.*, 2001). La amenaza que representan resulta, por el momento, potencial. En casos como éstos en los que existe un claro historial de invasiones previas, debería procederse a la prohibición de su uso dentro del territorio español, o, al menos, en zonas consideradas como de riesgo (lo que exigiría un análisis previo).

2.2.5. MadreSelva

2.2.5.1. Multiplicación

La planta puede durar varios años. Estas plantas crecen lentamente durante los 2 primeros años, pero después puede extender sus vástagos 1,5 m / año (Nuzzo, 2003). *Lonicera japonica* comienza dando sus frutos a pleno sol, a los 3 años y no es hasta los 5 años cuando los da a la sombra. El máximo de producción de frutos se alcanza entre los de 4 y los 6 años (Munger, 2002).

L. japonica se puede cultivar a partir de esquejes, por acodo aéreo, y semillas (Dehgan, 1998).

Las Madreselvas se propagan fácilmente por estacas de madera dura en primavera o por estacas de madera suave con hojas en verano, bajo vidrio o plástico. Para un mayor enraizamiento es recomendable, una vez cortado el esqueje cubrir su base con hormonas.

Generalmente, para que las semillas germinen rápidamente se recomienda una estratificación de las mismas durante 2 o 3 meses a más o menos 4°C.

2.2.5.2. Condiciones de cultivo

Madreselva requiere de posiciones semisombrías o umbrías acompañada de humedad. Según un estudio realizado por Leatherman (1955) crece hasta los 1.800 m sobre el nivel del mar en América del Norte. El crecimiento está limitado: en el norte del país por la muerte de los brotes debido a las heladas, en las partes occidentales debido a las precipitaciones y en el sur, posiblemente, por la ausencia de temperaturas suficientemente frías para romper la latencia de semillas (Peter, 1998).

L. japonica crece en una amplia variedad de sustratos que van desde un pH de 4,0 a uno de 7,9 y se propaga más rápidamente en suelos de pH por encima de 6,0. Crece mejor en suelos calcáreos, húmedos y bien drenados (Leatherman, 1955). Además *Lonicera japonica* es uno de las pocas especies tolerantes a la contaminación causada por metales pesados y dióxido de azufre (Caiazza y Quinn, 1980).

2.2.5.3. Fertilización

Para obtener una buena floración, es muy aconsejable aplicar fertilizante rico en fósforo y potasio, una vez en primavera y otra al final del verano. Si, por el contrario, queremos que crezca muy rápido, se puede acudir a los abonos nitrogenados (Dyess y otros, 1994).

2.2.4.4. Importancia y tendencia del cultivo de madreSelva

En España, se cultiva profusamente, a veces de modo reiterado y abusivo, para formar setos y cubrir muros y vallas en casi todas las provincias. A menudo se asilvestra, naturalizándose en ambientes riparios, orlas forestales, matorrales aclarados y lugares alterados, sobre todo en el norte de Cataluña y en el País Vasco, y en menor medida en el resto de la Península, Baleares y Canarias (Acebes, 2001).

Se ha señalado como especie alóctona invasora en América del Norte (Canadá, Estados Unidos), Puerto Rico, América del Sur (Argentina, Brasil), Australia, Nueva Zelanda, Hawaii, las islas del Pacífico, el norte de África (Argelia) y Europa (Gran Bretaña, Alemania, Suiza, Francia, Italia, Portugal, Córcega, Malta, Chipre). En España se ha naturalizado, en ocasiones con carácter invasor, en ambientes de ribera degradados, orlas y márgenes de bosques caducifolios antropizados, comunidades ruderales sobre suelo húmedo, etc., encontrándose en vías de expansión (Acebes, 2001).

Como medida preventiva, debería reducirse el empleo de esta especie en jardinería, de la cual se abusa, y emplear otras lianas ornamentales autóctonas o sin comportamiento invasor. En los casos de invasiones ya producidas, los métodos manuales de control se encuentran algo limitados, debido a la dificultad de trabajar en riberas fluviales y a la gran densidad de biomasa de la especie, que hace probable que, pese a todo, quede en el medio natural algún tallo que pueda reiniciar la invasión. Los herbicidas parecen el método de control más eficaz, pero una vez más hay que desaconsejarlos por su peligrosidad para el medio ambiente, salvo en casos extremos (Acebes, 2001).

2.3. Importancia económica de la comercialización de plantas ornamentales de maceta para la Región de Murcia

La producción mundial de planta y flor se ha ido extendiendo en los últimos años, con numerosos centros productivos localizados en países en desarrollo, que abastecen de una forma regular a los grandes consumidores.

En general, el comercio internacional ornamental sigue unos ejes Norte-Sur definidos, con pocas conexiones transversales. Colombia y Ecuador tienen su principal mercado en los EEUU, Kenia en Europa y los países del sudeste de Asia en Japón (COAG, 2009).

Los principales países productores, medidos en superficie productiva, son actualmente China (con 40.000 ha en flor cortada y 60.000 ha en planta en maceta) y la India (con 100.000 ha, tanto de flor como de planta). En cuanto al valor de la producción, los principales países son los Países Bajos, Italia, Japón y los EE.UU. La producción europea continúa siendo la primera del mundo en valor, con 10.228 millones de euros y suponiendo el 42% de la producción mundial. Por otra parte, cabe destacar Colombia, Ecuador y Kenia, que se caracterizan porque sus mercados se orientan casi exclusivamente a la exportación (COAG, 2009).

En el mundo existen tres grandes centros de consumo: Japón, los Estados Unidos y Europa Occidental, que absorben el 75% de la producción mundial de ornamentales, con un valor de 80.000 millones de euros. Unos 36.000 millones de euros corresponden a Europa, siendo Alemania, Francia y el Reino Unido quienes suman el 50% de gasto en ornamentales europeo. En Francia y el Reino Unido el consumo de flor cortada es superior al de planta, al contrario de lo que ocurre en Alemania (COAG, 2009).

La evolución de los mercados de ornamentales es muy diferente en ambas mitades del continente europeo. Europa Occidental es un mercado ya maduro, con posibilidades de crecimiento de consumo relativamente limitadas, aunque no ausentes. Sin embargo, en Europa Oriental, el crecimiento de los últimos años ha sido espectacular, aunque partiendo de niveles iniciales muy bajos. En el futuro, la crisis global puede paralizar de manera notable el consumo de ornamentales.

Según un estudio publicado por Rabobank (2008), el futuro del sector productor/comercializador deberá sufrir una intensa reestructuración, disminuyendo el número de empresas y consolidándose las restantes en mayor tamaño, para competir en mercados con precios sensiblemente menores. Se deben superar los costes frente a la continua caída de los precios, mediante el reparto de los costes fijos sobre un mayor número de unidades de productores.

En España, según los datos de la encuesta sobre superficies del Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino del año 2008 la superficie dedicada a cultivos ornamentales fue de 3.239 ha, lo que supone una reducción del 16% con respecto al año anterior. El valor de la producción nacional en origen se estima en unos 930

millones de euros, crea empleo tanto de manera directa como indirecta para unas 50.000 personas y supone un 4,3% de la producción vegetal final (COAG, 2009).

El 53% de la superficie dedicada a ornamentales en nuestro país se dedica a la planta, mientras que un 45% a flor y un 1,6% a esquejes. Dentro de la flor el 42% de superficie está dedicada al clavel, el 15% a rosas y el 43% restante a otras flores (COAG, 2009).

El sub-sector de la planta ornamental se encuentra mejor posicionado con respecto al de la flor, puesto que existe una menor competencia de países terceros y las principales zonas productoras españolas cuentan con ventajas comparativas importantes, como son las buenas condiciones climáticas y la buena relación calidad/precio.

El sector de la flor y la planta ornamental se encuentra presente en la mayoría de las CC.AA. destacando Andalucía y la región de Murcia (26% de la superficie total nacional cada una), Comunidad Valenciana (20%), Cataluña y Canarias (con un 10% cada una) y Galicia (con un 7%) (COAG, 2009).

En relación con el consumo, la crisis ha paralizado el consumo de flor y planta ornamental en nuestro país, el cual era ya de por sí bajo si comparamos con la inmensa mayoría de los países europeos. El consumo de ornamentales en España sólo supera a Grecia y Portugal a nivel europeo. Las últimas cifras disponibles del 2006 indican un consumo per cápita de unos 34 euros (22 euros en flor cortada y 12 euros en plantas), mientras que en Suiza se sitúa en 125 euros y en Noruega en 124 (COAG, 2009).

Andalucía, principal región a nivel estatal tanto de flor cortada como de planta ornamental, ha experimentado una regresión importante. Comparando 2008 con la media de los años 2003 al 2006, la superficie de flor ha descendido un 44% mientras que la de planta un 20%. Las causas principales que motivan este descenso son la bajada del consumo y la caída de precios provocada por la competencia de países africanos como Egipto o Kenia. Las perspectivas de futuro siguen siendo a la baja. Por especies, el 65% de la superficie cultivada está representada por los cultivos de clavel monoflor y el miniclavel, y en menor medida se producen crisantemos (7,5%), *Lilium* (7%), *Gypsophilla* (2,5%), gladiolos (2%) y rosas (2%) (COAG, 2009).

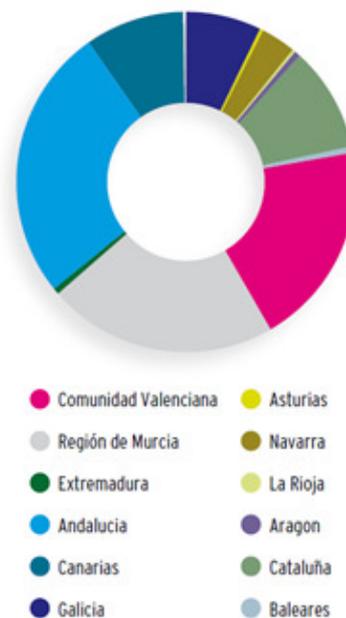


Figura 2.9. Distribución de la superficie de ornamentales por CC.AA. (2008).
Fuente: C.O.A.G (2009).

Las últimas estadísticas de ornamentales de Cataluña señalan que se dedican unas 325 ha en esta comunidad, de las cuales un 65% se dedican a planta y el 35% restante a flor. El 15% de la flor cortada corresponde a las rosa y un 13% al clavel (COAG, 2009).

En la Comunidad Valenciana, el 87% de la superficie dedicada a ornamentales está cultivada con planta ornamental, mientras que el 13% restante con flor cortada. El principal producto de esta comunidad es la planta mediterránea la cual está muy bien considerada en los mercados internacionales. Se exporta principalmente a Francia, Italia, Países Bajos y Portugal.

En Canarias el cultivo de ornamentales ocupa en la actualidad unas 733 ha, de las cuales 344 ha se dedican a flor cortada y 389 ha a planta ornamental. En esta comunidad la producción de flor se ha mantenido más o menos estable en los últimos 4 años, mientras que la producción de planta ha ido decayendo.

Galicia sobresale por su producción de planta ornamental, destacando la producción de camelia (2,5 millones de unidades) que convierte a esta región en una de las mayores productoras de camelia a nivel mundial. Otras producciones relevantes son las abelia, las tuyas, todo tipo de coníferas ornamentales, boj, rododendros, azaleas, bambú, hortensias, acebos, arces y plantas de temporada. La mayoría de la producción se destina al mercado nacional, aunque cada vez está cogiendo más peso el mercado europeo, Francia, Portugal, Reino Unido, Alemania y Holanda (COAG, 2009).

En Murcia predomina el cultivo del clavel (117 ha), seguido en importancia por el cultivo de la rosa (36 ha), alcanzando conjuntamente el 55% de la superficie total dedicada a este grupo de cultivos. La oferta floral se completa con otras especies, entre las que destacan el gladiolo, crisantemo, gerbera, lilio e iris. La planta ornamental supone unas 190 ha de plantas.

3. BOTRYTIS BLIGHT EN LOS CULTIVOS DE PLANTAS ORNAMENTALES

CAPÍTULO 3. BOTRYTIS BLIGHT EN LOS CULTIVOS DE PLANTAS ORNAMENTALES

3.1. Descripción del hongo *Botrytis cinerea*

El género *Botrytis* constituye un grupo de hongos fitopatógenos ampliamente conocidos, en el que podemos encontrar especies que parasitan a una sola especie vegetal, como *B. tulipae*, *B. squamosa* o *B. fabae*, patógenos de tulipán, cebolla y haba respectivamente, y una especie, denominada *B. cinerea*, capaz de infectar al menos 235 especies de plantas distintas (Elad, 1997), causando la enfermedad conocida como “Podredumbre Gris” o “*Botrytis*”. Entre los hospedadores de *B. cinerea* se incluyen una enorme variedad de plantas ornamentales (rosas, geranios, hortensias, claveles, etc.), plantas frutales (vid, fresa, kiwi, etc.) y verduras y hortalizas (tomate, lechuga, pimiento, alcachofa, calabaza, etc.).

En cada uno de los cultivos y bajo condiciones de humedad relativa alta, la podredumbre gris puede afectar a frutos, flores, tallos, plántulas, hojas, bulbos, raíces y semillas. Además, el ataque no sólo se produce sobre cultivos en el campo o en invernaderos, donde el hongo destruye rápidamente los tejidos y coloniza la planta, sino que también provoca enfermedades post-cosecha, comenzando con una infección latente en el cultivo y desarrollándose posteriormente durante la recolección, transporte y almacenamiento (Coley-Smith *et al.*, 1980).

El gran número de hospedadores, la gran distribución y la importancia de los daños que ocasiona *B. cinerea*, justifican el enorme interés que despierta este patógeno, siendo, desde hace más de 175 años, objeto de numerosos estudios relacionados con su fisiología, bioquímica, patogenicidad y control de la enfermedad.

3.1.1. Etimología y clasificación taxonómica

La etimología del género *Botrytis* deriva del Griego *botrys*, que significa “grupos de uvas”, por la organización de sus conidios en forma de racimos, mientras el nombre de la especie deriva del latín *cinereus-a-um* (de color grisáceo o ceniza), aludiendo al color grisáceo de las esporas acumuladas en el tejido vegetal infectado (Agris, 1997).

El nombre *B. cinerea* aparece por primera vez mencionado por von Haller (1771), en su “*Synopsis Methodica Fungorum*”. En 1866, de Bary descubre la conexión genética entre este patógeno y *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (Rosslénbroich y Stuebler, 2000). Posteriormente este último fue identificado como el estado perfecto o sexual (teleomorfo) del patógeno, sin embargo ocurre raramente en la naturaleza (Faretra *et al.*, 1988) por lo que el nombre del estado imperfecto o asexual (anamorfo): *B. cinerea*, es comúnmente preferido para referirse a este hongo (ten Have, 2000). En la Tabla 3.1, se muestra la clasificación taxonómica de ambos estados del patógeno.

Tabla 3.1: Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea* y *Botryotinia fuckeliana*.

	Estado asexual	Estado sexual
Reino	Fungi	Fungi
División	Deuteromycota	Ascomycota
Clase	Hyphomycetes	Discomycetes
Orden	Moniliales	Helotiales
Familia	Moniliaceae	Sclerotiniaceae
Género	Botrytis	Botryotinia
Especie	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

Fuente: Adaptado de ten Have (2000). Fuente: Carbu (2006).

En 1973 el género *Botrytis* fue redefinido por Hennebert, quien incluyó en el género hasta 22 especies, especificando el nombre del género y especie para el estado perfecto e imperfecto.

Hoy día, ha aumentado hasta 26 el número de especies que se reconocen como pertenecientes al género *Botrytis*, aunque tan sólo en 18 de ellas es conocido el estado anamorfo y teleomorfo (Beever y Weeds, 2004).

3.1.2. Características morfológicas

3.1.2.1. Micelio

El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos (Fig.3.1), que se multiplican vegetativamente mediante división citoplasmática, siendo común que tenga lugar una división nuclear sin que se haya producido división citoplasmática, lo que da lugar a hifas cenocíticas con un elevado y variable número de núcleos. Características morfológicas como son la coloración y el diámetro de las hifas, son muy variables, dependiendo en gran medida de las condiciones de desarrollo del micelio (Moshin, 1990).

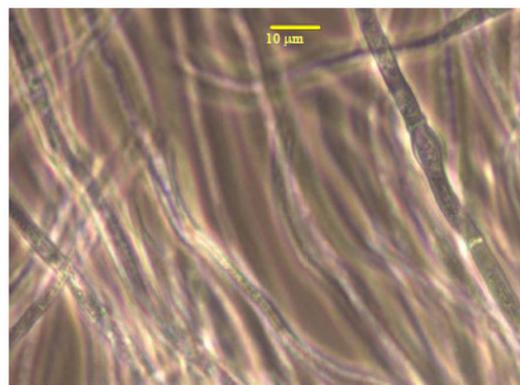


Figura 3.1. Micelio de *B. cinerea* al microscopio óptico (40X)

Fuente: Carbu (2006).

El micelio cumple una doble función: i) como estructura de propagación de la enfermedad, causada ésta por la dispersión de restos vegetales (tallos y hojas) infectados por el micelio y, ii) como estructura de resistencia.

A partir del micelio, generalmente envejecido, se originan diversas estructuras, como son los macroconidióforos, los microconidióforos y los esclerocios, cuya finalidad es la propagación y supervivencia ante condiciones adversas.

3.1.2.2. Conidióforos o macroconidióforos

Los conidióforos o macroconidióforos se originan principalmente de la masa hifal, aunque también pueden hacerlo a partir de los esclerocios.

Su estructura consta de un microfilamento más o menos recto, que se ramifica en la zona apical de forma alterna; las ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias (Fig. 3.2.A). Las distintas ramificaciones poseen en su zona terminal, un engrosamiento o vesícula globosa y sobre la superficie de ésta, se disponen los conidios o macroconidios (Fig. 3.2.B), los cuales están separados del conidióforo por un septo transversal, de manera que al separarse de éste se queda una herida en la región de unión. Los conidios se forman a partir de la gemación de células formadoras de conidios, las cuales se sitúan en las vesículas globosas.

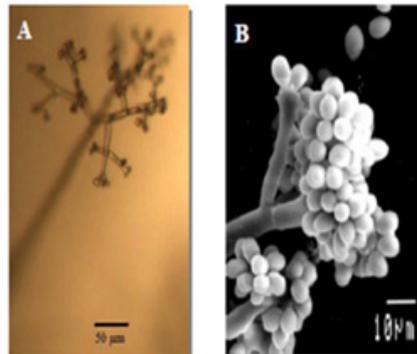


Figura 3.2. Estructura del macroconidióforo de *B. cinerea* al:

A: Microscopio óptico (4X)
B: Microscopio eléctrico

Fuente: Carbu (2006).

Para que la esporulación o formación de los conidios pueda tener lugar son necesarias unas determinadas condiciones de luz y humedad. La proliferación de un gran número de estos conidióforos sobre la superficie vegetal, da lugar a una coloración blanquecina, parda o grisácea, a la que hay que atribuir la denominación común de la enfermedad producida por el hongo, “*Podredumbre Gris*”.

3.1.2.3. Conidios o macroconidios

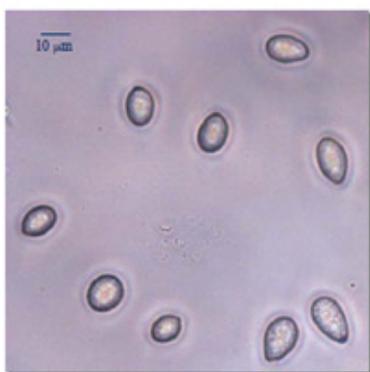


Figura 3.3. Conidios de *B. cinerea* al microscopio óptico (40X)

Fuente: Carbu (2006).

Los conidios o macroconidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo así como, una de las estructuras de resistencia que presenta *B. cinerea*. Son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo (Elad *et al.*, 2004). En condiciones naturales, la viabilidad de los conidios depende de las condiciones ambientales (temperaturas extremas, humedad, exposición a la luz solar).

Son estructuras ovaladas, globosas o elípticas (Fig. 3.3), separadas del pedicelo por un septo transversal y sus dimensiones oscilan entre 6-8,4 µm de sección transversal y los 8,8-11 µm de longitudinal.

El estudio al microscopio, tanto óptico como electrónico, realizados por distintos autores ha permitido conocer la estructura interna de los conidios (Coley-Smith *et al.*, 1980), destacando:

a) Una **superficie externa** que presenta, al microscopio óptico, un aspecto liso e irregular, gruesa y con un pequeño cuello cuando se observa al microscopio electrónico. Esta envoltura está compuesta por grupos aminos, carboxilos y lipídicos.

b) La siguiente envuelta es la **pared celular**, que consiste en un armazón de microfibrillas de quitina y β -1,3-glucano ordenadas al azar (El Ghaouth *et al.*, 1997). La quitina está unida a glicoproteínas, lo que le da la forma, rigidez y resistencia física a la pared. La capa más externa de la pared celular presenta coloración, lo que puede ser debido a la presencia de melanina, pigmento capaz de proteger a los conidios de la acción enzimática, de la desecación y servirle como defensa frente a las toxinas secretadas por las plantas (Doss *et al.*, 2003).

c) Como última envoltura, una **membrana plasmática** con su habitual composición lípido-proteica. Se caracteriza por la presencia de dos superficies, una próxima a la pared celular y la otra hacia el citoplasma, en las cuales aparecen unas proyecciones verrugosas de función desconocida.

d) En el **citoplasma** se encuentran los distintos orgánulos celulares, mitocondrias, pequeñas vacuolas, numerosos cuerpos de reserva (Buckley *et al.*, 1966), el retículo endoplasmático y numerosos ribosomas. También se aprecian en él, cuerpos lipídicos que se encuentran en el margen celular y otros cuerpos multivesiculares, los cuales pueden estar implicados en la formación de la pared celular o en la secreción de enzimas extracelulares.

e) Un número variable y elevado de **núcleos**, oscilando entre los 5 y 11 observados por Vallejo *et al.* (2003), los 3 y 18 encontrados por Hansen y Smith (1932), ó 1 y 10 según Shirane *et al.* (1988). Cada núcleo presenta sólo una región organizadora nucleolar (NOR) (Taga & Murata, 1994).

3.1.2.4. Microconidióforos y microconidios

Los microconidióforos son estructuras caracterizadas por la formación de una pequeña vesícula de la que surgen uno o más esterigmas a modo de botella de base ancha llamados fiálides, en cuyo extremo se forman los microconidios (Fig. 3.4). Esta morfología básica puede presentarse sola o agrupada dependiendo de la estructura inicial de partida sobre la que se origina. Pueden desarrollarse de forma exógena y endógena al propio hongo (Urbasch, 1985):

a) La forma exógena se puede originar partiendo de 5 estructuras distintas: una hifa primaria, una endohifa que emergen de una hifa primaria, de células de los macroconidióforos, de esclerocios germinados y desde el tubo germinativo de un conidio.

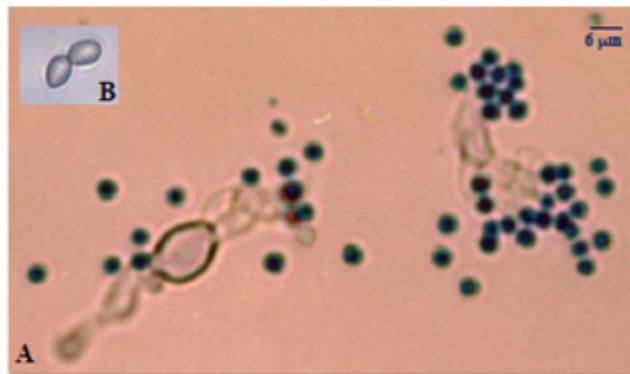


Figura 3.4. Estructuras al microscopio óptico (40X) de los microconidióforos con sus microconidios (A) teñidos con azul de bromofenol y (B) los conidios de *B. cinerea*.

Fuente: Carbu (2006).

b) La forma endógena se puede formar a partir de sólo 3 estructuras: sobre endohifas que surgen en el interior de una hifa primaria, en el interior de células de los macroconidióforos y sobre ascoporas que se encuentran en el interior de sus ascas.

Los microconidios son estructuras unicelulares de morfología esférica (Drayton, 1932), muy similares a la de los conidios, aunque de menor tamaño (Fig. 3.4), con un diámetro de 2-4 μm .

La función fundamental que se le atribuye a esta estructura es la de gameto masculino en el ciclo de vida sexual del hongo. Aunque también se le atribuye una función alternativa como estructura de resistencia, debido a su capacidad de permanecer viable en estado de dormancia bajo condiciones ambientales adversas (Urbasch, 1985).

3.1.2.5. Clamidosporas

Las clamidosporas son células de aspecto hialino con una alta variabilidad de forma y tamaño (Urbasch, 1983; 1986). Habitualmente aparecen en cultivos envejecidos, en zonas del cultivo que han sido contaminadas por otros microorganismos y en asociación con los esclerocios. Se forman a partir de la transformación de partes del micelio y son liberadas por la disgregación de las hifas.

Bajo condiciones húmedas y con escasez de nutrientes, las clamidosporas germinan dando lugar a microconidios, los cuales permanecen en estado de latencia. Si se adicionan nutrientes, son capaces de germinar originando hifas que pueden penetrar en el huésped o pueden esporular y formar conidios.

Por lo tanto, las clamidosporas pueden actuar como estructuras de resistencia permitiéndole al hongo superar periodos cortos bajo condiciones desfavorables sobre la planta.

3.1.2.6. Esclerocios

Los esclerocios son las principales estructuras de resistencia de *B. cinerea*. Son órganos pluricelulares, de morfología plano-convexa (Fig. 3.5A), cuyas dimensiones oscilan entre 1-5 mm de sección transversal y 1-15 mm de sección longitudinal, dependiendo de las condiciones de cultivo. Están compuestos por un 75% de carbohidratos, 10% de proteínas, 5% de glucosamina y 0.21 % de lípidos.

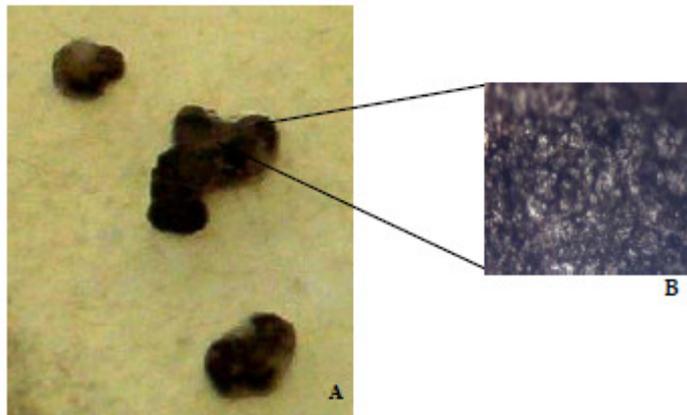


Figura 3.5. Esclerocios producidos sobre placa de cultivo envejecido (A) y vista al microscopio óptico (10X) de la superficie del mismo (B).

Su estructura se forma por el crecimiento de las hifas, las cuales van entrecruzando sus paredes a medida que se van dividiendo hasta que se fusionan unas con otras dando lugar a un tejido compacto de coloración oscura (Fig. 3.5B). La formación de los esclerocios está influenciada por múltiples factores como la temperatura, la luz, el pH y la composición del tejido sobre el que se desarrolla (López-Herrera *et al.*, 1986).

En el esclerocio maduro se distinguen tres capas:

- a) Un **córtex externo** formado por un conjunto de hifas empaquetadas, las cuales presentan gruesas paredes celulares que las hacen especialmente resistentes a la desecación (Fig. 3.5B). Esta capa presenta una coloración oscura debido a la acumulación de melanina en las paredes de las hifas más externas. Un estudio histoquímico de las células indican un contenido en quitina, β -1,3-glucanos y compuestos fenólicos.
- b) Un **córtex interno** constituido por un tejido donde la separación entre las hifas es indistinguible y en el que las células adoptan una morfología poliédrica debido a la presión que ejercen unas sobre otras, dando lugar a la desaparición de espacios intracelulares.
- c) Una **médula** compuesta por un tejido donde las hifas permanecen como filamentos individuales y cuyas células son largas, con paredes hialinas y gelatinosas, rodeadas por una matriz de β -glucanos. En su interior se encuentran proteínas, glicógeno, polifosfatos y lípidos que le sirven como sustancias de reserva.

La función más relevante que desempeñan los esclerocios es la de supervivencia del hongo, siendo su compacta morfología y la alta acumulación de sustancias nutritivas, las que le proporcionan las condiciones idóneas para soportar

temperaturas bajas en la estación invernal, para posteriormente, con la llegada de la primavera poder germinar dando lugar a un nuevo micelio (Grindle, 1979). También juegan un importante papel en el ciclo sexual del hongo, porque son ellos los que participan como gameto femenino, y a partir de los cuales se desarrollan los apotecios. Y además, poseen una enorme capacidad para producir conidióforos.

3.1.2.7. Apotecios

Los apotecios son cuerpos reproductivos que surgen, individualmente o en grupo, de los esclerocios que han sido fecundados (Fig. 3.6A). Su morfología consta de un pequeño tallo o **estípite** (de 2 a 20 mm de longitud y 0.5-1.5 mm de grosor) y una región ensanchada a modo de embudo denominada **himenio** o **tecio**. Los estípites están compuestos por hifas septadas, dispuestas longitudinalmente y paralelas entre sí. En el tecio o región fértil se encuentran las **ascas** dispuestas regularmente y en distintos estadios de desarrollo. Las ascas son hifas fértiles con forma cilíndrica y alargadas que contienen en su interior un total de ocho **ascosporas** (Fig. 3.6B). Además de las ascas se presentan unas hifas estériles ramificadas en la base del tecio llamadas **paráfisis**.

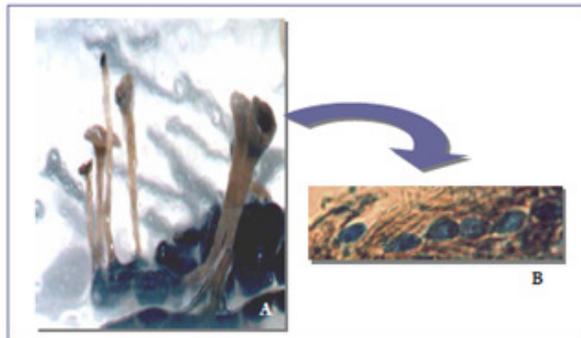


Figura 3.6. Apotecios de *B. fuckeliana* (A). (B) Fotografía al microscopio óptico de la sección del tecio y las ascosporas teñidas con azul de bromofenol.

Fuente: Carbu (2006).

3.2. Aspectos patológicos del hongo y de la enfermedad Botrytis blight

3.2.1. Sintomatología y diagnóstico

La enfermedad produce podredumbre blanda (podredumbre gris), marchitez súbita o lesiones pardas. El hongo infecta a las plantas casi exclusivamente a partir de tejidos colonizados muertos o senescentes o a través de heridas (Ávila, 1993).

Los síntomas provocados por este patógeno a nivel del suelo o por debajo, incluyen: pudrición en frutos y tubérculos, marchitez del tejido, pústulas y manchas foliares, caída de plántulas (Hausbeck y Moorman, 1996), chancros en los tallos, y tizones en inflorescencias (Hausbeck y Moorman, 1996; Kim y Cho, 1996).

Las esporas de *B. cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportadas grandes distancias por corrientes de aire. Una vez que la espora ha alcanzado la superficie del huésped se inicia el proceso de infección que para facilitar su descripción y estudio, puede considerarse dividido en varias etapas (Mendger y Deising, 1993). En la primera, ocurre la adherencia de los conidios a la superficie vegetal (Jones, 1994). Luego, comienza el proceso de germinación, en el que los conidios latentes producen el tubo germinativo, el cual al entrar en contacto con el tejido hospedero forma la hifa de infección (Hamer *et al.*, 1987). Los tubos germinativos penetran el tejido de la planta hospedera generalmente a través de heridas (Staples y Mayer, 1995) o por aperturas naturales (estomas y/o lenticelas) (Jarvis, 1977; Staples y Mayer, 1995). Sin embargo, al ser un microorganismo necrotrófico, este patógeno además es capaz de inducir la muerte de la célula vegetal para facilitar la colonización del tejido hospedero mediante la secreción de enzimas hidrolíticas (Jarvis, 1977; Baker y Bateman, 1978; Mendger *et al.*, 1996; Govrin y Levine, 2000; Benito *et al.*, 2000). Finalmente, se produce la invasión de las células adyacentes hasta abarcar la totalidad del tejido (Kolattukudy, 1981 y 1985).

B. cinerea produce un micelio blanquecino y de aspecto lanoso en el tejido infectado, el cual se vuelve gris durante la esporulación, lo que puede ocurrir unos pocos días después de que la infección se haya iniciado (ten Have, 2000; Latorre, 2004).

3.2.2. Variabilidad genética y fenotípica de los diferentes aislados de *B. cinerea*.

Botrytis fue reconocido como género por Micheli en el año 1729. En estos primeros tiempos fue confundido con *Sclerotinia* spp., confusión que perduró hasta 1945. La conexión entre *Botrytis* y el teleomorfo *Botryotinia* fue establecida entre los años 1940 y 1950 (Groves y Loveland, 1953, citados por Elad *et al.*, 2004).

Los aislados de *Botrytis*, especialmente *B. cinerea*, tienen una inusual tendencia natural a cambiar constantemente durante generaciones sucesivas, tanto cuando crecen *in vitro*, sobre medio de cultivo sintético, como en la naturaleza, ya sea de forma libre o como patógenos sobre los hospederos. Por ello, la variación genotípica y fenotípica es muy común dentro de la especie. Sin embargo, los mecanismos envueltos en este proceso de variabilidad no son del todo conocidos (Beever y Weeds, 2004). Una de las razones de esta variabilidad y quizás la única que proporciona a esta especie su marcada reputación de especie variable, es la existencia de diferentes morfologías o aspecto del micelio. Generalmente hay dos morfologías básicas, la esporógena y la esclerótica, aunque se distinguen varios subtipos de ellas dos que han sido reportadas por Martínez *et al.* (2003). El uso de marcadores poblacionales de ADN y los estudios de compatibilidad vegetativa y sexual que se han desarrollado en los últimos años han revelado una clonación muy limitada en *B. cinerea* (Elad *et al.*, 2004). Los papeles que representan la reproducción sexual y de la heterocariosis en esta variabilidad está aún bajo estudio (por heterocariosis se entiende la fusión de hifas genéticamente distintas), pero, si bien la heterocariosis ha sido tradicionalmente considerada como un mecanismo de variabilidad, se ha demostrado que juega un papel de menor importancia en *B. cinerea* (Beever y Weeds, 2004). Los marcadores

moleculares aplicados al estudio del hongo han demostrado unos niveles elevados de recombinación los cuales dan las limitaciones impuestas en heterocariosis por incompatibilidad vegetativa, probablemente como resultado de procesos sexuales más que parasexuales. Es probable que las mutaciones confieran una variación morfológica y una resistencia a los fungicidas (Beever y Weeds, 2004).

Se conoce que los diferentes morfotipos (diferentes aspectos de las colonias desarrolladas por el hongo) conocidos de *B. cinerea*, de los que se ha hablado en el párrafo anterior, se mantienen tras sucesivas réplicas en medio sintético de cultivo cuando se utiliza una pequeña porción de micelio para realizar los subcultivos, pero cuando el subcultivo se realiza a partir de un cultivo monospórico del aislado (a partir de una única espora o conidio), los características de los aislados pueden variar tras sucesivas réplicas (Beever y weeds, 2004). Por ello, es obvio que el micelio, los esclerocios y los conidios, presentan diferentes habilidades para sobrevivir y perpetuarse y que los papeles relativos de estas estructuras variarán enormemente dependiendo del ecosistema y de la estación del año.

B. cinerea se trata de la especie de hongo necrótrofo más estudiada en todo el mundo. Esto se debe a que causa grandes pérdidas económicas en las plantas cultivadas. El nivel de estudio es tal, que su genoma ha sido totalmente secuenciado hace no más de cuatro años y ahora hemos entrado en una nueva era en la investigación de este hongo, denominada era post-genómica. Adicionalmente, diversos investigadores han constatado la variabilidad fenotípica dentro de la misma especie, lo que quiere decir que diversos aislados de la misma especie pueden presentar distintos aspectos y otras características que varían entre ellos (Martínez *et al.*, 2003; Cotoras *et al.*, 2009). De esta manera, Martínez *et al.* (2008a) han constatado diferencias en distintos aislados de *B. cinerea* obtenidos de plantas ornamentales en relación al aspecto visual del micelio, tasa de crecimiento, tamaño de los conidios y producción de esclerocios cuando crecieron *in vitro* sobre medio sintético de cultivo (Fig. 3.7). Estos asilados también mostraron diferencias en la respuesta a la aplicación de diversas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o con otros potenciales efectos sobre el crecimiento fúngico como son: paclobutrazol, un retardador del crecimiento vegetal con propiedades fungicidas, (Martínez *et al.*, 2010), ácido giberélico, una hormona vegetal presente en *B. cinerea* y otros hongos, (Martínez y Bañón, 2007; Martínez *et al.*, 2008b), ácido indol-3-acético, una potente auxina vegetal, (Martínez *et al.*, 2011a), cloruro cálcico (Martínez *et al.*, 2011b), y a la aplicación de la bacteria promotora del crecimiento vegetal denominada *Bacillus velezensis* (Martínez *et al.*, 2012). También se ha puesto de manifiesto una diferente respuesta de estos aislados a la temperatura de crecimiento (Martínez *et al.*, 2009). Las diferentes respuestas de los asilados se manifestaron en la tasa de crecimiento del micelio, formación de conidios (conidiogénesis), formación de esclerocios y tamaño de estos, masa de micelio aéreo y sumergido, tamaño de los conidios,

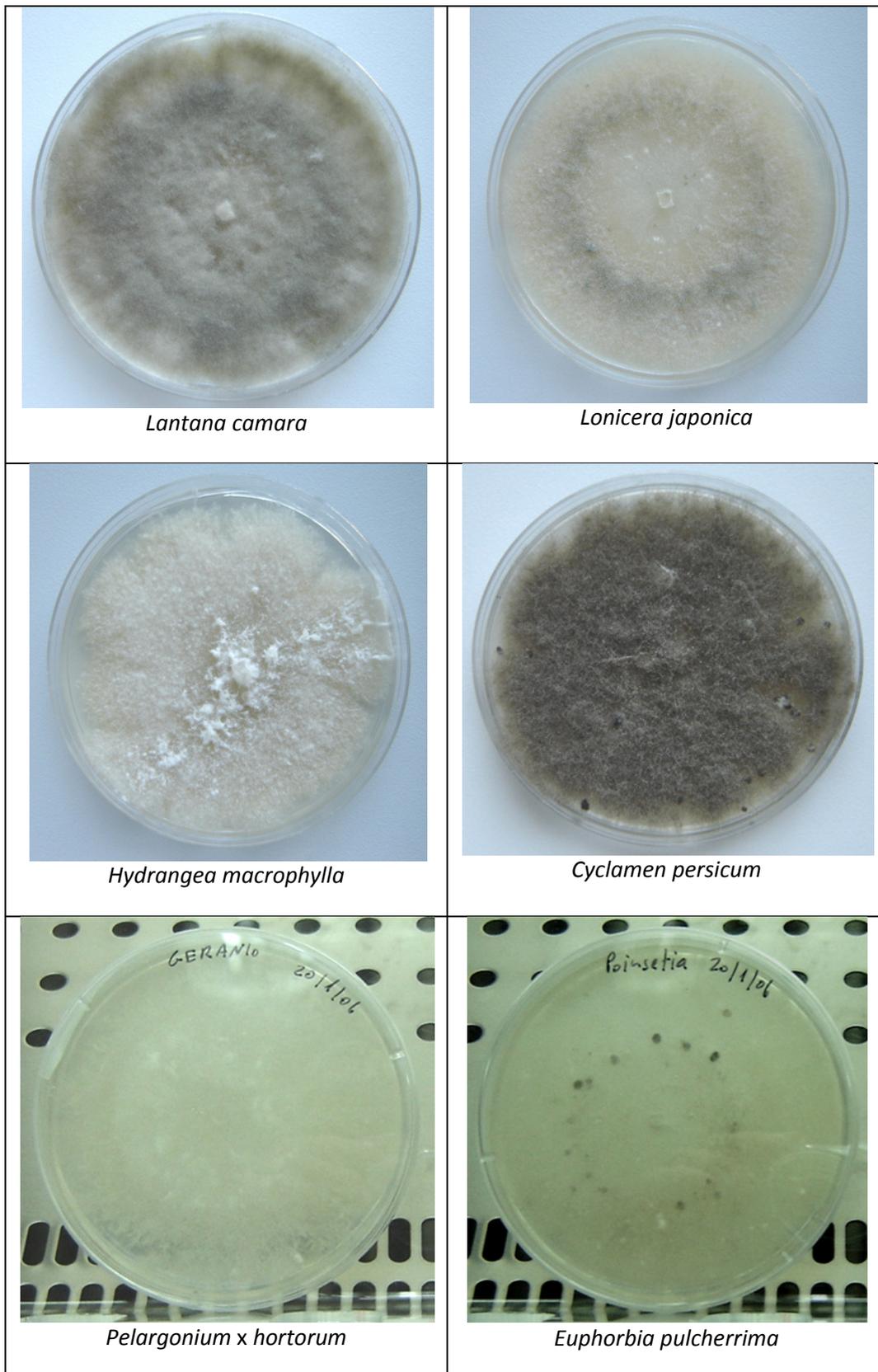


Figura. 3.7. Aspecto morfológico de distintos aislados de *Botrytis cinerea* obtenidos de plantas ornamentales afectadas de “Botrytis blight”, creciendo en medio sintético de agar de patata y dextrosa (PDA) a 26°C. **Fuente:** Adaptado de Martínez (2008a).

Se han realizado estudios de diversidad genética de diferentes poblaciones de *B. cinerea* parasitando diferentes cultivos en los invernaderos del sureste de España, concretamente en Almería. La colección de aislados se hizo en dos etapas. En la primera de ellas, se muestreó en 23 invernaderos con típicos cultivos de invierno de la zona, tanto de levante como de poniente. En la segunda etapa, que se realizó tres meses después, se recolectaron 75 aislados obtenidos de 16 invernaderos de poniente. El análisis de la estructura de la población reveló que la diversidad genética dentro de las subpoblaciones de las dos etapas ascendió al 98% del total de la diversidad observada, mientras que la diversidad genética entre subpoblaciones representó sólo el 2% de la diversidad. Este resultado nos da una idea de que la diversidad es proporcional al distinto grado de aislamiento y convivencia entre los aislados del patógeno; es decir, las poblaciones que conviven en el espacio y en el tiempo son genéticamente más homogéneas (Alfonso *et al.*, 2000).

También se ha encontrado variabilidad en relación al desarrollo de resistencias a diversos fungicidas, de tal manera que hoy por hoy la especie *B. cinerea* puede tolerar los fungicidas a base de bencenos clorados (grupo fungicida general de los bencenos sustituidos). Además han surgido aislados resistentes a los benzimidazoles cuando empezaron a aplicarse masivamente (Bollen y Scholten, 1971; citados por Elad *et al.*, 2004). También se ha constatado resistencias a las dicarboximidias (Katan, 1982). Una década después se identificó la base molecular de estas mutaciones que dan lugar a las resistencias (Yarden y Katan, 1993). En la actualidad, la proliferación de aislados resistentes a los fungicidas de síntesis por parte de *B. cinerea* constituye un serio problema. Sin embargo, la prevención es la base de todo mecanismo de control y más o menos, se tienen claras las condiciones de los cultivos que permiten minimizar el desarrollo de la enfermedad. Está claro que para prevenir las enfermedades ocasionadas por *Botrytis*, se recomienda el desarrollo de prácticas culturales que permitan la suficiente ventilación y el secado rápido de las plantas después de una lluvia y un aporte suficiente de agua de riego (Elad y Shtienberg, 1995).

3.2.3. Tipo de huéspedes y epidemiología

Este patógeno infecta principalmente especies dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas (Jarvis, 1977; Agrios, 1997; Latorre, 2004), siendo uno de los patógenos más importantes en plantas cultivadas en condiciones de invernadero (Kiso, 1988). Aunque entre los aislados existen variaciones notables de morfología cultural y de agresividad, no se ha encontrado especialización respecto al huésped (Smith, 2000). El hongo tiene una posición especial dentro del género *Botrytis*, el cual, como se ha comentado anteriormente, está constituido por 22 especies de hongos en 1973 (Hennebert, 1973) y que se caracteriza por infectar un rango restringido de especies vegetales (ten Have, 2000), ya que para *B. cinerea* se han identificado al menos 235 plantas hospederas (Jarvis, 1977), entre las que se incluyen frutales, plantas ornamentales y una serie de hortalizas, aunque su hospedero económicamente más relevante en nuestro país es la vid (Alvaréz, 1982; Latorre, 1986).

El hongo sobrevive principalmente sobre restos vegetales infectados. La principal fuente de dispersión del inóculo es el viento y la lluvia. Las condiciones en que el proceso de infección ocurre dejan en evidencia la gran adaptabilidad del patógeno. Se ha reportado que los conidios germinan a una humedad relativa de más de un 90% (Marois *et al.*, 1988; Salinas *et al.*, 1989; Yunis *et al.*, 1990; Latorre *et al.*, 2002) y a un rango de temperatura entre 1 a 30°C, con un óptimo entre 18 y 20°C. Esta flexibilidad extrema conlleva a que un cierto nivel de inóculo exista en casi todas partes y a que la extensión epidemiológica de la enfermedad pueda ser inhibida sólo cuando prevalecen condiciones secas (Rosslénbroich, 1999; Latorre y Rioja, 2002).

3.3. Importancia económica de la incidencia de Botrytis blight

B. cinerea es un hongo patógeno devastador que causa importantes pérdidas económicas a una amplia gama de frutas, verduras y cultivos ornamentales en todo el mundo (Antonov *et al.*, 1997).

Este hongo supone un peligro potencial, ya que es capaz de desarrollarse en regiones de clima templado como es el caso de España, en áreas secas y desérticas de Israel (Yunis y Elad, 1989) y en zonas frías como Alaska (Anderson, 1924), causando cuantiosas pérdidas en la agricultura. En Andalucía son los cultivos de la fresa, el tomate y la vid los más perjudicados por *B. cinerea*, ocasionando daños tanto cualitativos como cuantitativos en las cosechas. Se estima que el 20 % de las cosechas a nivel mundial, están afectadas por *B. cinerea*, lo que se traduce en un coste de 10 a 100 millones de euros al año (Genoscope, 2005). El coste anual de los tratamientos contra este patógeno asciende a 540 millones de euros, lo que constituye un 10 % del mercado mundial de fungicidas (UIPP, 2002).

Como se ha comentado con anterioridad, *B. cinerea* es un patógeno polífago, que ataca a la mayoría de las plantas cultivadas. Sin embargo, su débil actividad patógena hace que las condiciones ambientales como la temperatura, humedad relativa, presencia de agua libre sobre los tejidos de las plantas, etc. sean especialmente importantes para que se desencadene la infección y colonización de los tejidos. El estado sanitario de las plantas, el efecto de algún estrés y el estado senescente de las plantas o de algún determinado órgano, juega, del mismo modo, un papel esencial en el establecimiento de la enfermedad, ya que las hace especialmente vulnerables a los ataques por este hongo.

B. cinerea, y otras especies del mismo género, son importantes patógenos de plantas de vivero, hortalizas, ornamentales, de cultivos y de los productos frescos almacenados, por tanto se están realizando numerosos esfuerzos desde hace bastantes años para intentar controlar a estos patógenos tanto económicos como a través de la investigación con el fin de entender los procesos patogénicos de este hongo y la interacción con múltiples factores biológicos y ambientales. En este momento, es uno de los problemas más graves de los cultivos protegidos y al aire libre del litoral mediterráneo. Sin duda, el mayor conocimiento sobre las especies *Botrytis* que ha tenido lugar y sigue teniendo lugar durante los últimos 25 años, tanto de su ciclo de

vida, patogenicidad y epidemiología ha contribuido en una mayor comprensión a la hora de controlar las enfermedades de estos hongos (Elad *et al.*, 2004).

Entre los cultivos del sureste de España que son muy vulnerables a la podredumbre gris, cabe destacar la uva de mesa, el fresón, el tomate, la berenjena y el pimiento. Este hongo, en general, provoca importantes pérdidas en los cultivos de invierno de tomate, berenjena, pepino, calabacín, judía, pimiento, etc. debido a que en el interior de los invernaderos se dan las condiciones idóneas para el desarrollo de la enfermedad y en estas condiciones es muy difícil su control. Otra de las razones de las dificultades que presenta su control viene determinada por la presencia de resistencias a distintos grupos de fungicidas que se utilizan comúnmente.

Botrytis spp. causa enfermedades en plantas distribuidas en las zonas templadas del planeta. Sin embargo, las especies del género *Botrytis* crecen como patógenas en todos sus huéspedes independientemente de las zonas donde crezcan; de este modo, se han encontrado plantas afectadas desde zonas tropicales y subtropicales hasta áreas frías, desde áreas húmedas a secas. Esto es debido a que los procesos de germinación de conidios, infección, crecimiento del micelio y conidiogénesis pueden ocurrir bajo un amplio rango de condiciones microclimáticas e incluso, en algunos casos no es necesaria una pequeña capa de agua sobre la superficie vegetal para que se produzca la germinación de los conidios, de ahí su importancia también en climas secos. Este es otro factor por el que este hongo puede causar enfermedades severas en las plantas distribuidas alrededor del mundo (Elad *et al.* 2004).

Las enfermedades de las plantas son importantes para el ser humano debido a que perjudican a las plantas y sus productos. Para los millones de personas que habitan en las regiones más pobres del planeta y cuya existencia depende de los productos vegetales, las enfermedades de las plantas pueden marcar la diferencia entre una vida normal y una acosada por el hambre (Agrios, 2010).

El tipo y cantidad de las pérdidas ocasionadas por las enfermedades de las plantas varía de acuerdo a la especie de planta o de los productos que se obtienen de ellas, así como el agente patógeno, la localidad, el medio ambiente, las medidas de control practicadas, etc., o con base en la combinación de todos estos factores. La suma de pérdidas varía entre el 0% y el 100%, siendo la media a nivel mundial del 30%. Sin embargo, rara vez se obtiene el 0% y el 100% sólo puede ser alcanzado cuando se establece alguna epifitias en el cultivo. Se pueden alcanzar pérdidas normales del 25% en el cultivo de cereales y durante el almacenamiento frigorífico de los productos cosechados es habitual sobrepasar el 10% de pérdidas por deshidratación, alteraciones fisiológicas y podredumbres.

El carácter polífago y elevado poder patógeno, entendido éste como la suma de dos componentes: virulencia y agresividad, hace que *B. cinerea* puede desencadenar procesos de gravedad de la enfermedad que desembocan en unas consecuencias

económicas importantes. La gravedad de la enfermedad se debe a la suma de dos factores regulados por el ambiente:

1. Los factores inherentes al patógeno.
2. Los factores inherentes al hospedador.

Dentro del apartado 1 se encuentran:

1.1. Densidad del inóculo.

Dado que *B. cinerea* se disemina por el aire, la cantidad de conidios u otros propágulos infectivos que pueden alcanzar las plantas suelen ser muy elevados en número (masa conidial); especialmente porque las plantas afectadas pueden formar miles de estos conidios que en masa dota al micelio de color grisáceo.

1.2. Capacidad infecciosa del inóculo.

Esta capacidad no es muy elevada, ya que la categoría patógena de *Botrytis* spp. es baja (ver apartados anteriores).

1.3. Efectos del ambiente.

Las temperaturas moderadas y la alta humedad relativa favorecen las infecciones.

Entre los factores inherentes al hospedero, se distingue:

2.1. Susceptibilidad propia del hospedante.

Esta susceptibilidad está ligada generalmente a la presencia de heridas y microheridas, plantas estresadas o senescentes.

2.2. Predisposición del hospedante ligada al ambiente.

En el caso de *Botrytis* spp. está clara la influencia del ambiente para que se produzca la enfermedad.

Como consecuencia de los comentarios anteriores, se puede deducir que las enfermedades producidas por *Botrytis* spp. pueden tener una consecuencia grave, especialmente en plantas o tejidos estresados, senescentes y debilitados y si, al mismo tiempo, se dan condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Es un hecho irrefutable que la podredumbre gris es la mayor causa de pérdidas en los viñedos de todo el mundo y es un problema tanto para los viticultores como

para productores de vino, debido a que es muy rápida y resistente a los fungicidas. El daño causado por la podredumbre gris, tiene un impacto económico desastroso en numerosos cultivos, en los viñedos en particular, pero también produce cuantiosas pérdidas en el cultivo del fresón y de bulbos. Adicionalmente, se producen pérdidas muy elevadas en cultivos de tomate bajo malla cuando se producen períodos frecuentes de lluvias que provocan una elevada humedad relativa en el ambiente y, lo que es peor, un período continuado donde las plantas permanecen mojadas. Estas situaciones han provocado pérdidas de cosechas de tomate en la zona de Águilas, en Murcia, y en Andalucía. Para minimizar estas pérdidas un equipo investigador israelí ha desarrollado un modelo epidemiológico, denominado BOTMAN (BOTrytis MANAger), para predecir el riesgo desarrollo de la podredumbre gris en cultivos de invernadero y se basa en las siguientes variables que están íntimamente relacionadas con el momento de la infección del hongo: lluvias (cantidad y frecuencia), temperatura máxima y mínima, número de días con cielo cubierto y tiempo seco y caliente. Una vez que los valores de estas variables se introducen en el ordenador, el modelo evalúa el riesgo de infección y, por tanto, permite actuar con tratamientos preventivos sólo cuando estos sean necesarios.

Las pérdidas por la infección de la podredumbre gris representan el 20% de las cosechas de los cultivos afectados en el mundo, y su coste se estima en 10- 100 millones de euros al año. En el sector del vino causa pérdidas en los viñedos, equivalentes a un 15-40% de las cosechas en función de las condiciones climáticas. Estas pérdidas superan los 15 mil millones de euros al año, es decir, se pierde el 25% de la facturación potencial debido a este problema. En los países tropicales, se pierde cerca del 25% de los productos hortofrutícolas entre la cosecha y consumo (Narayanasamy, 2006).

Otras pérdidas constatadas se estiman en el 20-25% de los cultivos de fresa en España, y el 20% de las flores cortadas en Holanda.

En poscosecha, las pérdidas son muy elevadas incluso en los países desarrollados y en buena parte están ligadas a los daños mecánicos que se producen durante el cultivo, cosecha, manipulación y transporte (Narayanasamy, 2006).

Las podredumbres por *Botrytis cinerea* son habituales en el almacenamiento de frutas como los cítricos (especialmente limones y mandarinas), manzanas, peras y fruta de pepita en general, uva, melocotones y fruta de hueso en general, fresas, etc. (Snowdon, 1990).

En los cítricos españoles, la podredumbre gris ocasiona pérdidas de entre el 8 y 25% total durante un almacenamiento refrigerado, ocupando la cuarta posición de incidencia en este tipo de frutos por debajo de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *Alternaria citri* (Tuset, 1987).

Otros datos de pérdidas por podredumbre gris en poscosecha son los siguientes reportados por autores citados en la obra de Narayanasamy (2006) titulada "Postharvest Pathogens and Disease Management":

- 8 al 23% de manzanas en Francia (Bondoux, 1967).
- 10 al 15% de fresas en EE.UU. (Legard *et al.*, 2000).
- 20 al 30% de kiwis en EE.UU. y Nueva Zelanda (Michailides y Elmer, 2000).

Contra todo este panorama es de destacar que los tratamientos fungicidas contra *B. cinerea* se ha cifrado en unos 540 millones de euros el año, lo que representa el 10% del mercado de fungicidas de todo mundo. A esto hay que sumar el grave problema de la aparición de aislados resistentes a los fungicidas más comunes. Esto hace que no todos los aislados de *B. cinerea* se vean afectados por los fungicidas utilizados tradicionalmente.

4. CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS ORNAMENTALES

CAPÍTULO 4. CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS ORNAMENTALES

4.1. Métodos de control de las enfermedades causadas por *Botrytis* spp.

El control de *B. cinerea* no resulta sencillo por diversas razones: i) es capaz de atacar a las plantas en cualquier estado de desarrollo, ii) es hábil para crecer a temperaturas muy bajas y iii) es genética y morfológicamente heterogéneo, lo que le posibilita un crecimiento y desarrollo diferente en condiciones de cultivo desiguales. Existen distintas técnicas de control para las enfermedades causadas por *Botrytis* spp., las cuales se desarrollan a continuación.

4.1.1. Fungicidas de síntesis

Los fungicidas de síntesis han sido durante muchos años el principal camino contra la lucha de este hongo fitopatógeno, pero debido a que este hongo ha generado resistencias a ellos y la mayor concienciación social sobre el medio ambiente, los agricultores están buscando otras alternativas más naturales (Dardari *et al.*, 2004). Por ello actualmente, el control de esta enfermedad se obtienen integrando medidas de saneamiento con el uso de tratamientos fungicidas en los momentos más críticos para la infección (Latorre *et al.*, 2001). Los fungicidas son usualmente valiosos pero en su mayor parte se utilizan como preventivos. De este modo, un programa regular de aspersiones con productos preventivos es casi siempre la mayor estrategia de control (Montaño, 2005).

La investigación sobre sustancias químicas de síntesis ha tenido como consecuencia el control de gran parte de las enfermedades postcosecha. Estas sustancias se denominadas fungicidas y bactericidas (letales para hongos y bacterias, respectivamente) o, también, fungistáticos y bacteristático (sustancias que retardan el desarrollo fúngico y bacteriano, respectivamente). El producto químico actúa entrando en contacto con el patógeno; la concentración mínima efectiva depende de los patógenos y de otros factores muy numerosos. Los tratamientos químicos se pueden aplicar de acuerdo con diversas estrategias como son: a) Aplicación antes de la cosecha para prevenir la infección en el campo; b) Uso de técnicas sanitarias para reducir el nivel de inóculo infectivo en el medio ambiente donde las frutas o vegetales están almacenadas; c) La aplicación de estas sustancias en postcosecha con el fin de prevenir la infección a través de heridas y para erradicar o atenuar las infecciones establecidas y para reducir el desarrollo y difusión durante el almacenamiento. Con el fin de elegir la estrategia adecuada para el control del deterioro, tenemos que entender el modo de infección del patógeno, el momento de la infección y los factores ambientales que pueden afectar el desarrollo de la enfermedad (Barkai-Golan, 2001).

Para el control de *Botrytis* spp. existen diversos tipos de fungicidas tales como: fungicidas multiuso que actúan a nivel de respiración celular del hongo; inhibidores de la síntesis de microtúbulos como los benzimidazoles y N-fenilcarbamato; inhibidores de la síntesis de lípidos como las dicarboximidas; inhibidores de la síntesis de proteínas

y aminoácidos como las anilinoprimidinas; inhibidores de la síntesis del esteroles en la membrana celular; y algunos otros mecanismos denominados de última generación, como los inhibidores de la síntesis de metionina (Rosslenbroich y Stueblerm, 2000).

Entre los compuestos químicos de síntesis, existen varios fungicidas que actualmente están autorizados para el control de la podredumbre gris. Estos son los siguientes (<http://www.magrama.gob.es>):

- FENHEXAMIDA también se usa mezclado con TEBUCONAZOL. Se utiliza también para el control de *Monilia* y *Esclerotinia*.
- CLORTALONIL. También está autorizados su uso para combatir estas enfermedades: *Monilia*, *Helminthosporium*, *Septoria*, *Alternaria*, antracnosis, mildiu y chancro.
- CAPTAN. También está autorizado su uso para combatir estas plagas: roya, *Stemphylium*, *Fusarium*, *Phialophora*, *Rhizoctonia*, *Monilia*, *Alternaria*, antracnosis, mildiu y chancro.
- TIRAM. También está autorizado su uso para combatir estas plagas: *Monilia*, chancro, antracnosis, moteado y hongos del suelo.
- TEBUCONAZOL también se usa mezclado con FENHEXAMIDA. Se utiliza también para el control de: cladosporiosis, *Sclerotinia*, roya, *Helminthosporium*, *Piricularia*, oídio, *Septoria*, *Stemphylium* y repilo.
- IPRONIA. También está autorizado su uso para combatir estas plagas: *Monilia*, antracnosis, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* y *Mycogone*.
- MEPANIPIRIM.
- FOLPET también se usa mezclado con IMAZALIL o con CIMOXANILO o con SULFATO CUPROCÁLCICO y OXICLORURO DE COBRE o con METALAXIL y OXICLORURO DE COBRE. Se utiliza también para el control de: *Alternaria*, *Penicillium* y *Gloeosporium*.
- METIL TIOFANATO también se usa mezclado con MANCOZEB. Se utiliza también para el control de: roya, *Fusarium*, *Septoria*, cladosporiosis, *Monilia*, oídio, antracnosis, cribado, moteado y rabia.
- CIPRODINIL también se usa mezclado con FLUDIOXONIL. Se utiliza también para el control de: *Aspergillus*, *Monilia* y moteado.
- IMAZALIL también se usa mezclado con PIRIMETANIL o con FOLPET.
- DIETOFENCARB

- PIRIMETANIL también se usa mezclado con IMAZALIL.
- BOSCALIDA también se usa mezclado con PIRACLOSTROBIN. Se utiliza también para el control de *Sclerotinia* y oídio.
- AZOXISTROBIN. También está autorizados su uso para combatir estas plagas: oídio, *Mildiu*, *Didymella*, *Sclerotinia*, *Alternaria*, roya, *Helminthosporium*, *Septoria*, *Cercospora*, *Pycularia*, *Rincosporium*, *Mycosphaerella*, *Stemphylium*, antracnosis y oídio.
- PROCLORAZ.

4.1.2. Substancias naturales de acción fungicida

Los productos naturales de plantas presentan una serie de ventajas con respecto a los fungicidas sintéticos, las que incluyen su baja toxicidad, menor residualidad y alta selectividad (Tewari, 1990, Rao, 1990, Badei *et al.*, 1996; Bishop y Thornton, 1997), por lo que pueden ser ideales candidatos para su uso como agroquímicos (Duke, 1990; Macías *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2003). Si bien el problema de desarrollo de resistencia también es aplicable a metabolitos de origen vegetal (Papadopoulou *et al.*, 1999; Bouarab *et al.*, 2002), estos compuestos se caracterizan por mantener un balance ecológico en la naturaleza, por lo que la probabilidad de que este fenómeno ocurra, es menor (Chapagain *et al.*, 2007).

Las plantas producen un amplio rango de metabolitos secundarios con actividad antimicrobial como un mecanismo de defensa contra patógenos (Rice, 1987; Osbourn, 1996a, 1999; Bennett y Wallsgrave, 1994; Morrissey y Osbourn, 1999). En este contexto, la mayoría de las especies vegetales sintetizan metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos, ya sea como parte de su programa normal de crecimiento y desarrollo, o en respuesta al ataque de patógenos y otras condiciones de estrés (Duke, 1990; Grayer y Harborne, 1994; Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001).

Compuestos antimicrobiales preformados, denominados “fitoanticipinas”, están presentes constitutivamente en plantas sanas y representan barreras químicas a la infección de potenciales patógenos (Osbourn, 1996; Morrissey y Osbourn, 1999). Tales metabolitos son secuestrados en vacuolas u orgánulos en el tejido sano, principalmente a nivel de células epidérmicas (Grayer y Harborne, 1994; Osbourn, 1999a y b; Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001), ya sea en sus formas biológicamente activas o como precursores inactivos, los cuales pueden ser rápidamente liberados y/o activados en respuesta al ataque fúngico (Melton *et al.*, 1998; Osbourn, 1999a y b; Dixon, 2001). La activación de estos compuestos involucra la acción de enzimas vegetales, las cuales son separadas por compartimentalización de sus sustratos en el tejido sano (Osbourn, 1996; Edwards y Gatehouse, 1999; Morrissey y Osbourn, 1999).

Por otro lado, las “fitoalexinas”, metabolitos antimicrobiales inducidos, no se encuentran presentes en el tejido sano (van Etten *et al.*, 1995), siendo sintetizados de nuevo en respuesta al ataque por patógenos o condiciones de estrés (Morrissey y Osbourn, 1999), por lo que generalmente están restringidos al tejido colonizado por el hongo y las células que rodean el sitio de infección (VanEtten *et al.*, 1994; Morrissey y Osbourn, 1999; Dixon, 2001).

4.1.3. Control biológico

En un sentido estricto, el término control biológico de enfermedades vegetales se restringe a la utilización controlada de microorganismos que antagonizan con los microorganismos patógenos. No se incluye, por tanto, el uso de sustancias naturales derivadas de plantas o animales ni la obtención de cultivares del huésped resistentes a las enfermedades.

Puede definirse como la manipulación directa o indirecta por parte del hombre de los agentes vivos (antagonistas) que de forma natural presentan capacidad de control de los agentes patógenos. La relación biológica entre los antagonistas y los patógenos suele ser bastante específica. Puesto que se trata de una interacción entre organismos vivos, este tipo de control presenta una serie de ventajas importantes respecto a los sistemas físicos y químicos.

Básicamente, los factores que determinan las posibilidades de utilización de un antagonista contra patógenos de postcosecha son su supervivencia y su efectividad en condiciones ambientales y de frigoconservación. También es muy importante su capacidad de colonizar las heridas de la piel, que son los puntos de inicio de las infecciones. Además el hecho de que la fruta tratada se almacene en condiciones controladas de temperatura y humedad facilita la utilización de agentes de biocontrol, pues éstos no se encuentran sometidos a variaciones ambientales (Palou, 2007).

Muchos microorganismos reprimen el crecimiento de fitopatógenos a través de la competencia de nutrientes la producción de metabolitos inhibitorios y/o por parasitismo, por lo tanto limitan naturalmente las enfermedades de las plantas. Numerosos estudios han descrito el aislamiento de microorganismos antagonistas con una visión de explorar su potencial para la supresión biológica de las enfermedades (Martínez (2012)

El control biológico usando microorganismos antagonistas naturales ha sido extensivamente estudiado, y algunos hongos y bacterias han sido demostrados como efectivos contra *Botrytis* spp.

Varias cepas del género *Bacillus* han recibido mucha atención como agentes de biocontrol. Las especies de *Bacillus* han sido reportadas por ser efectivas en el biocontrol de múltiples enfermedades de plantas debido a su producción de varios antibióticos de amplio espectro y a su habilidad de formar endosporas. Varias cepas de

Bacillus han sido desarrolladas como biofungicidas comerciales. De hecho, la especie *Bacillus subtilis* se está comercializando actualmente en España para combatir *Sclerotinia*, *Monilia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, fuego bacteriano y moteado. El éxito de la escala de producción de los organismos y la formulación efectiva es esencial para el desarrollo estable y económico de biofungicidas (Lee *et al.*, 2006).

Con frecuencia se proponen métodos de control biológico como alternativa a los insecticidas sintéticos, para así reducir su impacto en el medio agrícola. En este contexto, se confía en los enemigos naturales de las plagas para limitar el daño ocasionado a los cultivos. Sin embargo, no debe olvidarse que los organismos viven en un contexto multitrófico, basado en interacciones quimiobiológicas, y han evolucionado en ese trasfondo. Por lo tanto, dicha medida, aunque deseable, conlleva complejidades y quizá sorpresas.

Esta herramienta, si bien en algunos casos ha mostrado interesantes niveles de control, presenta una serie de limitaciones, tales como su eficacia variable en condiciones de campo (McGrath y Shishkoff, 1999; Bettiol y Stadnick, 2001; Beth-Din *et al.* 1996; Paulitz y Bélanger, 2001; Elmer y Reglinski, 2006), y el alto costo de producción (Fravel, 1999; Stewart, 2001; Gerhardson, 2002; Spadoro y Gullino, 2005), lo que explicaría el que sólo una pequeña proporción de los biocontroladores que han mostrado ser efectivos en condiciones de laboratorio, hayan sido desarrollados comercialmente (Elmer y Reglinski, 2006).

4.1.4. Potenciación de las defensas naturales de las plantas

Cada vez hay más conciencia pública sobre los inconvenientes potencialmente perjudiciales para los consumidores de los muchos tratamientos químicos aplicados a los productos hortícolas frescos para controlar sus pudriciones. Este hecho, junto con la posible consecuencia de que un número de productos químicos puede ser retirado de su uso, ha reavivado y el aumentado el interés en los tratamientos físicos que podrían servir como alternativas a los fungicidas. Almacenamiento en frío, calefacción, radiaciones ionizantes, luz ultravioleta y atmósferas controladas o modificadas son medios físicos para mantener la resistencia del huésped (Barkai-Golan, 2001).

Existen activadores físicos y químicos de las defensas naturales de las plantas. Entre los físicos destacan los siguientes: uso de atmósferas modificadas, tratamientos térmicos, radiación gamma (γ) y la radiación ultravioleta (UV). Los mecanismos químicos de inducción de defensas son principalmente los siguientes: la inducción del etileno tras la respuesta hipersensible, el quitosán, los antioxidantes, el ácido salicílico, el calcio, la laminarina y los activadores biológicos que ya se han desarrollado en el subapartado anterior.

4.1.4.1.- Activadores físicos

4.1.4.1.1.- Atmósferas modificadas

Todas las condiciones físicas a las que son sometidas las frutas, las hortalizas y las flores tras su cosecha están encaminadas a retrasar la senescencia. De este modo la aplicación de temperaturas de refrigeración, las atmósferas modificadas y controladas son las técnicas de conservación que se utilizan habitualmente, especialmente las dos primeras que se usan conjuntamente y su objetivo es mantener la resistencia natural del hospedero el mayor tiempo posible retrasando su senescencia. El aumento del CO₂, tanto en atmósfera controlada o modificada retrasa la maduración de los frutos. Cuando la maduración es ralentizada el compuesto dieno, que tiene propiedades antifúngicas según se ha argumentado en el capítulo anterior, permanece más tiempo estable, por lo que su degradación natural se ve disminuida. Esto se ha comprobado en la enfermedad postcosecha de la antracnosis ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides* en mango (Prusky *et al.*, 1991). Ardi *et al.* (1998), demostraron que la exposición de frutos de aguacate a atmósferas enriquecidas de CO₂ incrementaron la concentración del antioxidante epicatequina y de dieno en la piel, aumentando la resistencia contra los hongos porque mantiene las infecciones producidas en estado quiescente.

El decremento de la resistencia en la piel del aguacate durante su maduración ha sido atribuido a la actividad lipoxigenasa, que oxida los compuestos antifúngicos a compuestos inactivos, mientras que la actividad lipoxigenasa es regulada por la epicatequina (Barkai-Golan, 2001).

También se ha asociado una elevada concentración de CO₂ a un aumento de resorcinoles en los frutos de mango que tiene como consecuencia un aumento de la resistencia contra *Alternaria alternata* (Prusky y Keen, 1995).

Reyes (1990), reportó que la podredumbre gris podría ser reducida significativamente en berenjena por medio del uso de atmósfera modificada a una temperatura de 13°C durante 14 días. La atmósfera que mejores efectos tuvo fue: 7,5% CO (monóxido de carbono) + 1,5% de O₂. Sin embargo, en el sector de la utilización de las atmósferas controladas, se tiene tendencia a no usar el CO por su extrema toxicidad contra los seres humanos a pesar de que presenta unas elevadas propiedades fungicidas.

Hammer *et al.* (1990), demostraron que el almacenamiento de las flores de rosa en una atmósfera con 10% de CO₂ a 2,5°C durante 5 días seguido de 2 días al aire redujo considerablemente la incidencia de podredumbre gris, en este caso es comúnmente llamada "Botrytis blight".

Como se argumentó en el apartado anterior, los tratamientos con atmósferas enriquecidas en CO₂ presentan el inconveniente que contribuyen al efecto invernadero. Otro problema que presenta es que es costoso el mantenimiento de

recintos cerrados con atmósferas generadas artificialmente (atmósferas controladas). Solamente el uso de las atmósferas modificadas generadas naturalmente por la respiración del producto y la permeabilidad del envase a los gases, permite el uso relativamente económico de la modificación de la atmósfera. Las atmósferas con un contenido superior al 10% de CO₂, ya permiten un efecto fungistático sobre la fruta, por lo que permite aumentar su resistencia de forma moderada siempre que el producto no sea muy sensible al CO₂, como es la lechuga, a la que provoca lesiones fisiológicas.

4.1.4.1.2.- Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos pueden afectar a los procesos fisiológicos de los productos vivos cosechados como son las frutas, hortalizas y flores., aunque depende de varios factores como son la especie, variedad, edad fisiológica, y por otro lado, de la temperatura y tiempo de exposición al calor. Este tratamiento, bien aplicado, permite retardar el proceso de maduración y aumentar la resistencia del hospedero al patógeno. Adicionalmente, los tratamientos de calor tienen efectos beneficiosos en el control de las podredumbres, cicatrización de heridas y eliminación de virus, insectos y nematodos. Estos tratamientos presentan tres beneficios claros cuando son bien aplicados y concurren las otras condiciones enumeradas al principio de este párrafo son favorables. Estos beneficios son (Narayanasamy, 2006):

- 1.- Inhiben directamente el crecimiento del patógeno
- 2.- Activan la resistencia natural del hospedero
- 3.- Ralentizan el proceso de maduración

El tratamiento térmico induce resistencia al hospedero porque provoca un estrés por calor que promueve la producción de fitoalexinas. Se ha comprobado que promueve la formación de cumarinas en la piel de los frutos cítricos que presenta actividad fungitóxica contra las especies patógenas de *Penicillium* en la postcosecha (Ben Yehoshua *et al.*, 1992). Los tratamientos térmicos también pueden inducir la formación de proteínas específicas conocidas como proteínas de choque térmico o inducidas por calor ("Heat Shock Proteins" - HSP) en los tejidos de las plantas (Barkai-Golan, 2001).

Los tratamientos postcosecha con calor se utilizan sólo durante cortos períodos de tiempo, de 3 a 5 minutos, porque los patógenos suelen estar en la superficie de los tejidos o, como mucho, en las primeras capas celulares, por ello, no es necesario que el calor alcance todo el tejido. Generalmente las frutas y hortalizas soportan temperaturas hasta los 50 o 60°C durante 5 o 10 minutos. Generalmente se aplican en baño de agua caliente.

Los baños de agua caliente en fresa no resultaron ser positivos en el control de la podredumbre gris, cuando se realizaron entre 40 y 48°C durante 3 a 15 minutos, ya que no afectaron al hongo e incluso llegaron a dañar los frutos (Narayanasamy, 2006).

La aplicación de los tratamientos térmicos aplicados en forma de curado (un tratamiento inicial a elevada temperatura durante varias horas), calentamientos intermitentes o enfriamientos intermitentes, tienen el inconveniente que requieren ser aplicados con sumo cuidado para evitar que el tratamiento sea contraproducente porque las elevadas temperaturas aplicadas durante períodos no favorables pueden promover la senescencia, por lo que disminuiría la resistencia en vez de aumentarla. Además la respuesta dependería de muchos factores, por lo que los tratamientos de este tipo suponen ciertos riesgos.

4.1.4.1.3.- Radiación gamma

La radiación ionizante puede suprimir la infección y la colonización fúngica directamente por su efecto sobre las esporas y las hifas del hongo, pero también puede reducir las infecciones indirectamente porque retarda la maduración y senescencia de los frutos y contribuye al mantenimiento de la resistencia natural de las plantas a las infecciones y al desarrollo de los patógenos. Sin embargo, la radiación gamma actúa también como un estrés abiótico para la planta induciendo la síntesis de fitoalexinas como la escopoletina y la escoparona.

La aplicación de esta técnica se utiliza también para inducir mutaciones en las plantas que puedan generar plantas resistentes a enfermedades que puedan ser sometidas a un plan de mejora genética (ver apartados de modificación genética de las plantas). No obstante, los equipos industriales de radiación gamma son menos comunes que los de radiación UV.

4.1.4.1.4.- Radiación ultravioleta

La UV es otro tratamiento físico que puede inferir resistencia contra la infección fúngica. El efecto de la luz UV-C, de longitud de onda por debajo de 280 nm, ha sido demostrado que induce resistencia en una amplia variedad de frutas y hortalizas cuando se utilizada a bajas dosis. Este efecto beneficioso se ha comprobado en cebolla, zanahoria, pimiento, tomate, boniatos, melocotones, frutos cítricos y uva de mesa (Barkai-Golan, 2001). Su aplicación está limitada irradiar frutos tras la recolección, ya que todos los tipos de radiación UV, lo mismo que ocurre con la radiación γ provoca daños en el ADN de las células vegetales, siendo un factor importante de mutaciones, lesiones y muerte celular. Incluso puede crear reacciones indeseables en los órganos vegetales que reducen la supervivencia comercial de algunos de ellos, como las cebollas y boniatos (Narayanasamy, 2006). Sin embargo, una buena variedad de frutas y hortalizas responden favorablemente a la radiación UV, aumentando la resistencia a las enfermedades.

El efecto favorable sobre el aumento de la resistencia está promovido por la activación de varios sistemas de defensa en los tejidos del hospedero. El efecto más importante es la acumulación de fitoalexinas. En rodajas de zanahorias, la luz UV induce resistencia contra *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* por la síntesis de la fitoalexina 6-metoximeleina (Mercier *et al.*, 1993). Este compuesto estuvo presente en los tejidos hasta una semana después de su inducción a la síntesis. Sin embargo, se pudo alargar el período de tiempo en el que este compuesto estuvo presente en los tejidos de la zanahoria incluso más de un mes manteniendo la temperatura de conservación lo más próximo posible a 0°C.

Se ha comprobado que la radiación con luz UV induce la síntesis de otras fitoalexinas como la escoparona (induce resistencia en frutos cítricos durante un mes después de la irradiación). Sin embargo, la resistencia inducida depende de la existencia de una fase latencia o de adaptación del patógeno antes de iniciar su crecimiento en la superficie de los frutos. De este modo, la luz UV puede inducir a que los conidios germinados puedan inducir su crecimiento, ya que el mayor pico de fitoalexinas suele alcanzarse 2 días después de la radiación, por lo que transcurrido este tiempo puede ser que el patógeno no vea alterado su desarrollo significativamente por efecto de la acumulación de las fitoalexinas. También hay que tener en cuenta que la radiación UV puede dañar los propágulos fúngicos siempre que se encuentren a nivel superficial en los tejidos vegetales y perfectamente expuestos al aire porque la luz UV presenta poca capacidad de penetración en los tejidos vegetales.

Además de la inducción de fitoalexinas, que se produce como consecuencia de la radiación UV, se ha comprobado que se estimula la síntesis del metabolismo secundario de las plantas hacia la síntesis de enzimas como la fenilalanina-amonioliasa (PAL) y la actividad peroxidasa. Ambas enzimas se consideran que juegan un papel esencial en la inducción de la resistencia de las plantas contra los patógenos (Barkai-Golan, 2001). La producción de quitinasa y glucanasa, proteínas PR, se ha observado en pomelos irradiados e inoculados posteriormente con conidios de *Penicillium digitatum*. Estas dos PRs pueden hidrolizar los polímeros de las paredes celulares de los hongos (Porat *et al.*, 1999).

La radiación con luz UV-C (0,01 J cm⁻²) redujo las podredumbres ocasionadas por *B. cinerea* en fresas. Esta radiación no se tradujo en daños a los frutos, incluso a dosis mucho más elevadas (6 J cm⁻²) (Narayanasamy, 2006). *Monilia fuctigena* mostró una mayor sensibilidad a la luz UV-C que *B. cinerea*. Tras la irradiación, aumentó la actividad PAL relacionada con la biosíntesis de compuestos fenólicos, los cuales tienen propiedades antifúngicas. Adicionalmente la luz UV incrementa la producción de etileno que es proporcional a la dosis aplicada.

Nigro *et al.* (1998), comprobaron que tras irradiar uva de mesa con luz UV-C de 0,125 a 4 kJ m⁻², y después de inocular con *B. cinerea* aumento la resistencia de la uva a la podredumbre gris.

Aunque el potencial que presenta la irradiación con luz UV como inductor de la resistencia en frutas y hortalizas presenta un efecto favorable claro y es de fácil aplicación en recintos cerrados dotados con lámparas UV, donde se puede controlar la temperatura y la duración del tratamiento, también es cierto que estos tratamientos no superan el control de la podredumbres obtenidos por la utilización de los tradicionales fungicidas de síntesis. Lamentablemente, esto es un hecho cierto cuando se pretende utilizar tratamientos que aumente la resistencia de las plantas evitando la utilización de los fungicidas de síntesis. Sin duda, la opción que se está promoviendo en el presente es utilizar todas estas herramientas que nos ofrece la investigación en este campo, junto con la utilización de los fungicidas, pero dentro de un plan establecido que nos permitan evitar las enfermedades, reduciendo en la medida de lo posible el uso de los fungicidas. La investigación en este campo nos permite controlar la aplicación de estos fungicidas para que sean aplicados a dosis más bajas y únicamente cuando sean necesarios.

Los usos combinados de radiación UV junto con control biológico parecen prometedores porque se ha demostrado que la radiación UV no daña a los microorganismos beneficiosos que se encuentran en la superficie de las plantas ni a los que dan buenos resultados en el control biológico.

4.1.4.2.- Activadores químicos

4.1.4.2.1.- Inducción de etileno tras la respuesta hipersensible

Algunas enfermedades de plantas ocasionadas por hongos, virus o bacterias restringen sus síntomas al punto de infección de la planta, donde aparecen lesiones necróticas. Este fenómeno es conocido como respuesta hipersensible (“hypersensitive reaction” – HR). Esto consiste en una necrosis provocada por la propia planta para aislar y detener el ataque del patógeno. El etileno está implicado en la respuesta de la HR. El tratamiento con esta hormona a los frutos cítricos puede causar una degradación de la clorofila y un incremento de los carotenos (proceso que se denomina desverdización), pero presenta el inconveniente de que estimula la formación de apresorios de *Colletotrichum gloeosporioides*. Sin embargo, cuando se eliminan los apresorios antes del tratamiento con etileno, los frutos desarrollan resistencia a la invasión del patógeno estimulando la reacción HR alrededor de los puntos de infección, desarrollando varias capas de células muertas alrededor de las hifas del hongo. Estas células se llenan de compuestos fenólicos que presentan propiedades antifúngicas, tal y como se describió en el capítulo anterior.

4.1.4.2.2.- Quitosán

El quitosán o quitosano es un derivado de la quitina, un polímero natural, y se ha demostrado que presenta actividad fungicida contra muchos hongos, incluidos los fitopatógenos. Debido a que se trata de un polímero natural éste se puede utilizar para cubrir los frutos con una especie de film semipermeable a los gases para permitir los intercambios gaseosos de los frutos. Un beneficio adicional que presenta es que crea

una atmósfera modificada alrededor del fruto enriquecida en CO₂ y reducida en O₂, cuyos niveles dependen de la permeabilidad a los gases metabólicos de la lámina de quitosán, de la actividad respiratoria del fruto y de la temperatura de almacenamiento.

El quitosán es adicionalmente un potente activador de fitoalexinas y de proteínas PR, tales como quitinasas, quitosanasas y p-1,3-glucanasas. Por ello, esta sustancia presenta *a priori* unas propiedades indiscutibles para aumentar la resistencia de los tejidos vegetales contra las enfermedades y aumentar la supervivencia comercial y la calidad de las frutas y hortalizas durante su almacenamiento. Las fitoalexinas y las PRs hidrolizan los principales componentes de la pared celular de las hifas.

Los estudios realizados en pimiento han demostrado que el quitosán es capaz de causar serios daños a las hifas de *B. cinerea* e interfiere en la capacidad del hongo de sintetizar poligalacturonasas. Estos enzimas provocan la maceración de los tejidos del hospedero porque degradan la pectina y la celulosa, componentes básicos de las paredes celulares de las células vegetales (El Ghaouth *et al.*, 1997).

Esta sustancia se ha probado aplicada a los cultivos; por ejemplo, en plantas de fresa cv. Seascape, que se pulverizaron con 2, 4 o 6 g L⁻¹ de quitosán en dos aplicaciones distanciadas 10 días. Los frutos de fresa cosechados se inocularon con *B. cinerea* y se almacenaron a 3 o 13°C. El tratamiento durante la cosecha con quitosán redujo significativamente las podredumbres de los frutos almacenados. La incidencia de podredumbres disminuyó con el aumento de la concentración del producto e incrementaron con la duración del almacenamiento y la temperatura (Narayanasamy, 2006).

Se ha llegado a comparar efectos análogos de la cubierta de fresas y frambuesa con quitosán a los que presenta el tratamiento con tiabendazol. En efecto, fresas y frambuesa tratadas con quitosán y almacenadas a 13°C controló las podredumbres de las bayas por *B. cinerea* y *R. stolonifer* al mismo nivel que este potente fungicida de síntesis. Adicionalmente, la lámina de quitosán tuvo efectos beneficiosos en mantener la firmeza, la acidez, antocianinas y el contenido en vitamina C de las fresas y frambuesas almacenadas a 4°C (Zhang y Quantick, 1998, citados por Narayanasamy, 2006).

La inducción de enzimas líticos en tratamientos a base de quitosán de productos frescos cosechados permite aumentar la resistencia a las podredumbres. La persistencia de los enzimas defensivos en los tejidos vegetales por la activación del quitosán, permite contribuir a retrasar la reactivación de las infecciones quiescentes. Por todo ello, esta sustancia es una de las más importantes para ser utilizada en el aumento de la resistencia de tipo químico de las plantas, por ello merece la pena la investigación en este campo y se ofrece como una alternativa que puede que sea muy eficaz en la reducción o eliminación de los fungicidas de síntesis.

4.1.4.2.3.- Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos capaces de reducir las podredumbres por aumentar la resistencia de las frutas y hortalizas. Dentro de este grupo podemos incluir el dieno. La lipoxigenasa es capaz de oxidar el dieno, perdiendo su efecto en la resistencia. La actividad de este enzima es regulada por la epicatequina, un antioxidante natural. El tratamiento con baño a diferentes dosis con antioxidantes: α -tocoferol, butil-hidroxitolueno, butyl-hidroxianisol y tert-butilhidroquinona, realizados a discos de frutos de aguacate, inhibió la actividad lipoxigenasa, retardando de este modo la degradación del dieno, esencial en el control de la antracnosis de estos frutos (Barkai-Golan, 2001).

Existen en el mercado ciertos formulados a base de antioxidantes que son utilizados para retardar las oxidaciones de los compuestos fenólicos de las frutas y hortalizas, que producen pardeamientos, y para aumentar la resistencia. Estos preparados no están muy extendidos, por lo que da una idea que su efectividad a veces está cuestionada y su uso no garantiza el control de las podredumbres. Nuevamente, debemos añadir que su uso, en principio debe ser complementario a la utilización de los métodos de control de enfermedades más potentes para el control de las enfermedades e las plantas: los fungicidas sintéticos.

Por último, los antioxidantes previenen la conversión de las infecciones quiescentes a activas; un proceso normal que ocurre durante la maduración de los frutos y reducen la resistencia a las enfermedades.

4.1.4.2.4.- Ácido salicílico

La respuesta hipersensible HR previene, como se ha comentado anteriormente la colonización de los tejidos por parte del patógeno, pero adicionalmente, la infección localizada puede inducir el aumento de la resistencia de la planta contra otras infecciones que pudieran producirse. Este fenómeno se conoce como sistema adquirido de resistencia. Mientras estos mecanismos son activados durante el ataque de un patógeno, el sistema de proteínas PR es activado, por ejemplo los enzimas p-1,3-glucanasas y las quitinasas. Las PR pueden ser también estimuladas por heridas en el tejido o por otros tipos de estreses que mimetizan la acción del patógeno aunque no existan patologías en ese momento. El ácido salicílico es un compuesto natural que es ya considerado como PGS u hormona vegetal (Arteca, 1996) que es capaz de inducir tales proteínas, incluso en ausencia del organismo patógeno. Se trata de un compuesto fenólico extendido por todo el reino vegetal, una de las razones que debe cumplir para que sea considerado como una PGS. La presencia de ácido salicílico endógeno en las plantas aumenta la resistencia de éstas contra el ataque de los patógenos. Por ello, la aplicación exógena de ácido salicílico ha sido estudiada con el fin de evaluar el aumento de la resistencia de las plantas. Algunos científicos han usado aspirina (ácido acetilsalicílico) en lugar de ác. salicílico, puesto que en un sistema acuoso, el ácido acetilsalicílico se hidroliza rápidamente a ác. salicílico. Sin embargo, la aspirina no se ha encontrado en las plantas como un producto natural. En esta línea, la aplicación

exógena de ácido salicílico o aspirina induce la formación de proteínas PR en las hojas de algunas plantas (Barkai-Golan, 2001). No hay información en relación al efecto producido por estas dos sustancias en los frutos después de cosechados, en otras palabras, no se ha correlacionado la aplicación de estas sustancias con la aparición de proteínas PR. También se ha demostrado que el ác. salicílico puede actuar como un inhibidor de la biosíntesis de etileno bloqueando la conversión de ACC (ác. 1-aminociclopropano-1-carboxílico) a etileno, por tanto, la maduración de los frutos. Los estudios realizados con la aplicación de ác. salicílico a frutos de tomate han puesto de manifiesto que esta hormona favorece la expresión de los genes del ACC, especialmente en frutos dañados. Por ello, como inhibidor de la síntesis de etileno, este ácido podría actuar aumentando la resistencia de los tejidos antes de su maduración.

4.1.4.2.5.- Calcio

Se ha correlacionado el calcio (Ca) con la resistencia a las enfermedades de tal manera que el uso de las técnicas que aportan Ca a las plantas dotan, al mismo tiempo, de mayor resistencia a las enfermedades a ciertas alteraciones fisiológicas (podredumbre apical de sandías, tomate, pimiento, etc., necrosamiento marginal de la lechuga, etc.) u a los estreses en general.

Los tratamientos de calcio se pueden aplicar en el cultivo o en postcosecha. Los tratamientos precosecha de Ca reducen las pérdidas causadas por *Gloeosporium* spp. en manzanas, mientras que los tratamientos postcosecha en frutos de manzana reducen las podredumbres ocasionadas por *Penicillium expansum*. Sin embargo, la aplicación de Ca directamente a los frutos y hortalizas en forma de sal de calcio como el cloruro cálcico (CaCl_2) es más efectiva en aumentar la resistencia a las podredumbres siempre que se aplique efectuando un vacío en el recinto de aplicación, con el fin de favorecer la absorción de este mineral (Narayanasamy, 2006). En este sentido, la infiltración de CaCl_2 redujo las podredumbres ocasionadas por *B. cinerea* en manzanas y en uva de mesa inhibiendo la actividad poligalacturonasa del patógeno (Chardonnet *et al.*, 2000, citados por Narayanasamy, 2006).

Otros resultados favorables obtenidos en el control de la podredumbre gris por el tratamiento con Ca se han obtenido en racimos completos de uva, cuyo efecto fue la reducción de los ataques de *B. cinerea*. Un incremento del contenido de celulosa en las paredes celulares y en protopectina lleva asociado una estabilización de la estructura de estas paredes que inducen a un aumento de la resistencia contra *B. cinerea* (Narayanasamy, 2006).

El calcio induce resistencia en órganos almacenados a las enfermedades en postcosecha por la interacción entre ciertos componentes de la pared celular y los iones de Ca. El mecanismo de resistencia de los tejidos asociado con el Ca reduce la tasa de maceración de las paredes celulares por un mejoramiento en la integridad estructural de estas paredes de las células vegetales. Además, el Ca inhibe la actividad poligalacturonasa a concentraciones muy bajas (Narayanasamy, 2006).

Martínez *et al.* (2011b), reportaron que la aplicación *in vitro* de CaCl_2 a varios aislados de *B. cinerea* obtenidos de plantas ornamentales modificaron, de una manera dependiente del aislado, las características fenotípicas del hongo relacionadas con la tasa de crecimiento, masa del micelio, número de esclerocios y conidiogénesis.

4.1.4.2.6.- Laminarina

La laminarina es un polisacárido a base de glucosa y manitol de reserva que acumulan las algas feófitas (algas pardas): Esta sustancia puede reforzar la resistencia contra *B. cinerea* en la uva porque incrementa la actividad quitinasa e induce a la producción de dos potentes fitoalexinas: reveratrol y ϵ -viniferina. En efecto, la aplicación de laminarina a uva redujo las podredumbre gris en un 55% (Narayanasamy, 2006).

4.1.5.- Modificación genética de las plantas

4.1.5.1.- Plantas transgénicas resistentes a enfermedades

Otra de las estrategias empleadas es la creación de plantas resistentes, lo que resulta bastante difícil, ya que aún no se conocen los genes principales de resistencia contra *Botrytis*. Sin embargo, se están obteniendo algunos resultados esperanzadores, como los de Hain *et al.* (1993), quienes lograron transformar células de tabaco con un gen estilbenosintasa de uva, aumentando la resistencia de la planta frente a *B. cinerea*. Se han desarrollado plantas resistentes que expresan genes propios de organismos utilizados en biocontrol (Carstens *et al.*, 2003), genes de otras plantas implicados en el desarrollo de mecanismos de defensa (Tabei *et al.*, 1997), etc. También, se ha descrito en plantas el fenómeno conocido como silenciamiento génico post-transcripcional y su posible aplicación, a largo plazo, en la obtención de variedades resistentes (Wesley *et al.*, 2001). Sin embargo, la aplicabilidad en los campos de cultivo de estas plantas modificadas todavía necesita ser valorada con exhaustividad.

La transformación genética de las plantas por introducción de caracteres para mejorar en comportamiento durante el cultivo, incrementar el tamaño o mejorar la resistencia de enfermedades no es un concepto nuevo. Los métodos clásicos de mejora con el fin de obtener nuevas variedades que transmitan las características deseadas se lleva haciendo desde hace muchos años, es decir, los métodos clásicos de mejora vegetal. Sin embargo, estos métodos clásicos de mejora son lentos e inexactos porque a menudo los patógenos mutan más rápidamente que lo que el desarrollo de los planes de mejora. Las técnicas de bioingeniería dan la oportunidad de modificar las plantas creando plantas transgénicas que presentan una elevada resistencia a determinados patógenos de una manera mucho más rápida y eficaz que los métodos clásicos de mejora.

Una planta transgénica contiene dentro de su genoma un ADN de otra especie que ha sido introducido artificialmente por ingeniería genética. Incluye la introducción

de genes de resistencia a enfermedades. Esta tecnología no sólo permite aumentar la diversidad genética sino también poder añadir múltiples y diversos genes de resistencias a una determinada variedad de plantas. De hecho, la creación de nuevas variedades de plantas que contengan genes de resistencia a enfermedades está considerada como la principal estrategia en un plan de lucha contra las enfermedades de fitopatología y, a corto plazo, es el procedimiento único para eliminar los fungicidas de síntesis.

Los genes diana más deseados para crear plantas transgénicas se aíslan de virus, bacterias, hongos y de otras plantas, dependiendo del carácter deseado que se quiera transmitir. Se utilizan mucho los genes que inhiben el crecimiento de los hongos que son inducidos tras el comienzo de la colonización de un hongo en una planta (Barkai-Golan, 2001). Sin embargo, la selección de genes diana beneficiosos para conseguir la resistencia del patógeno requiere un gran conocimiento de éste, del hospedero y de las interacción entre ellos. Conocimiento que se alcanza tras una larga investigación en genética y fisiología.

El desarrollo de variedades genéticamente resistentes a las enfermedades en postcosecha es considerado como el principal objetivo para combatirlas. Sin embargo, el principal obstáculo para alcanzar este objetivo es pérdida de la durabilidad de la resistencia. Esto es debido a la presión que ejerce los patógenos los cuales tienden adaptarse a las nuevas situaciones (Narayanasamy, 2006).

En apartados anteriores se ha puesto de manifiesto que la resistencia de los aguacates cosechados contra la antracnosis, radica en buena parte a la síntesis y acumulación del compuesto denominado dieno. La resistencia contra esta enfermedad radica en mantener los niveles de dieno sintetizados lo más elevados que sea posible y la principal estrategia para ello es retardar la maduración, ya que este compuesto disminuye drásticamente durante este proceso y, adicionalmente, potenciar su síntesis. Se ha comprobado que la inoculación de aislados mutantes no patógenos de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causante de la enfermedad, incrementan los niveles de dieno, por los que los mutantes no patógenos del hongo contribuyen a aumentar los mecanismos de defensa contra la enfermedad, alargando el período quiescente del patógeno sobre la superficie de los frutos.

La mayoría de los estudios genéticos de *Botrytis* han sido realizados en *B. cinerea* (Beever y Weeds, 2004). El desarrollo de las técnicas de genética molecular a partir de 1980 ha tenido un papel revolucionario en el entendimiento de las estrategias patógenas de *Botrytis* spp. Esto ha permitido, por primera vez, la identificación inequívoca de genes de patogenicidad y de virulencia y, por tanto, la habilidad para definir moléculas diana para desarrollar nuevos fungicidas y la posibilidad de generar plantas resistentes a la enfermedad. Desde la primera exitosa transformación de *B. squamosa* (Huang *et al.*, 1989, citados por Elad *et al.*, 2004), se han estudiado las herramientas moleculares y las técnicas de este campo para adaptarlas a los requerimientos especiales de *Botrytis* spp. De hecho, las investigaciones realizadas en este campo han aumentado exponencialmente en los

últimos años, especialmente en el campo de inactivación de genes diana y el análisis funcional de todos los factores de patogenicidad identificados en todo el conocimiento que se tiene ya en relación a la bioquímica, fisiología y datos genéticos de las últimas décadas. Es *Botrytis* spp. se han identificado 45 genes relacionados con la patogenicidad (Tudzynski y Siewers, 2004). Sin embargo, sólo unos pocos genes candidatos “clásicos” han sobrevivido al riguroso muestreo molecular de los últimos años, con resultados inesperados.

4.1.5.2.- Fuentes de genes para la bioingeniería de plantas

Los primeros genes candidatos para mejorar la resistencia de las plantas fueron puntualizados por Mount y Berman (1994), citados por Barkai-Golan (2001), a partir de compuestos naturales que se conocían sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas contra hongos fitopatógenos o bacterias. Sin embargo, las plantas transgénicas con introducción de genes capaces de producir antibióticos presentan un gran problema y es que esto permite el desarrollo rápido de cepas resistentes a esos antibióticos.

Las quitinasas y las p-1,3-glucanasas son muy efectivas en hidrolizar las paredes celulares de los hongos. Se han identificado genes que codifican estas proteínas y se ha introducido el gen de la quitinasa en plantas de tabaco y de colza aumentando la resistencia contra *Rhizoctonia solani*, pero no contra *Cercospora nicotianae*. Esta conclusión sugiere que además de la quitinasa, hay otros factores que intervienen en la respuesta.

Un estudio posterior ha demostrado que la resistencia a las enfermedades fúngicas puede ser altamente favorecida con en plantas transgénicas que contienen los genes de la quitinasa y de la glucanasa al mismo tiempo (Zhu *et al.*, 1994, citados por Barkai-Golan, 2001). Otros genes han sido estudiados para su introducción en plantas transgénicas, como son los genes de la peroxidasa (Barkai-Golan, 2001).

El conocimiento y entendimiento de la etiología de las enfermedades postcosecha y de su fisiología es una estrategia fundamental para ayudar a la selección de nuevos genes que permitan desarrollar nuevas plantas transgénicas resistentes a las enfermedades en postcosecha. Para este proceso es fundamental alcanzar un gran entendimiento en la comprensión de los mecanismos de defensa que se inducen tras una herida, ya que la patología postcosecha está muy relacionada con la fisiología de los tejidos dañados. En este sentido, Eckert y Ratnayake (1994), promovieron la alteración genética de las plantas para hacerlas fisiológicamente más resistentes a los daños mecánicos o favorecer la síntesis de compuestos cicatrizantes. Del mismo modo, el mayor entendimiento de la actividad enzimática de la degradación de las paredes de las hifas de los hongos puede ser una buena herramienta para la creación de nuevas plantas transgénicas para las que la capacidad de producir poligalacturonasa (PG) (capacidad para degradar las paredes celulares de los vegetales) por parte del patógeno pueda ser suprimida. Stotz *et al.* (1993), estudiando la capacidad de la inhibición proteica de las PGs en peras, sugirió que estos frutos promueven la expresión de genes que se traducen en la inhibición de *B. cinerea*. La caracterización

del inhibidor de estas proteínas permitiría desarrollar por ingeniería genética nuevas plantas capaces de controlar la podredumbre gris por inhibición de la síntesis de PG. De hecho, Powell *et al.* (1994), reportaron que los frutos de tomate transgénico que expresan el gen de las glicoproteínas inhibidoras de la PG de la pera, fueron más resistentes a la podredumbre gris que los frutos controles.

4.1.5.3.- Manipulación de la biosíntesis de etileno

La importancia del etileno como hormona de la maduración en la aceleración de la maduración y la senescencia de los frutos cosechados y sus efectos sobre el acortamiento de la supervivencia comercial se ha convertido en uno de los principales objeto de estudio en postcosecha con el fin de disminuir todos sus efectos adversos de las frutas, hortalizas y flores durante la conservación. Entre las soluciones ofrecidas, está la de utilizar técnicas que puedan prevenir la producción de etileno o la de conseguir un mutante que no sea capaz de producir etileno y que sólo pueda madurar cuando es sometido a una fuente externa de esta hormona.

El conocimiento de la ruta de síntesis del etileno en plantas es una ventaja a la hora de encontrar mecanismos que puedan inhibir o manipular la síntesis de esta hormona en un punto determinado de su ruta biosintética. La forma más eficiente para prevenir la síntesis de etileno en frutos de tomate consiste en la inhibición de la ACC (ác. 1-aminociclopropano -1-carboxílico), el precursor inmediato del etileno, por medio de la técnica antisentido para anular el gen de la ACC sintetasa. Esta función permite inhibir casi por completo la síntesis del ACC sintetasa y se obtienen mutantes de plantas de tomate con frutos que no maduran. Si se utilizan plantas de tomates en las que la síntesis de los enzimas formadores de etileno ha sido inhibida por la utilización de genes antisentido, se ha demostrado que el grado de inhibición de la maduración depende del estado de desarrollo que presentan los frutos al ser cosechados. Este efecto es más claro si los frutos se cosechan antes del estado pintón. Entonces, si se aplica etileno a estos frutos la maduración no se produce porque falla, entre otros procesos la producción de licopeno que da el color rojo al tomate.

Otra forma de alterar genéticamente la biosíntesis de etileno fue reportada por Klee *et al.* (1991), quienes introdujeron un gen bacteriano que codifica un enzima que metaboliza el ACC en plantas de tomate. Como resultado de este proceso, se produce una inhibición de la acumulación del ACC y reducción de la producción de etileno con una consecuencia marcada en la inhibición de la maduración de los frutos de tomate.

La inhibición de la síntesis de etileno por manipulación genética, no solo tiene consecuencias beneficiosas en el alargamiento de la supervivencia comercial de los frutos, sino también presenta un efecto indirecto en el desarrollo de las podredumbres que van estrechamente ligada con los procesos de maduración y senescencia. La relación entre el estado de madurez y la resistencia de los frutos cosechados a las enfermedades en postcosecha está probablemente asociada con la pérdida de la habilidad de los tejidos maduros de producir compuestos defensivos y barreras estructurales. Adicionalmente, el patógeno es capaz de producir y activar enzimas

pectinolíticos solamente durante la maduración del fruto, momento en que puede descomponer las paredes celulares de las células vegetales degradando los tejidos.

Se han realizado estudios a nivel genético encaminados a fortalecer directamente la resistencia de los frutos (Barkai-Golan, 2001). Esto puede ser conseguido en un sistema hospedero-patógeno en el que un gen de resistencia en la planta responde específicamente a un gen de virulencia del patógeno, por ejemplo en el sistema gen a gen. Tales interacciones han sido descritas para varios pares de planta-patógeno. La susceptibilidad a la enfermedad en un sistema hospedero-patógeno en el que uno de los dos genes, el de resistencia de la planta o el de virulencia del patógeno está ausente durante la interacción, Las plantas de tomate ofrecen ventajas para clonar genes de resistencia sobre la base de su posición en el mapa genético. Dado que el tomate ha sido sometido a estudios de mejora genética durante más de 50 años, muchos de sus loci que confieren resistencia a varios hongos, bacterias y virus han sido identificados.

Los progresos alcanzados en el conocimiento de las respuestas inducidas en las plantas y su regulación, junto con la revolución en genómica y proteómica, prometen replantear la investigación en este campo para encaminarla hacia la explotación predecible de los mecanismos de resistencia endógena. Para comprender las interacciones planta-microorganismo-insecto en la naturaleza y en los ecosistemas agrícolas, se requiere mayor información sobre la fisiología y la genómica de los insectos y sobre su genética poblacional. Una información que revestirá particular interés para reducir la velocidad a la cual los insectos herbívoros adquieren tolerancia natural a las plantas transgénicas.

5. APLICACIÓN *in vitro* DE LAS BACTERIAS *Bacillus subtilis* Y *B. velezensis* Y DEL HONGO *Trichoderma harzianum* EN EL CONTROL DEL CRECIMIENTO DE DISTINTOS AISLADOS DE *Botrytis cinerea* OBTENIDOS DE PLANTAS ORNAMENTALES

CAPÍTULO 5. APLICACIÓN *in vitro* DE LAS BACTERIAS *Bacillus subtilis* Y *B. velezensis* Y DEL HONGO *Trichoderma harzianum* EN EL CONTROL DEL CRECIMIENTO DE DISTINTOS AISLADOS DE *Botrytis cinerea* OBTENIDOS DE PLANTAS ORNAMENTALES

5.1. Introducción y antecedentes.

5.1.1. *Bacillus subtilis*

Históricamente, *B. subtilis* era un término dado a todos los bacilos aeróbicos que formaban endosporas. Este organismo fue una de las primeras bacterias estudiadas, fue nombrado como *Vibrio subtilis* en 1835 y renombrado *Bacillus subtilis* en el año 1872. Fue descubierta accidentalmente por soldados alemanes durante la 2ª Guerra Mundial, debido al gran número de muertes en soldados por disentería, tras estudios se descubrió esta bacteria en estiércol de camello (Espinosa, 2005).

B. subtilis es un microorganismo autóctono del suelo que prospera en la naturaleza, donde se encuentra ampliamente distribuido en muy diversos hábitats y los cuales ha colonizado eficientemente debido a sus cualidades, entre las cuales podemos mencionar; el tener un programa genético que le permite formar esporas, crecer en un amplio rango de temperaturas, la capacidad de moverse, mostrar velocidades de crecimiento altas, producir enzimas hidrolíticas extracelulares y una variedad de antibióticos. Es una de las 40 especies reconocidas del género *Bacillus*, su identificación es sencilla: forma esporas termoresistentes, es catalasa y Voges-Proskauer positivo, su crecimiento en agar anaeróbico (agar nutritivo) es negativo y la hidrólisis del almidón es positiva (Slepecky y Hemphill, 1992). Se ha propuesto una subdivisión sobre la base de diferencias en la composición química de la pared celular, su distribución geográfica y la frecuencia de transformación homo y heterogámica. *B. subtilis* subsp. *subtilis* nov. (NRRL NRS-744, ATCC 6051, cepa Marburg) y *B. subtilis* subsp. *spizizenii* nov. (NRRL B-23049), las cepas derivadas de la 168 y otras similares se agrupan junto con la especie tipo en el primer grupo y las derivadas de la cepa W23 y relacionadas en el segundo. La cepa 168 es ampliamente usada en la industria para la obtención de productos comerciales (Ferrari, *et al.*, 1993), además esta cepa es competente natural, es decir que en ciertas condiciones incorpora ADN foráneo de manera natural (Anagnostopoulos y Spizizen, 1960), lo cual facilita la manipulación genética, las estrategias de biología molecular con esta cepa y fue utilizada para secuenciar el genoma de *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997). En el presente estudio se trabajó con una cepa derivada de la 168, cuyo nombre comercial se describirá en la sección de Materiales y Métodos.

B. subtilis es una bacteria Gram positiva, aeróbica con capacidad de diferenciarse y formar endosporas. Estos microorganismos son bacilos móviles, células individuales o se agrupan en pequeñas cadenas. La temperatura de crecimiento oscila entre 15 a 55 °C, reducen el nitrato a nitrito, e hidrolizan almidón y caseína

(Nakamura, *et al.*, 1999). En medios complejos con glucosa o nitrato se observa un crecimiento anaeróbico restringido (Sneath, 1986).

Existen diversos trabajos relacionados con la capacidad inhibitoria de cepas de *B. subtilis* frente a bacterias fitopatógenas como *E. carotovora* y *R. solani* en patata (Carrión, 2007), o el biocontrol del moho en la calabaza amarga (*Momordica charantia* L) durante la germinación de sus semillas (Yang, 2011) y otros como la evaluación en invernadero de *Bacillus subtilis* AP-01 y *Trichoderma harzianum* AP-001 en enfermedades de tabaco controladas (Maketon, 2007).

5.1.2. *Bacillus velezensis*

Bacillus velezensis es un aislado encontrado en el río Vélez en Torre del Mar, Málaga (España). Los datos genómicos y fenotípicos demostraron que *B. velezensis* representa una nueva especie de *Bacillus* (Ruiz-García *et al.*, 2005).

Según el Centro Regional, las cepas: 17467T (CR-502T5LMG 22478T) y la CR-14b tenían idénticas secuencias de genes 16S rRNA. Estas cepas comparten un 99% de similitudes con *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (Nakamura *et al.*, 1999), *Bacillus amyloliquefaciens* (Priest *et al.*, 1987) y *Bacillus vallismortis*. Un 98% de similitud con *Bacillus* (Roberts *et al.*, 1996), *B. mojavensis* (Roberts *et al.*, 1994) y *Bacillus atrophaeus* (Nakamura, 1989). Ambas cepas se caracterizan por su capacidad para producir ácidos a partir de glucógeno, lactosa, algunos glucosidos y rafinosa. También puede producir β -galactosidasa (determinado por la reacción ONPG), pero no hidrolasa la arginina (Ruíz *et al.*, 2005).

Bacillus velezensis es una bacteria aerobia, Gram positiva de 0,5 x 1,5-3,5 μ m de tamaño. Se producen individualmente o en parejas, llegando en ocasiones a formar cadenas. Sus endosporas son elipsoidales y son bacterias móviles mediante flagelos. Son capaces de crecer en concentraciones de NaCl de hasta el 12%, con una temperatura que puede ir entre los 15^o y los 45^oC y a unos valores de pH entre 5 y 10 (Ruíz *et al.*, 2005).

Se ha descrito que *B. velezensis* afecta al crecimiento de *Botrytis cinerea* en tomate (Fernández *et al.*, 2010).

5.1.3. *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum se encuentra en diferentes materiales orgánicos y suelos. Este hongo está adaptado a diferentes condiciones ambientales, lo que facilita su amplia distribución. Algunas especies prefieren localidades secas y templadas y otras templadas y frías (Seaby, 1996). La mayoría de especies de *Trichoderma* se ha descrito en Norteamérica y Europa.

Dentro de la especie *T. harzianum* se han diferenciado cuatro formas biológicas: Th1, Th2, Th3 y Th4 (Seaby, 1996; Chen *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000; Castle *et al.*, 1998; Doyle, 1991). Esto es debido a que dentro de esta especie, los principales criterios para su diferenciación son el tamaño de las fiálides, forma y distribución pero éstas varían mucho en los agregados y entre las especies.

La temperatura óptima para su crecimiento linear en agar y producción de micelio está entre 20 y 28°C, aunque crece bien entre 6 y 32°C. El contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es del 92% y para su esporulación es de 93 al 95%. Tiene cierta respuesta a la luz, especialmente azul y violeta. La luz promueve la formación de esporas, el crecimiento de micelio y la coloración (Hidalgo, 1989; Domsch *et al.*, 1993).

Existen diversos trabajos relacionados con la capacidad inhibitoria *T. harzianum* frente a *B. cinerea* en vid (Memenza, 2009) o en fresa (Leonelli, 2006).

5.2. Materiales y métodos.

5.2.1. Material experimental

Los aislados de *Botrytis cinerea* se obtuvieron de una colección que dispone el laboratorio de Producción Vegetal de la UPCT. Fueron recogidos entre los años 2006 y 2007 de plantas ornamentales de un vivero comercial que estaban afectadas por “Botrytis blight”, situado cerca de la ciudad de San Pedro del Pinatar, Murcia (España). Estos aislados se obtuvieron de las especies de plantas de *Pelargonium x hortorum* LH Bailey (geranio), *Lantana camara* L. (Lantana), *Lonicera japonica* Thunb. (madreselva), *Hydrangea macrophylla* Ser. (Hortensia) y *Cyclamen persicum*. Mill (Cyclamen) (Martinez *et al.*, 2008) (Fig. 5.1).



Figura 5.1. Plantas en maceta afectadas por Botrytis en el sureste de España. (a) *L. camara*, (b) *L. japonica*, (c) *C. persicum*, (d) *P. x hortorum*, (e) *H. macrophylla* (Fuente: Martínez *et al.*, 2008).

Como se ha comentado en el párrafo anterior, estos aislados son conservados en el laboratorio de fitopatología de la UPCT. Se purificaron en su día, a partir de cultivos monospóricos y se identificaron como se describirá más adelante. Cada tres

meses, los aislados son repicados y se mantienen en nevera sobre medio de cultivo sólido de PDA.

Para reconstituir los aislados para utilizarlos en nuestros experimentos; es decir, la obtención de las placas madre de partida, se tomaron fragmentos cuadrados de hifas somáticas de cada una de las placas de la colección de aislados y se sembraron en el centro de placas Petri, dentro de una cabina de flujo laminar, dejándolos crecer posteriormente durante cinco días en una estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad.

En este estudio se justificaron genéticamente los aislados de *Botrytis* y se identificaron las especies con PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Para ello, se procedió a obtener el ADN de un subcultivo realizado en medio de cultivo de agar de patata y dextrosa en los laboratorios de patología vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Se realizaron cinco extracciones, pertenecientes a cada uno de los cinco aislados de *Botrytis*. Las muestras preparadas se enviaron al laboratorio SECUGEN S.L. de Madrid donde secuenciaron (los resultados se exponen en la Fig. 5.2). Este análisis se hizo sólo para comprobar la identificación morfológica de los aislados porque no hubo repeticiones.

Los aislados y las enfermedades que causaron fueron identificados de acuerdo con Daughtrey *et al.*, 2001 y por medio de la secuencia de genes específicos de la especie. Con este último fin, para comprobar la identificación morfológica de los aislados, se analizó por PCR la región ITS (“Internal Transcribed Spacers”, espacios de transcripción interna) del ADN ribosomal. El análisis de las secuencias de nucleótidos obtenidas resultaron homólogas a las siguientes secuencias depositadas en la base de datos del GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), con su correspondiente código de acceso (ver también Fig. 5.2) (hay que tener en cuenta que el análisis de los aislados se realizó conjuntamente con varios aislados de especies patógenas de *Penicillium* – ver Fig. 5.2):

Botrytis sp. HQ166555.1

B. fuckeliana HM849615.1

B. fuckeliana HM849047

Botrytis sp. UASWS0444

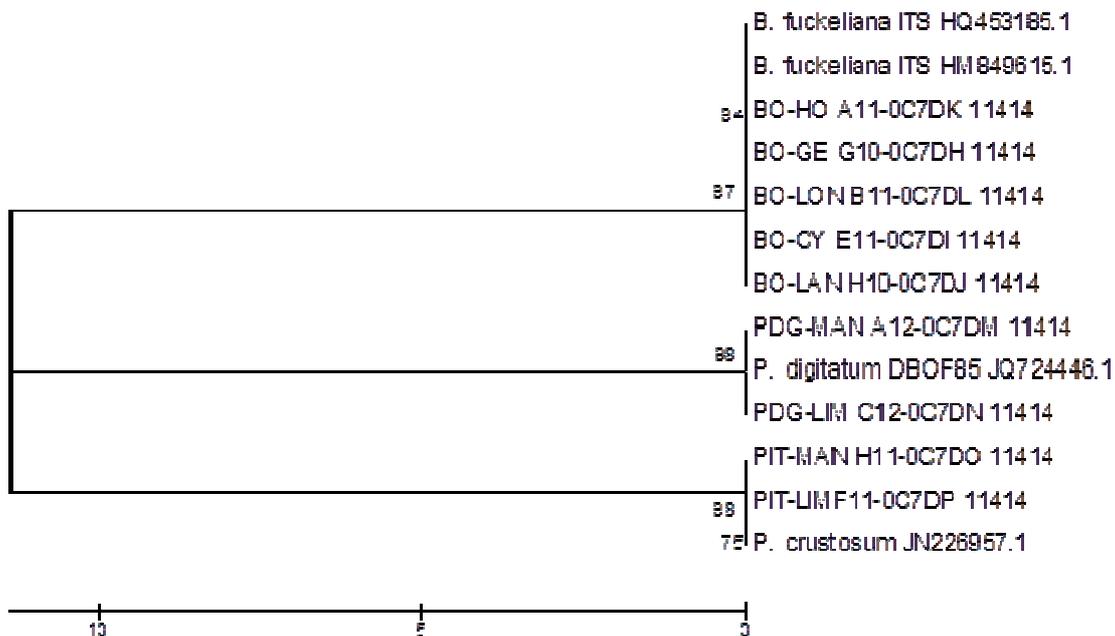


Figura 5.2: Árbol filogenético inferido en la región ITS (espacios de transcripción interna) del ADN ribosomal (ITS, 5.8S e ITS2) de los hongos *Botrytis* y *Penicillium* aislados de diferentes plantas y frutos (Programa: MEGA 4; Método: UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average); Bootstrap: 2000 réplicas).

ITS: Espacios de transcripción interna del ADN ribosomal. (región del genoma analizada). BO: *Botrytis*, LON: Loniceria; HO: Hortensia, LAN: Lantana, GE: Geranio, CY: Cyclamen. PIT: *Penicillium italicum*, LIM, Limón, MAN: Mandarina, PDG: *Penicillium digitatum*. DBOF85 JQ724446.1 y JF772180.1: Código de acceso en el GenBank database, NCBI, de los hongos homólogos a los aislados de laboratorio.

Tal y como se observa en la Fig. 5.2., encontramos una buena correlación entre la clasificación fenotípica y genética para las especies bien definidas.

Como potenciales antagonistas del crecimiento de los aislados de *Botrytis*, se utilizaron dos cepas de dos distintas especies de *Bacillus*: *B. velezensis* obtenida del producto comercial Botrybel suministrado por Probelte (Murcia) y *B. subtilis* obtenida del producto comercial Larminar suministrado por Agrimor (Madrid).

Para reconstituir la especie bacteriana de *B. velezensis* a partir de Botrybel, se procedió a añadir 10 µL de Botrybel a un tubo de ensayo con 10 mL de agua peptonada (Scharlab®). Tras su agitación, se sembró haciendo estrías por la técnica del agotamiento del asa en placas Petri conteniendo medio sintético de agar de recuento total (PCA, Scharlab®), en las cuales se desarrolló la bacteria tras 24 horas de incubación en estufa a 25°C ± 2°C. De esta placa se sembró, finalmente en estría, la placa madre que se dejó incubar a 25°C ± 2°C durante 48 horas.

El modo de obtención del cultivo activo de *B. subtilis* fue igual que el anteriormente citado, con la salvedad de que partíamos de un producto, Larminar, en

polvo. En este caso a los 10 mL de agua peptonada se le añadió la pequeña parte que se tomó al poner en contacto un asa de siembra con el producto.

En los dos casos se realizaron diluciones sucesivas en agua peptonada con el fin de diluir lo suficiente las bacterias para obtener colonias aisladas a partir de los productos comerciales.

Ambas bacterias fueron chequeadas al microscopio de contraste de fases, para comprobar la presencia de endosporas que se vieron al cabo de cuatro días de crecimiento, como cuerpos esféricos-ovalados brillantes bajo contraste de fases.

También se experimentó como antagonista al hongo *Trichoderma harzianum* procedente del producto Trianium-P, comercializado por la empresa Koppert (Almería, España).

Para la reconstitución del hongo a partir del producto comercial se realizó el siguiente procedimiento: a partir de Trianium-P, tocamos con un asa de siembra el producto para obtener conidios. A continuación, se preparó una batería de diluciones con agua destilada y Tween 80 al 0,01% hasta la -5. El siguiente paso fue sembrar cada una de las diluciones en PDA e incubar las placas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. Transcurrido este tiempo nos quedamos con la dilución -2, para la obtención de la placa madre, ya que, en esta placa se observaban colonias aisladas. Finalmente, del margen de una de las colonias se tomó un fragmento cuadrado de $1\text{-}2\text{ mm}^2$ y se colocó sobre PDA en el centro de la placa. Tras 72 horas de incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ se obtuvo la placa madre.

Todas las placas madres, es decir, las placas de los microorganismos antagonistas reconstituidos a partir de sus respectivos productos comerciales fueron conservadas mediante refrigeración a 4°C . A partir de ellas se hicieron las réplicas cada vez que se iban a utilizar para un experimento.

5.2.2. Tratamientos

Se comprobó la acción antagónica de los microorganismos bacterianos en medio de cultivo de agar de recuento total (PCA) en placas Petri. Para ello, en la cabina de flujo laminar, se sembró la bacteria mediante una línea alejada del centro de la placa, con un asa de siembra flameada y, a las 48 horas, se tomó un fragmento de 1-2 mm de cada uno de los aislados de *Botrytis* cortado del margen de la colonia y se colocó en un punto equidistante a la bacteria. Las placas se incubaron en una estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 5 días. Se realizó el mismo procedimiento para ambas bacterias.

También se comprobó si *B. cinerea* y *T. harzianum* eran capaces de crecer juntos en placas Petri que contenían medio de cultivo PDA. Para ello, se colocó un fragmento de 1-2 mm de *T. harzianum* cortado del margen de la colonia del hongo crecido en PDA durante 5 días a 25°C y a las 24 horas se tomó un fragmento de 1-2 mm de *B. cinerea*

cortado del margen de la colonia del hongo crecido en PDA durante 5 días a 25°C y se colocó en un punto equidistante a *B.cinerea*. Las placas se incubaron en una estufa a 25°C ± 2°C en oscuridad durante 5 días.

La aplicación *in vitro* de las bacterias *B. subtilis* y *B. velezensis* y del hongo *T. harzianum* para el control del crecimiento de distintos aislados de *Botrytis cinerea* se realizaron en los laboratorios de Producción Vegetal de la ETSIA de la UPCT.

5.2.3. Unidad de observación y número de repeticiones.

Las unidades de observación fueron las placas Petri. Las observaciones de las interacciones se hicieron cada día de forma visual, captando el aspecto de cada una de las placas con una fotografía. También se midió el área de crecimiento de *Botrytis* diariamente con la aplicación de un software fotográfico que se describirá más adelante.

Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento, es decir, cada confrontación de cada uno de los aislados de *Botrytis* con el antagonista (*B.subtilis*, *B. velezensis* y *T. harzianum*). Los resultados se compararon con los controles o testigos, los cuales solo contenían el aislado de *Botrytis* sin antagonista alguno.

Cada repetición se consideró que tuvo el valor estadístico de réplica. Pero hay que matizar que, aunque se obtuvo cuatro repeticiones de las variables medidas extraídas de cuatro unidades experimentales por tratamiento constituidas por cuatro placas de Petri independientes, en sentido estricto, estas repeticiones deben considerarse submuestras, más que réplicas, de acuerdo con Hammer (1981) porque no se maximiza el error experimental. Este error está minimizado, ya que todas las placas de cultivo se llenaron a partir del mismo medio de cultivo, se sembraron a partir de la misma colonia de cada uno de los aislados y se incubaron en la misma incubadora.

5.2.4. Definición, tipo y clasificación de las variables.

Las variables consideradas para valorar el efecto de los antagonistas sobre el desarrollo de los distintos aislados de *B. cinerea* se definen a continuación:

Área de crecimiento de la colonia (cm²). Representa el área de la colonia desarrollada medida a intervalos diarios sobre la misma colonia (medidas repetidas). Esta medida se realiza generalmente como el diámetro de la colonia, pero consideramos que el diámetro de una colonia no caracteriza totalmente el crecimiento en los casos en los que la colonia no tenga un hábito de crecimiento totalmente circular. La medición del área de la colonia se realizó, previa calibración con el diámetro de la placa Petri, con fotografía digital de ésta y posterior análisis en el software Image Tool for Windows, versión 3.0 (Texas, EE.UU.). Esta variable es de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

Inhibición del crecimiento (%). Representa el efecto del antagonista sobre el desarrollo del hongo en función del crecimiento de éste cuando las sustancias retardadoras o inhibidoras segregadas por el antagonista no están presentes. Se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 1:

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A}{A_{\text{control}}}$$

donde,

A_{control} : Área media de la colonia del tratamiento testigo, es decir, sin antagonista (cm^2),

A : Área media de la colonia de *B. cinerea* confrontado con un antagonista (cm^2).

Es una variable de tipo cuantitativa continua de acuerdo con la escala de medidas y de tipo resultado o dependiente de acuerdo con el diseño del protocolo.

5.2.5. Establecimiento de la hipótesis.

Una hipótesis es una idea basada en un conjunto de conocimientos plausibles acerca de un problema o pregunta, por su naturaleza se trata de una conjetura o idea acerca de la posible relación entre dos o más fenómenos observables o variables. Una hipótesis estadística es una presunción acerca de parámetros de una población y el test estadístico de la hipótesis es la utilización de datos procedentes de una muestra para asumir o rechazar una presunción acerca de la población. Las hipótesis definen las características del plan de trabajo a desarrollar y el tipo de test estadístico que ha de ser utilizado para su aceptación o rechazo.

En el primer punto del presente capítulo se ha estudiado y puesto de manifiesto que ciertas especies de *Bacillus* y el hongo *Trichoderma harzianum* pueden influir en el crecimiento y desarrollo de ciertos hongos. Los experimentos que se van a desarrollar a continuación están planeados para poner de manifiesto ese posible efecto y poder medirlo sobre diversos aislados de *B. cinerea* obtenidos de la podredumbre gris de las siguientes plantas ornamentales: *Pelargonium x hortorum* (geranio), *Lantana camara* (Lantana), *Lonicera japonica* (madreselva), *Hydrangea macrophylla* (Hortensia) y *Cyclamen persicum*. (Cyclamen) (un aislado por planta). Con esto último se pretende poner de manifiesto si la respuesta depende del aislado.

Por lo anteriormente dicho, las hipótesis que se pretenden contrastar fueron las siguientes:

1.- Las especies bacterianas de *Bacillus subtilis* y *B. velezensis* y el hongo *Trichoderma harzianum* ejercen influencia sobre el crecimiento *in vitro* de los distintos aislados de *B. cinerea*.

2.- Los aislados de *B. cinerea* obtenidos de distintas especies de plantas ornamentales responden de manera distintas a las especies antagonistas utilizadas.

El análisis de estas hipótesis va a ser fundamental para establecer la eficacia de estos microorganismos antagonistas en el control de la podredumbre gris de plantas ornamentales. Evidentemente, el hecho de tener un efecto beneficioso *in vitro* no quiere decir que sea extrapolable a obtenerlo *in vivo*, lo que sí es evidente es que tras este experimento se podrá evaluar el efecto fungicida o fungistático como tal de los antagonistas ensayados.

5.2.6. Análisis estadístico.

Dado que las hipótesis que se quieren contrastar, definen las características del plan de trabajo que se quiere trazar, hay que tener en cuenta que una de las hipótesis planteadas incluye el efecto del aislado de *B. cinerea* sobre la respuesta que tienen los microorganismos antagonistas sobre su crecimiento. Evidentemente sólo partimos de un aislado por planta; si bien, son bastantes significativos porque se obtuvieron de diferentes especies de plantas, hecho que puede aumentar la posible variabilidad entre los aislados. Esto significa que el alcance de las conclusiones no va a ser crucial a la hora de caracterizar a la población de aislados de *B. cinerea* de plantas ornamentales. Es por ello, por lo que se ha optado a realizar un análisis básico de los datos utilizando para ellos los estadísticos de la media aritmética como medida de centralización y la desviación estándar como medida de la dispersión. La utilización del ANOVA o análisis de la varianza se ha evitado fundamentalmente porque el tamaño de la muestra no es elevado ($n=4$) y la falta del concepto réplica como tal que permitiría poner de manifiesto diferencias significativas cuando no las hay (Hammer. 1981). El error se minimiza también, dado que las medidas de las áreas se tomaron de las mismas colonias en función del tiempo, es decir, es un caso de diseño de medidas repetidas. En este caso se requeriría otro tipo de análisis ANOVA, el denominado ANOVA de medidas repetidas. Las medidas repetidas, en su amplio sentido, se refiere a la situación en la cual se realizan medidas múltiples de la variable respuesta obtenida de las mismas unidades de observación. En efecto, la unidad observación es la placa Petri conteniendo al hongo en crecimiento y la variable respuesta es el tamaño de la colonia sembrada en esa placa. Las medidas se toman a intervalos diarios sobre la misma placa, es decir, es un claro caso de medidas repetidas. El objetivo fundamental de un análisis de medidas repetidas es reducir el vector de múltiples medidas de cada unidad de observación a un único valor. De esta manera, una respuesta multivariable se reduce a una única respuesta univariable. De esta manera, el único valor a que es reducido el vector de múltiples medidas se denomina estadístico resumen o estadístico propiamente dicho. En nuestro caso el estadístico resumen será el

promedio de cada valor tomado, calculando a su vez la desviación estándar de cada uno de los resultados obtenidos.

Atendiendo al diseño del protocolo y la hipótesis a considerar, podemos definir que el experimento consta de las siguientes variables independientes controladas o factores: aislado (5 niveles) y antagonista (3 niveles).

Los análisis estadísticos se realizaron mediante hojas de cálculo usando el programa Microsoft Excel, con el fin de representar los datos gráficos de la evolución del crecimiento de los hongos medido como superficie (cm²).

5.2.7. Protocolo de las mediciones.

De la placa madre de *B.velezensis* conservada en refrigeración a 4°C, se obtuvo una réplica de la misma. Para ello, en la cabina de flujo laminar, se procedió a la siembra en estría de dicha bacteria, en medio de cultivo de agar de recuento total (PCA) y se dejó incubar a 25°C ± 2°C durante 48 horas. Tras su crecimiento, se procedió al montaje de la experiencia. Para ello, se sembró la bacteria mediante una línea alejada del centro de la placa, con un asa de siembra flameada. Se sembraron cuatro repeticiones por aislado a estudiar más el control.

El mismo procedimiento se siguió para el caso de *B.subtilis*.

Tras reconstruir *T. harzianum* y obtener la placa madre se obtuvo una réplica de la misma para esta experiencia. Para ello, en la cabina de flujo laminar, se tomó del margen de la placa madre un fragmento cuadrado de 1-2 mm² y se colocó sobre PDA en el centro de la placa. Tras 72 horas de incubación a 25°C ± 2°C se obtuvo dicha réplica. Tras su crecimiento, se procedió al montaje de la experiencia. Para ello, se tomó un fragmento cuadrado de 1-2 mm² y se colocó sobre PDA en un lateral de la placa. Se realizaron cuatro repeticiones por aislado a estudiar más el control.

A partir de aquí el modo de ejecución es el mismo independientemente del antagonista. Las placas se dejaron reposar no menos de 15 horas dentro de la cabina de flujo para proceder a la inoculación del aislado de *B. cinerea* anteriormente purificado y aislado. Para ello se partió de cultivos de los diferentes aislados realizados a partir de los iniciales de los frutos o de las placas origen que se conservaban en el frigorífico. Entonces se depositó una pequeña porción de cultivo del hongo cortada asépticamente del borde de la colonia crecida de cinco días a 25°C con un bisturí en un punto equidistante del antagonista, sembrado previamente en la placa nueva (subcultivo). Todo este procedimiento se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, para asegurar la máxima asepsia en el trabajo, y después se depositaron las placas en la incubadora a 25°C durante los días necesarios hasta que el tratamiento testigo creció cerca del borde de la placa. Las placas se sacaban de la incubadora por pocos minutos para apuntar las observaciones y medir el tamaño de la colonia (proceso rápido porque se hizo con un montaje fotográfico). Para llevar a cabo la toma de

medidas, se midió el tamaño de cada colonia, los días dos y siete del experimento, tomando fotos para luego medir el área con el programa informático Image Tool 3.0.

Para la representación de los gráficos de evolución de crecimiento se tomó el valor medio por día de las cuatro repeticiones (submuestras en este caso) y se representó la desviación estándar de la medición por medio de una barra vertical pasando por el valor medio. Tanto para esta variable como para la inhibición del crecimiento, se elaboraron tablas con cada uno de los valores medios y su desviación estándar.

5.3. Resultados y discusión.

Se realizaron enfrentamientos (confrontaciones) en la misma placa Petri entre los distintos aislados de *B. cinerea* y *T. harzianum* o las dos especies de *Bacillus*, también se realizaron siembras por separado.

5.3.1. Aislado de *B. cinerea* obtenido de *Lonicera japonica*- *T. harzianum*.

En la Figura 5.3 se presentan las fotos más representativas de este ensayo.

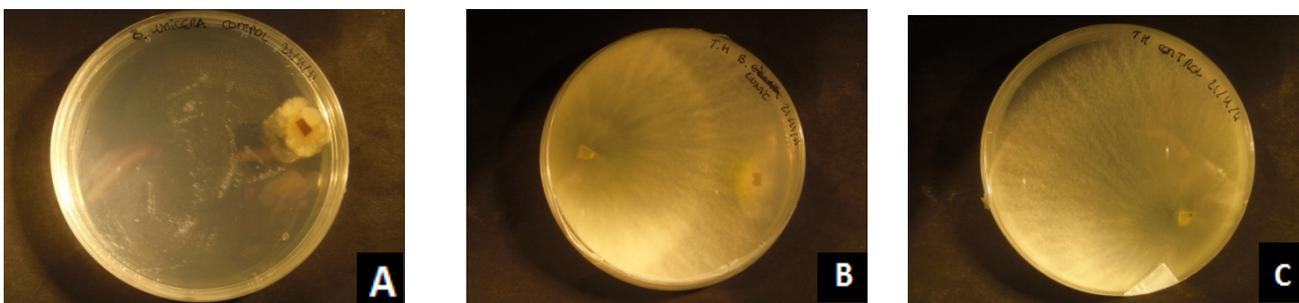


Figura 5.3: Fotografías tomadas 72 h después de la siembra de *L. japonica* (A), *L. japonica* contra *T. harzianum* (B); y *T. harzianum* (C).

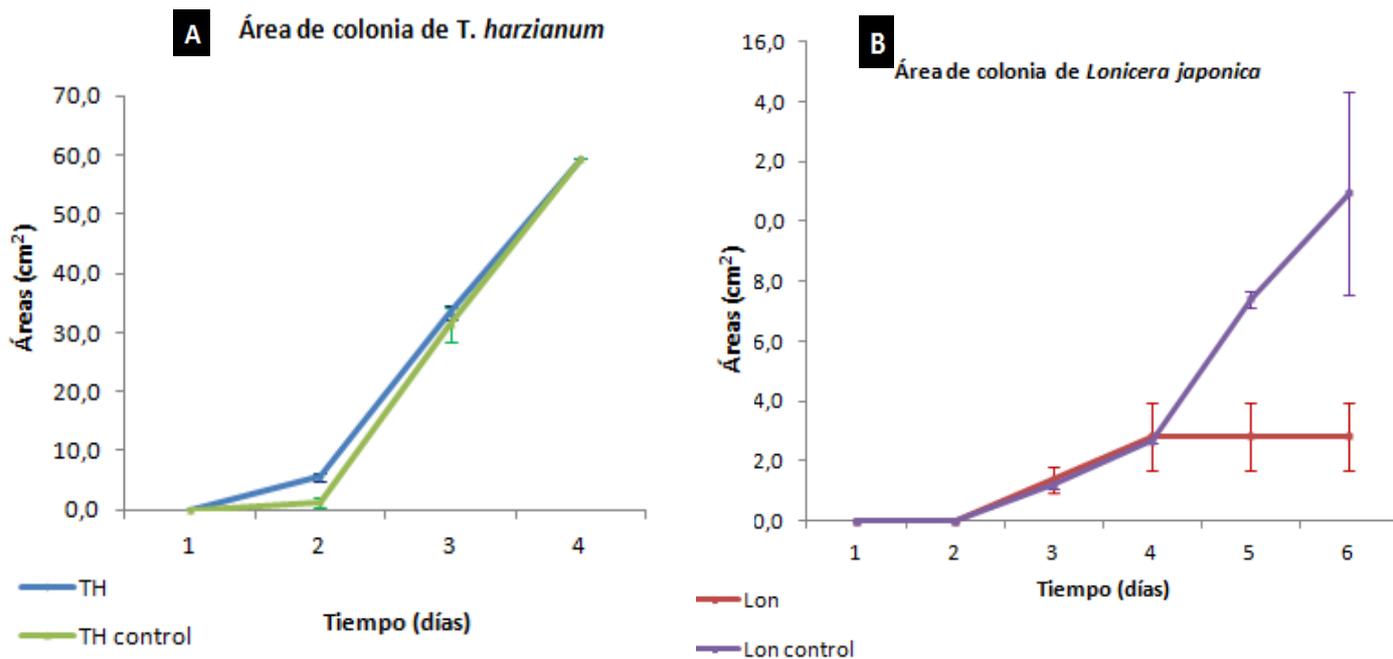


Figura 5.4: (A) (B) Áreas de las colonias de *T. harzianum* y *Lonicera japonica* cuando se enfrentan.

La Figura 5.4A muestra el área de crecimiento de *T. harzianum* enfrentada al aislado de *B. cinerea* obtenido de *Lonicera japonica*, así como su control (sin confrontar con *Botrytis*). La figura 5.4B muestra el área de crecimiento del aislado de *B. cinerea* obtenido de *Lonicera japonica* enfrentada *T. harzianum*, así como su control (sin confrontar con el antagonista). La tendencia de crecimiento es similar en la primera gráfica, pero cambia en la segunda con respecto al control. Esto indica que existe una alteración en el crecimiento del aislado obtenido de *Lonicera* en presencia de *T. harzianum* a partir del cuarto día ya que se detiene su crecimiento en comparación con el control.

5.3.2. Aislado de *B. cinerea* obtenido de *Cyclamen persicum* - *T. harzianum*.

En la Figura 5.5 se presentan las fotos más representativas de este ensayo.

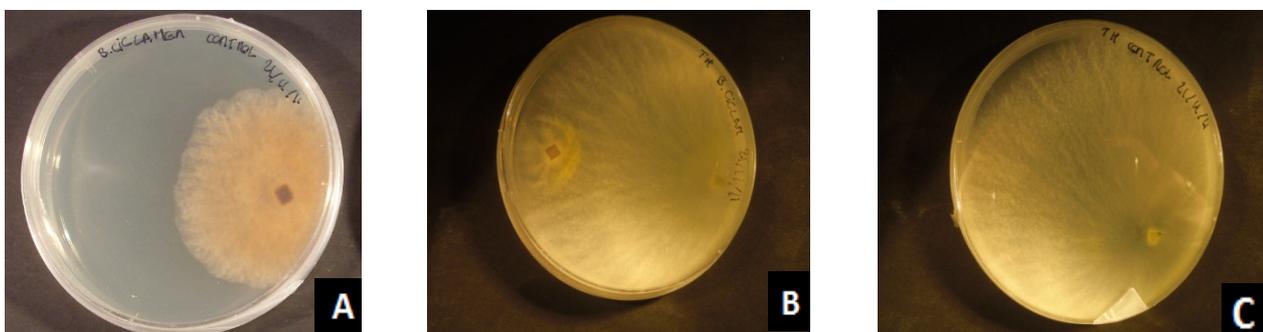


Figura 5.5: Fotografías tomadas 72 h después de la siembra de *C. persicum* (A), *C. persicum* contra *T. harzianum* (B); y *T. harzianum* (C).

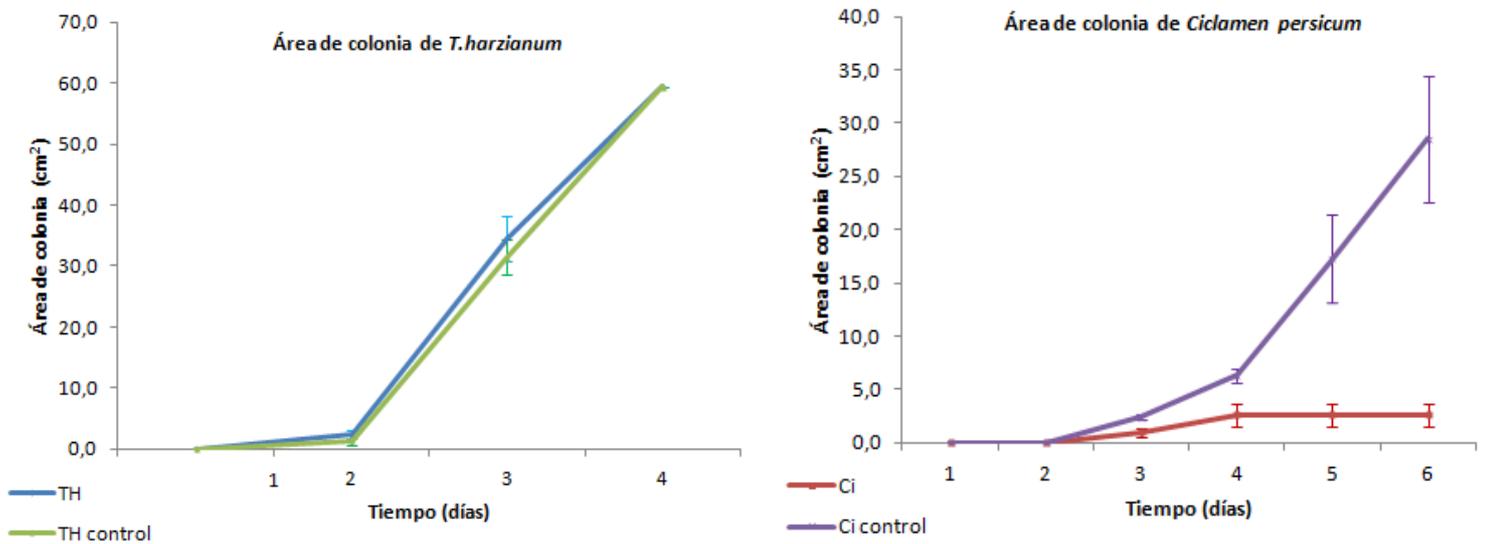


Figura 5.6: (A) (B) Áreas de las colonias de *T. harzianum* y *Cyclamen persicum* cuando se enfrentan.

La Figura 5.6A muestra el área de crecimiento de *T. harzianum* enfrentada *Cyclamen persicum*, así como su control. La figura 5.6B muestra la tasa de crecimiento *Cyclamen persicum* enfrentada *T. harzianum*, así como su control. La tendencia de crecimiento cambia en el crecimiento de *Cyclamen* a partir del tercer día.

Si lo comparamos con el resultado anterior la presencia de *T. harzianum* afecta antes a *Cyclamen* que a *Lonicera* ya que se adelanta un día el efecto sobre la tasa de crecimiento.

5.3.3. Aislado de *B. cinerea* obtenido de *Hydrangea Macrophylla*- *T. harzianum*.

En la figura 5.7 se presentan las fotos más representativas de este ensayo.

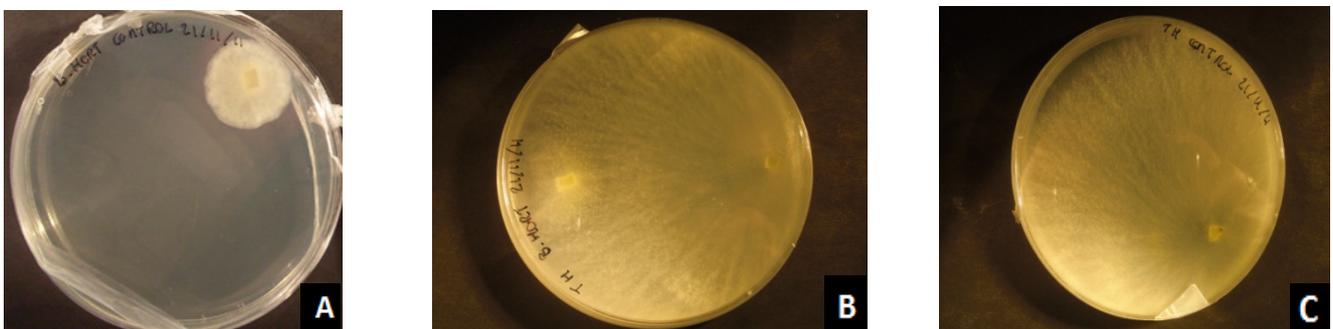


Figura 5.7: Fotografías tomadas 72 h después de la siembra de *H. macrophylla* (A), *H. macrophylla* contra *T. harzianum* (B); y *T. harzianum* (C) sembrados por separado.

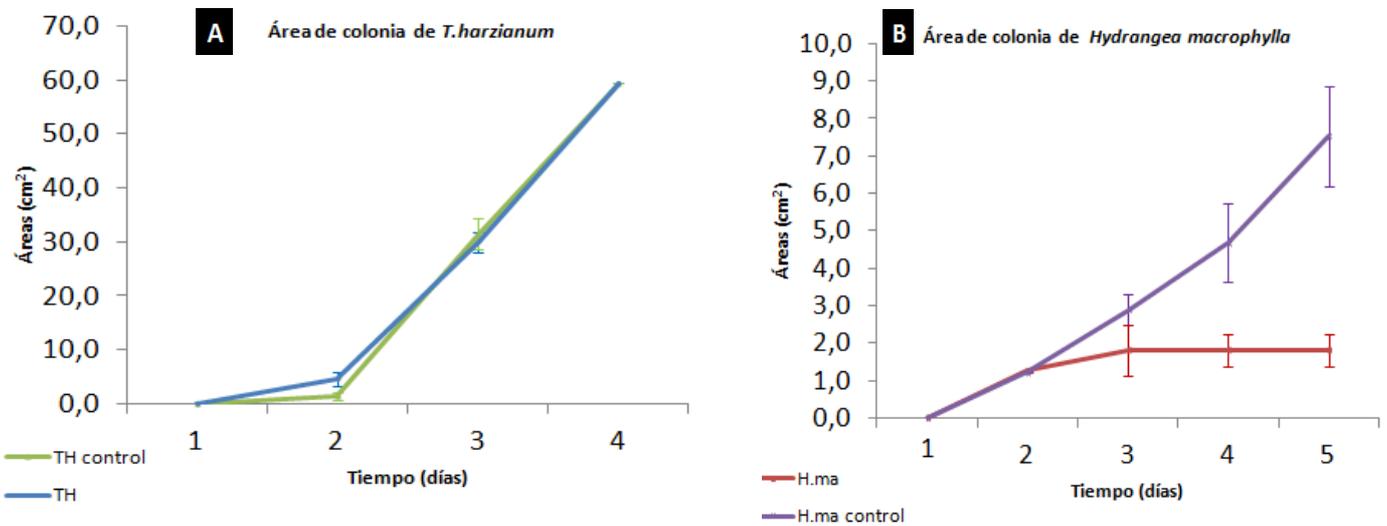


Figura 5.8: (A) (B) Áreas de las colonias de *T. harzianum* y *Cyclamen persicum* cuando se enfrentan.

La figura 5.8A muestra la tasa de crecimiento de *Hydrangea Macrophylla* enfrentada *T.harzianum*, así como su control. La figura 5.8B muestra la tasa de crecimiento *Cyclamen persicum* enfrentada *T.harzianum*, así como su control. La tendencia de crecimiento cambia en el crecimiento de *Cyclamen* a partir del tercer día.

Si lo comparamos con los resultados anteriores la presencia de *T. harzianum* afecta de igual modo a *Cyclamen* que a *Hortensia* ya que a partir del tercer día cambia la tasa de crecimiento, en comparación con *Lonicera* que experimentaba el cambio un día después.

5.3.4. Aislado de *B. cinerea* obtenido de *Lantana cámara* - *T. harzianum*.

En la figura 5.9 se presentan las fotos más representativas de este ensayo.



Figura 5.9: Fotografías tomadas 72 h después de la siembra de *L.camara* (A), *L.camara* contra *T. harzianum* (B); y *T. harzianum* (C) sembrados por separado.

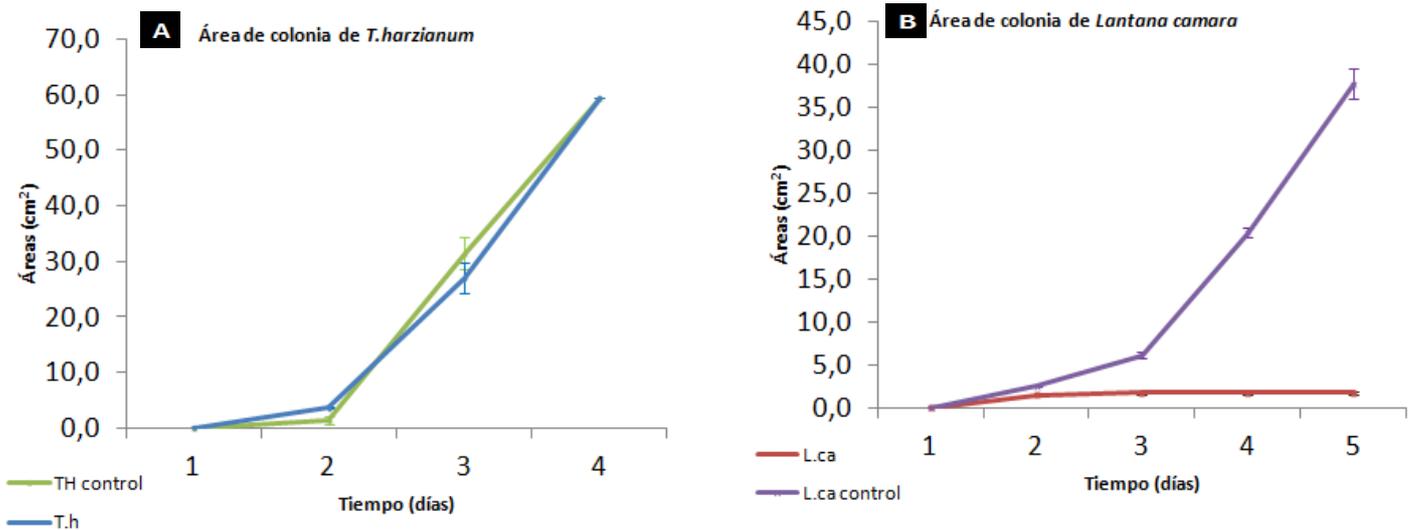


Figura 5.10: (A) (B) Áreas de las colonias de *T. harzianum* y *L. camara* cuando se enfrentan.

La figura 5.10A muestra la tasa de crecimiento de *Lantana camara* enfrentada *T.harzianum*, así como su control. La figura 5.10B muestra la tasa de crecimiento *lantana camara* enfrentada *T.harzianum*, así como su control. La tendencia de crecimiento cambia en el crecimiento de lantana a partir del tercer día.

Si lo comparamos con los resultados anteriores la presencia de *T. harzianum* afecta de igual modo a *Cyclamen*, *Hortensia* y *Lantana* ya que a partir del tercer día cambia la tasa de crecimiento, en comparación con *Lonicera* que experimentaba el cambio un día después.

5.3.5. Aislado de *B. cinerea* obtenido de *Pelargonium x hortorum* - *T. harzianum*.

En la figura 5.11 se presentan las fotos más representativas de este ensayo.



Figura 5.11: Fotografías tomadas 72 h después de la siembra de *P. x hortorum* (A), *P. x hortorum* contra *T. harzianum* (B); y *T. harzianum* (C) sembrados por separado.

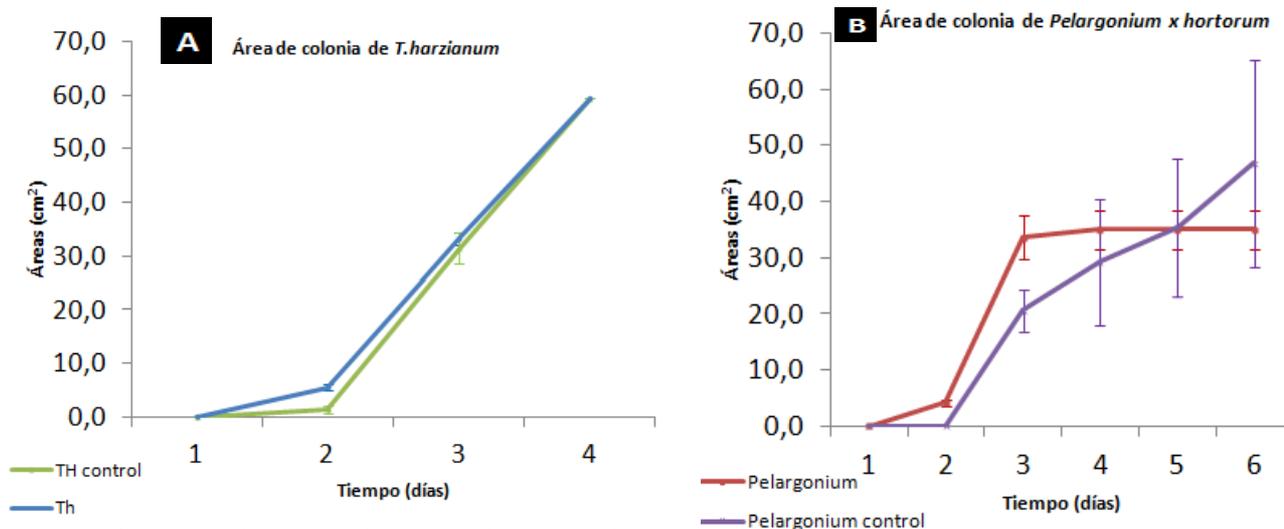


Figura 5.12: (A) (B) Áreas de las colonias de *T. harzianum* y *P. x hortorum* cuando se enfrentan.

La figura 5.12A muestra la tasa de crecimiento de *Pelargonium* enfrentada *T.harzianum*, así como su control. La figura 5.12B muestra la tasa de crecimiento *Pelargonium* enfrentada *T.harzianum*, así como su control. La tendencia de crecimiento cambia en el crecimiento de lantana a partir del tercer día.

Si lo comparamos con los resultados anteriores la presencia de *T. harzianum* afecta de igual modo a *Cyclamen*, *Hortensia* y *Lantana* ya que a partir del tercer día cambia la tasa de crecimiento, *Lonicera* experimentaba el cambio un día después y sin duda a *Geranio* es al que más afecta ya que su tasa de crecimiento no tiene nada que ver con la de su control.

5.3.6. Aislados de *B. cinerea* frente a *B. subtilis* y *B. velezensis*.

Se realizaron enfrentamientos de *B. subtilis* y *B. velezensis* frente a los distintos aislados de *Botrytis*. Solamente se obtuvieron resultados comparativos para el aislado obtenido de *Lonicera japonica* ya que en el resto de cultivos la bacteria se expandió con mucha facilidad no permitiendo el desarrollo del hongo.

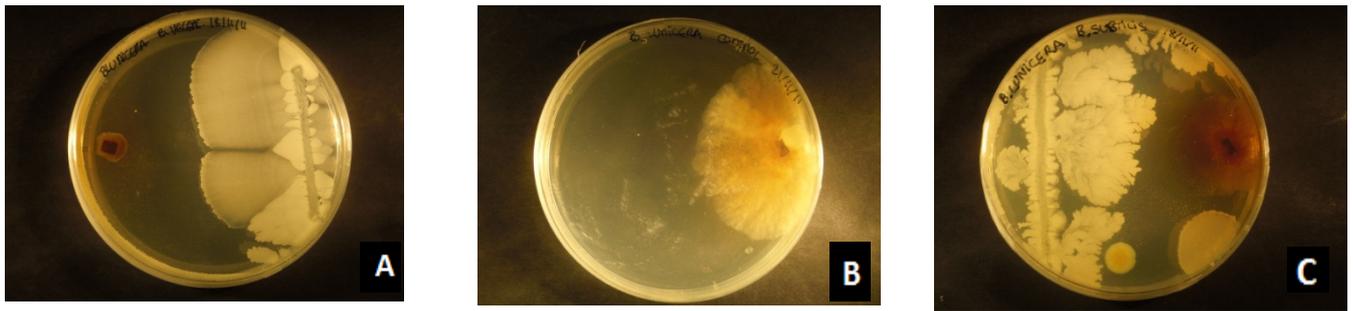


Figura 5.13: Fotografías tomadas el día 5 después de la siembra de *B. cinerea*, se observa: *B. velezensis*-*B. cinerea* (A); Control (B); *B. subtilis*-*B. cinerea* (C).

En la tabla 5.1, se presenta la evolución del área de *B. cinerea* a los 2, 3, 4 y 5 días después de la confrontación con las bacterias preseleccionadas por el buen control de los patógenos.

Tabla 5.1: Diferencias entre el área crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*.

Tratamientos	Día 2		Día 3		Día 4		Día 5	
	Área (cm ²)	Inhibición (%)						
Lonicera control	1,4 ± 0,4 ^z	–	2,8 ± 1,1	–	2,8 ± 1,1	–	2,8 ± 1,1	–
Lonicera- <i>B. subtilis</i>	0,9 ± 0,3	24,43 ± 25,7	1,9 ± 1,3	33,8 ± 43,1	2,8 ± 2,7	2,5 ± 84,3	3,1 ± 3,1	8,2 ± 97,1
Lonicera- <i>B. velezensis</i>	0,6 ± 0,3	47,8 ± 28,6	1,0 ± 0,7	65,7 ± 22,8	1,4 ± 1,5	51,9 ± 46,1	1,4 ± 1,5	50,5 ± 48,6

^z los valores representan el promedio (n=4) ±desviación estándar

B. subtilis y *B. velezensis* inhibieron el crecimiento del aislado de *B. cinerea* obtenido de *Lonicera japonica*. El mayor porcentaje de inhibición se obtuvo con la combinación de *B. subtilis* y *Lonicera japonica* (67,5%), superando a su vez todos los días a *B. velezensis*-*Lonicera japonica*.

Un estudio similar es comparable con los resultados anteriores, en este estudio, cepas *B. subtilis* y *B. velezensis* se combinaron con aislados de *T. harzianum* (Balanza *et al.*, 2011). *B. subtilis* y *B. velezensis* inhibieron el crecimiento de *T. harzianum* y su mayor porcentaje de inhibición se obtuvo con la combinación de ambas bacterias (36,5%), En el caso de *B. velezensis*, el porcentaje de inhibición fue de 29,7%, mayor que el de *B. subtilis* (20%).

5.4. Conclusiones.

En el caso de *T. harzianum* frente a los distintos aislados de *Botrytis* se puede extraer como conclusión que no se produce el resultado esperado de forma que *Trichoderma* no consigue frenar el crecimiento de los distintos aislados. Sin embargo, el aislado de *B. cinerea* más afectado fue el obtenido de *Pelargonium* ya que sus áreas se modificaron totalmente en presencia de *Trichoderma harzianum*.

En el enfrentamiento de *B. subtilis* y *B. velezensis* con los distintos aislados de *Botrytis cinerea* se puede decir que *B. velezensis* tuvo más efecto que *B. subtilis*. Esta última bacteria formó canales de crecimiento (por formación de las denominadas formas L bacterianas) en la placa de PCA y se extendió más que *B. velezensis*. Por lo que tras los resultados obtenidos se tomó la determinación de realizar un segundo ensayo usando otro medio de cultivo distinto al PCA en el que pudieran crecer tanto la bacterias antagonistas como los hongos y que se pudiera ver frenada la formación de las formas L para evitar la formación de áreas irregulares y extrañas en las placas de cultivo. Se probó con el medio PDA y únicamente la bacteria *B. velezensis* que fue la que mejor resultados ha dado en este experimento.

8. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES.

Basándonos en que el control biológico usando microorganismos constituye una expectativa esperanzadora de futuro debido a su nula toxicidad para el medio ambiente y tras los estudios realizados con las bacterias *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis* y sus sustancias inhibitoras, y el hongo *Trichoderma harzianum* para el control de *Botrytis cinerea*, concluimos con lo siguiente:

- ❶ Los resultados mostraron que el control no fue efectivo para el caso de la aplicación *in vitro* del hongo *Trichoderma harzianum* frente a distintos aislados de *Botrytis cinerea* obtenidos de plantas ornamentales. Por lo que esto descarta totalmente el uso de *T. harzianum* para controlar a *B. cinerea*.
- ❷ En el enfrentamiento de *B. subtilis* y *B. velezensis* con los distintos aislados de *Botrytis cinerea* se puede decir que el efecto, en cuanto a desarrollo del hongo se refiere, fue entre un 20% y un 40% mayor para *B. velezensis*.
- ❸ *B. velezensis* creció mejor en PCA que *B. subtilis* ya que ésta formaba formas L que se expanden con alta velocidad sobre el medio.
- ❹ En el ensayo del estudio del efecto *in vitro* de *B. velezensis* en PDA, se obtuvo que la bacteria modificaba el área de crecimiento de todos los aislados de *Botrytis*.
- ❺ Además, también se vieron afectadas otras estructuras fúngicas, ya que en presencia de la bacteria, la masa micelial se redujo para todos los aislados. El número de conidios y su tamaño aumentó, a excepción del aislado de *L. japonica*, donde el número de conidios se redujo de forma considerable.
- ❻ En el estudio *in vitro* de las sustancias inhibitoras segregadas por *B. velezensis* en presencia o ausencia del hongo, frente a distintos aislados de *Botrytis*, en cuanto a porcentaje de inhibición se refiere, no se pudo sacar una única conclusión, ya que los resultados variaron en función del aislado y el tipo de tratamiento. Si las sustancias inhibitoras las segregó *B. velezensis* en presencia del hongo, el porcentaje de inhibición fue mayor para el caso del aislado de *L. japonica* y el de *H. macrophylla*, menor para el aislado de *C. persicum* e indiferente para el de *L. japonica*.
- ❼ En presencia de las sustancias inhibitoras, con indiferencia de su procedencia, aumentó la masa micelial, el tamaño de conidios en todos los aislados y también se incrementó el número de conidios por cm² a excepción del aislado de *H. macrophylla*, donde no se produjo conidiogénesis.

9. B I B L I O G R A F Í A

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abo, M. M. (1990).** Geranium (*Pelargonium*). Handbook of Plant Cell Culture Ornamental species. Ed. McGrawHill, New York. USA. 5, 439-460.
- Agrios, G. N. (1997).** Plant Pathology (4^a ed.). Ed. Academic Press, p. 635
- Agrios, G.N. (2010).** Fitopatología, 2^a ed., Ed. Limusa, p. 838.
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., Thonart, P. (2001).** Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. appl Biochem. Biotechnol, 91,551-561.
- Almandoz, J.; Pico, V. M.; Pérez, L.; Rodríguez, F.; Parra, J.(2000).** Efectividad de nuevos fungicidas para el control de *Alternaria solani* en el cultivo de la patata (*Solanum tuberosum*). XIX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP). La Habana.
- Alfonso, C., Raposo, R., Melgarejo, P. (2000).** Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. Plant Pathology 49, 243-251.
- Álvarez, M. (1982).** *Botrytis cinerea*: un antiguo problema de la vid. Investigación y Progreso Agropecuario, La Platina 12,17-19.
- Anagnostopoulos, C., Spizizen, J. (1961).** Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol.81, 741-745.
- Anderson, J. P. (1924).** *Botrytis cinerea* in Alaska. Phytopathology 14, 152-155.
- Antonov, A., Stewart, A., Walter, M. & Callaghan, M. O. (1997)** Inhibition of conidium germination & mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products. In: Proceedings of the Fiftieth New Zealand Plant Protection Conference. Lincoln University. Canterbury. New Zealand. 159-164.
- Apablaza, G., Díaz, M., San Martín, R y Moya, E. (2002).** Control de oídio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de quillay (*Quillaja saponaria*). Cien. Inv.. Agr. 29, 83-90.
- Arango, M. (2003).** *Hydrangea hortensia*. Ed. Hortitecnia Ltda. p.7-8; 21-24.
- Ardi, R., Kobiler, I., Jacoby, B., Keen, N.T., Prusky, D. (1998).** Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. Physiol. Mol. Plant Pathol., 53, 269-285.
- Armitage, A., Kaczperski, M. (1992).** Seed-propagated *geraniums* and *regal pelargoniums*. Production guidelines and future concerns, p.136.

Auld, B. A. and Medd, R. W. (1987). Weeds. An Illustrated Botanical Guide to the Weeds of Australia. Inkata Press, Melbourne. pp. 234-235.

Ávila, L. (1993). Control con microorganismos antológicos de *Botrytis cinerea* pers: Pontificia Universidad Javeriana de Ciencias. Tesis (Postgrado Microbiología), p. 109.

B

Badei, A.T.M., El-Akel, H.H., Morsi, P., Baruah, R.K., Sharma, R.S., Singh and A. Ghosh. (1996). Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. J. Essent. Oil Res. 8, 411-412.

Bailey, D.A., Weilier, T.C., Krik, T.I. (1986). Chemical stimulation of floral initiation in florist *hydrangea*. HortScience. 21:256-257.

Bailey, D.A., (1989). *Hydrangea* production. Timber Press. Portland, Oregon.

Baker, C., Bateman, D. (1978). Cutin degradation by plant pathogenic fungi. Phytopathol. 68, 1577-1584.

Bakker, F.T., Culham, A., Pankhurst, C.E., Gibby, M. (2000). Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (*Geraniaceae*). American Journal of Botany, 87 (5): 727-734.

Ballester et al., (1997). Forzado de floración en la Hortesia. Horticultura 119. pp. 13-18.

Barkai-Golan, R. (2001). Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Development and Control. Elsevier, Amsterdam, Holanda. 418 págs. Arteca, R.N. 1996. Plant Growth Substances. Principles and Applications. Chapman & Hall, New York, USA, p. 332.

Beever, R. E. & Weeds, P. L. (2004). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. Ed.: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands., 29-52.

Ben-Yehosua, S., Rodov, V., Kim, J.J., Carmeli, S. (1992). Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. J. Agric. Food Chem., 40,1217-1221.

Bennett, R. and Wallsgrove, K. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytol. 127, 617-633.

Benito, E., Arranz, M. y Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Rev. Iberoam. Micol. 17,43- 46.

Beth-Din, D., Berson, M. and Szejnberg, A. (1996). AQ 10, a biofungicida for the control powdery mildew of grapes. Phytoparasitica 24(2): 156-157.

Bettiol, W., and Stadnik, M. (2001). Controle alternativo de oídios. Edts. Stadnik, M. y Rivera, M. pp. 165-192.

- Bishop, C.D., Thornton, I.B. (1977).** Evaluation of the antifungal activity of the essential oils of *Monarda citriodora* var. *citriodora* and *Melaleuca alternifolia* on post harvest pathogen. *J. Essent. Oil Res.* 9, 77–82.
- Blakeman, J. & Fokkema, N. (1982).** Potencial for biological control of plant diseases on the Phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20, 167–192.
- Bonaventura, S.M., M.J. Piantanida, L. Gurini, and M.I. Sanchez-Lopez. (1991).** Habitat selection in population of cricetine rodents in the region Delta (Argentina) 55,339-354.
- Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D. and Osbourn A. (2002).** Fungal pathogenesis: Asaponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418 (6900): 889-92.
- Bove, C.P. (1993).** Systematic catalogue of arboreal plant pollen grains of southern Brazil: XXVII. Bombaceae, Caprifoliaceae, and Styracaceae. *Revista Brasileira de Biologia* 53, 87-101.
- Brickell, C. and J. D. Zuk. (1997).** The American Horticultural Society A-Z Encyclopedia of Garden Plants. DK Publishing, Inc., NY.
- Buckley, P. M., Sjaholm, V. E. & Sommer, N. F. (1966).** Electron microscopy of *Botrytis cinerea* conidia. *Journal of Bacteriology* 91, 2037-2044.

C

- Caiazza, N.A., Quinn, J.A. (1980):** Leaf morphology in *Arenaria patula* and *Lonicera japonica* along a pollution gradient. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107, 9–18.
- Calvo Vergés I (2001).** Geranio. *La Horticultura Española*. Ed. Nuez F, Llacer G. SECH, Madrid.pp.422-423.
- Carbu, M. (2006).** Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Departamento de Bioquímica y Biología molecular, Microbiología, Medicina preventiva y Salud pública, Fisiología y Genética. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Carrión, J. (2007).** Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* para biocontrolar *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* en cala (*Zantedeschia sp*) y *Rhizoctonia solani* Kühn en papa (*Solanum tuberosum* L). Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Agronomía.Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía. Universidad Austral de Chile.
- Carstens, M., Vivier, M. A. & Pretorius, I. S. (2003).** The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1-2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Research* 12, 497-508.
- Castle, A., Speramzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., Bisset, J. (1998).** Morphological and Molecular Identification of *Trichoderma* Isolates on North American Mushroom Farms, *Applied Environ Microbiol* 64 (1): 133-137.

- Chapagain, B., Wiesman, Z., and Tsrer (Lahkim), L. (2007).** *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Ind. Crops Prod.*
- Chase, R., (2000).** Preventing and controlling *Botrytis Blight* on Greenhouse Ornamental Plants. *Clery's Hort Talk*. Volume 7, issue 1.
- Chen, X., Romaine, P., Ospina-Giraldo, M.D., Royse, J. (1999).** A polymerase reaction-based test for the identification of *Trichiderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mould epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiol Biotechnol.* 51, 572-578.
- Chen, H., Wang, L., Su, C.X., Gong, G.H., Wang, P., Yu, A.L. (2008).** Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* 47, 180-186.
- Clapham, A.R., T.G. Tutin and E.F. Warburg. (1962).** *Flora of the British Isles*. Cambridge University.
- C.O.A.G. (2009).** *Planta Ornamental y Flor cortada. Análisis Agroganadero. Anuario Agrario.*
- Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. a. & Jarvis, W. R. (1980).** *The Biology of Botrytis*. Ed.: Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. And Jarvis, W. R. Academic Press.London.
- Conn, B. J. (1992).** Review of the declaration of *Lantana* species in New South Wales. Ed. S. Jonson. Department of Primary industries. New South Wales University, p.9.
- Conn, B. J. (1993).** Verbenaceae. In *Flora of New South Wales*. Ed. G. J. Harden. New South Wales University Press, Kensington, New South Wales. 153(3): 611-618.
- Cotoras, M., García, C., Mendoza, L. (2009).** *Botrytis cinerea* isolates collected from grapes present different requirements for conidia germination. *Mycologia*, 101(3):287-295.
- Craig R (1993).** *Breeding geraniums for 2000 and beyond. The grower's manual.* Ed. White J. Ball Publishing, Geneva. USA. (4): 373-388.

D

- Dardari, Z., Boudouma, M., Sebban, A., Bahloul, A., Kitane, S., Berrada, M. (2004)** 1 Phenyl-3-toluyl-4-[ortho-1'-(N-ethyl-2'-methylpropylamine)] phenylpyrazole, synthesis and evaluation of the in vitro antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. *Il farmaco* 59:673-678.
- Daughtrey, M.L., Wick, R.L., Peterson, J.L. (2001).** *Plagas y enfermedades de las plantas en maceta con flores*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, p. 90.
- Day, M. D., Wiley, C. J., Playford, J. and Zalucki, M. P. (2003).** *Lantana: Current management status and future prospects*. Australian Centre for International Research, Canberra, 128.
- De Bacelar, J.J.A.H, Correia, A.I.D., Escudeiro, A.C.S A., Silva, R.P.D., Rodrigues, C.M.A. (1987).** News concerning the flora of Sintra (Portugal). *Boletim da Sociedade Broteriana* 60:147-162.

- Dehgan, B. (1998).** Landscape Plants for Subtropical Climates. University Press of Florida, Gainesville, FL.
- Devesa J. A. (2007).** Lonicera. Ed. Flora Iberica, 15. CSIC. Madrid.
- Dixon, R. (2001).** Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Domsch, K.H., Gams, W, Andersin, T. (1993).** Compendium of soil fungi. IHV-Verlag, p. 859.
- Doss, R. P., Deisenhofer, J. & von Nidda, H.-A., K. (2003).** Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63, 687-691.
- Doyle, O. (1991).** *Trichoderma* green mould. *The Irish Mushroom Review* 3: 13-17.
- Duke, S.O. (1990).** Natural pesticides from plants. Ed. *Advances in newbcrops*. Timber Press, Portland,bp. 511-517.
- Dyess, J.G., Causey, M.K., Stribling H.L. (1994).** Effects of fertilization on production and quality of Japanese honeysuckle. *Southern Journal of Applied Forestry* 18 (2): 68-71.
- E**
- Eckert, J.W., Ratmayake, M. (1994).** Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. *Phytopathology*, 84,764-750.
- Edwards, R. and Gatehouse, J.A. (1999).** Secondary metabolism. Ed. *Plant biochemistry and molecular biology* (2nd ed). John Wiley & Sons Ltd.
- Elad, Y., Shtienberg, D. (1995).** *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews* 1, 15-19.
- Elad, Y. (1997).** Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biol. Rev. Cambridge Philosophical So.* 72: 381-422.
- Elad, Y., Wiliamson, P., Tudzynski, P. & Delen, N. (2004).** *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – An introduction. En: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-8.
- El Ghaouth, A., Wilson, C. L. & Wisniewski, M. (1997).** Antigungal activity of 2-deoxy-D-glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Rhizopus stolonifer*: Ultrastructural and cytochemical aspects. *Phytopathology* 87, 772-779.
- Elmer, P.A. and Reglinski, T. (2006).** Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathol.* 55: 155–177.
- Ensbey, R. (2003).** Managing Lantana.. NSW Agriculture, Orange, New South Wales, p.5.

Espinosa, A., Rodríguez, M.A., Merced, J.M. (1998). Taller de producción de plantas en macetas. Academia de Floricultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. Colección M.C. p.29-40.

Estopá, M., Llauradó, M. (2003). Empresas innovadoras en *Pelargonium zonale*. Revista Planta joven. Extra de verano. pp.110-114.

F

Faretra, F., Antonacci, E. and Pollastro, S. (1988). Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *J. General Microbiol.* 134:2543-2550.

Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., Youngman, P. (2000). The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl acad Sci USA* 97, 8063-8068.

Fernández, Al., Villaverde, M., Casanova, J.A., Malo, J., Nicolás, J.A., Blanca, I. (1997). Nuevo aislado de *Bacillus* y su utilización para el control de hongos fitopatógenos. *Disponible:* www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/...seae/.../S4C7.pdf

Fernández-Larrea, O. (2001): «Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario», *Revista Manejo Integrado de Plagas* 62:96-100.

Ferrari, E., Jarnagin, A.S., Schmidt, B.F. (1993). Commercial production of extracellular enzymes. Cap. 62 pag. 917-937 En *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria, ed. AL Sonenshein, Pub. ASM, Washington, EUA.

Fiori, A., Schwan, K., Stangarlin, J., Vida, J., Scapim, C., Cruz, M. and Pascholati, S. (2000). Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *J. Phytopathology* 148: 483-487.

Fonteno WC (1992). Geraniums. *En: Floriculture*. Ed. Larson RL. Academic Press, Inc., San Diego. pp.451-475.

Fravel, D. (1999). Hurdles and bottlenecks on the road to biocontrol of plant pathogens. *Aust. Plant Pathol.* 28: 53-56.

G

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

Garret, S. 1965. Ecology of soil-borne plant pathogens. Prelude to biological control. Toward biological control of soilborne plant pathogens. California: University California Press, pp. 4 – 17.

Genoscope (2005). Sequencing projects of *Botrytis cinerea*. Estimated losses for vineyards in France amount to 15-40 % of the harvest, depending on climatic conditions. *Disponible:* <http://genoscope.cns.fr>. [Revisado el 15 de Enero de 2013].

- Geraniaceae is all around the world (1999).** The geraniaceae family. *Disponible:* <http://www.users.bigpon.com/SCRIVENS/PAGE19.html>. [Revisado el 30 de Noviembre de 2013].
- Gerhardson, B. (2002).** Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechn.* 20: 338–43.
- Gleason, H.A. and A. Cronquist. (1963).** Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada. New York Botanic Garden, New York, p. 810.
- Govrin E., Levine, A. (2000).** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10: 751-757.
- Grayer, R. J. and Harborne, J.J. (1994).** A survey of antifungal compounds from higher plants 1982–1993. *Phytochemistry* 37:19–42.
- Grey-Wilson, C. (1997).** Cyclamen. A Guide for Gardeners, Horticulturists and Botanists. B. T. Batsford Ltd. London, Great Britain. p. 192.
- Grindle, M. (1979).** Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* 111, 109-120.
- ## H
- Hain, R., Reif, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., B., V., Wiese, W., Schemeltzer, E., Schreider, P. H., Stocker, R. H. & Stenzel, K. (1993).** Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153-156.
- Hamer, J., Howard, R., Chumley, G. and Valent, B. (1987).** A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* 239, 288-290.
- Hammer, P.A. (1981).** Statistics: A tool for the horticultural scientist. *HortScience*, 16(5): 620-640.
- Hammer, P.E., Yang, S.F., Reid, M.S., Marois, J.J. (1990).** Postharvest control of *Botrytis cinerea* infections on cut roses using fungistatic storage atmospheres. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115(1): 102-107.
- Harney PM (1976).** The origin, cytogenetics and reproductive morphology of the zonal geranium: a review. *HortScience* 11(3): 189-194.
- Hausbeck, M.K. and Moorman, G.M. (1996).** Managing Botrytis in greenhouse-grown flower crops. *Plant Disease* 80,1212-1219.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. (1995).** Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 8th ed. Int. Mycol. Inst. CAB Int. Egham. UK.
- Hennebert, G.L. (1973).** Botrytis and Botrytis-like genera. *Persoonia* 7: 183-204.
- Hermosa, M., Iturriaga, E.A., Díaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., García Acha, J.M. (2000).** Molecular characterization and identification of nbiocontrol isolates os *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1890-1898.

Hidalgo, A. (1989). Comparación de dos métodos para la selección de aislamientos de *Trichoderma* para el combate biológico de *Fusarium* y *Rhizoctonia* en clavel. Tesis para optar por el grado de Licenciado en Agronomía. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica, p.89.

Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J. V. and Herberger, J. P. (1977). The Worlds Worst Weeds. Distribution and Biology. EastWest Centre, Honolulu, Hawaii. pp. 207-302.

Horn W (1994). Interspecific crossability and inheritance in *Pelargonium*. Plant Breeding 113(1): 3-17.

J

Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De pauw, E., Thonart, P. (1999). Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman desing. Appl Biochem Biotech 77, 223-233.

Jarvis, W.R. (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* Species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. Monograph 1. Research Branco, Canada Department of Agriculture, p. 195.

Jarvis, W.R. (1980). Epidemmiology. The Biology of Botrytis. Academic Press, London, p.p. 219-250.

Jeandet, P., Douillet, A., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. and Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression intransgenic plants, antifungal activity, and metabolism. J. Agric. Food Chem. 50, 2731-2741.

Jeanmonod, D. and H.M. Burdet. (1992). Notes and contributions to the Corsican flora. VIII. Candollea 47, 267-318

Jensen, D. & Wolffhechel, H. (1995). Biological control. The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp and *Gliocladium* spp, to control root rot and damping-off diseases. Cambrige University Press. (pp. 177-189).

Jimenez, R., Caballero, M. (1990). El cultivo industrial de plantas en maceta. Ediciones de Horticultura p. 32-48.

Jones, G.E.R. (1994). Fungal adhesion. Mycol. Res. 98(9): 961-81.

K

Katan, T. (1982). Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide ('dicarboximide') fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. *Plant Pathology*, 31, 133-141.

Kesser JR (1998). Greenhouse production of zonal geranium. *Disponible:* <http://www.aces.edu/departament/extcomm/publications>. (5 de Abril de 2013).

Kim, W.G., Cho, W.D. (1996). Developmental characteristics of gray mold in pepper. J. Agri. Sc. Crop Prot. 38, 466-472.

Kiso, A. 1988. Epidemiology and fungicide control of gray mold, *Botrytis cinerea*, of vegetables in Japan. Japan Pestic. Inform. 52, 16-21.

Klee, H.J., hayford, M.B., Kretzner, K.A., Barry, G.F., Kishore, G.M. (1991). Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell*, 3, 1187-1193.

Kolattukudy, P.E. (1981). Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 32, 539-567.

Kolattukudy, P.E. (1985). Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 223-250.

Kratzschmar J., Krause M., Marahiel M. (1989). Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes GRSA and GRSE has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *Journal of Bacteriology*; Vol. 171, No. 10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2477357> [Revisado el 9 de Agosto de 2013].

Kunst, A., Mackenbach, J. (1996). Measuring socioeconomic inequalities in Health, Copenhagen, WHO, Regional office for Europe.

L

Lambers, H., Chapin, F.S. III., Pons, T.L. (2000). *Plant physiological ecology*. Springer- Verlag, New York Inc, p. 539.

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

Latorre, B.A. y Rioja, M. (2002). Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. *Cien. Inv. Agr.* 29 (2): 67-71.

Latorre, B.A. (2004). *Enfermedades de las plantas cultivadas*. (6ª ed. ampliada). Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile, p. 638.

Laughner LH (1993). *Geraniums IV. The grower's manual*. Ed. White J. Ball Publishing, Geneva. USA. pp.363-371.

Leatherman, A.D. (1955): Ecological life-history of *Lonicera japonica* Thunb. Unpublished PhD thesis, University of Tennessee. (Library of Congress Card No. Mic. 55-772). 97 p. University Microfilms. Ann Arbor. Michigan (Dissertation Abstracts 15 (11): 1987, Publication No. 15,076).

Lee, K.J., J.C. Jo., B.S. Lee and D.S. Lee. (1990). The structure of plant community in Kwangnung (Korea) forest (I): Analysis of the forest community of Soribong area by the classification and ordination techniques. *Journal of the Korean Forestry Society* 79, 173-186.

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

Leonelli, G. N. (2006). Evaluación del antagonismo in vitro ejercido por microorganismos sobre *Botrytis cinerea* Pers.ex Fries en frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias

Mención Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.

Lis Balchin M (1997). A chemotaxonomic study of the *Pelargonium (Geraniaceae)* species and their modern cultivars. *Journal of Horticultural Science* 72(5): 791-795.

Litlere, B., Stromme,E.,(1975). The influence of temperature, day-length, and light intensity on flowering in *Hydrangea macrophylla* (thumb). Ser. Acta Horticulturae. 21: 285-298.

López, G., (2004). Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares: especies silvestres y las principales cultivadas. Ed. Paraninfo, 648.

Lopez, C. J., Mateo, E., Grana, E. E. (1986). Estudio de la facies esclerocial de *Botrytis cinerea*. *Phytopath. medit.* 25, 19-25.

Lyons, E.E., Miller, (1999). Especies invasoras en el este de África: Procedimientos del taller que se realizó en el ICIPE, 5 a 6 jul.

M

Macgrath, M. T., Shishkoff, N. (1999). Evaluation of biocompatible products for managing cucurbit powdery mildew. *Crop Protection* 18: 417-478.

Macías, F.A., Galindo, J.G.C and Molinillo, J.M. (1998). Plant biocomunicators: Application of allelopathic studies. Allelopathy in rice. Proceedings of the Workshop on Allelopathy in Rice, 25-27 Nov 1996. Ed. M. Olofsdotter, Manilla, pp. 69-79.

Magnet-Dana, R., Thimon, L., Peypoux,F., Ptak, M. (1992). Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74, 1047-1051.

Maketon, M. (2004). Effectiveness of “Biobest” (*Bacillus subtilis* NSRS89-24+ MK-007) in Controlling Rice Sheath Blight Disease from *Rhizoctonia solani* Kuhn. *KU. Sci. J.*, 22 (1), 24-30.

Marois, J.J., Redmond, J.C., MacDonald, J.D. (1988). Quantification of the impact of environment on the susceptibility of *Rosa hybrida* flowers to *Botrytis cinerea*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 842-845.

Marsolais AA, Wilson DPM, Tsujita MJ, Seneratna T (1991). Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium x hortorum*) and regal (*Pelargonium x domesticum*) geranium. *Canadian Journal of Botany* 69(6): 1188-1193.

Martin, A.C., H.S. Zim, and A.L. Nelson. (1951). American wildlife and plants: a guide to wildlife food habits. Dover Publications. New York. 500 p.

Matínez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., Fermaud, M. (2003). Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 479-488.

- Martínez, J.A., Bañón, S. (2007).** Differential effects of gibberellic acid on the growth of *Botrytis cinerea* isolated from various ornamental plants. XVI International Plant Protection Congress, Glasgow, Scotland, UK, 15-18 October 2007. Congress Proceedings, 2,780-781.
- Martínez, J.A., Navarro, A., Fernández, J.A., Bañón, S. (2007).** Using paclobutrazol to delay the growth of *Botrytis cinerea* isolated from *Chamelaucium uncinatum*. Australasian Plant Pathology, 36, 39-45.
- Martínez, J.A., Valdés, R., Vicente, M.J., Bañón, S. (2008a).** Phenotypical differences among *B. cinerea* isolates from ornamental plants. Comm. Appl. Biol. Ghent University, 73(2):121-129.
- Martínez, J.A., Valdés, R., Ochoa, J., Bañón, S. (2008b).** Influencia del ácido giberélico en el desarrollo de *Botrytis cinerea* aislado de plantas ornamentales. Cuadernos de Fitopatología, 95, 15-24.
- Martínez, J.A., Gómez-Bellot, M.J., Bañón, S. (2009).** Temperature-dependent growth of *Botrytis cinerea* isolates from potted plants. Comm. Appl. Biol. Ghent University, 74(3):729-738.
- Martínez, J.A., Valdés, R., Bañón, S. (2010).** Effects of paclobutrazol on *Botrytis cinerea* isolates obtained from potted plants. Comm. Appl. Biol. Ghent University, 75(4):709-719.
- Martínez, J.A., Valdés, R., Gómez-Bellot, M.J., Bañón, S. (2011a).** Effects of índole-3-acetic acid on *Botrytis cinerea* isolates obtained from potted plants. Comm. Appl. Biol. Ghent University, 76(4): 643-651.
- Martínez J.A., Gómez-Bellot, M.J., Bañón, S. (2011b).** Effects of calcium chloride on *Botrytis cinerea* isolates obtained from ornamental plants. International Congress of Postharvest Pathology, Lleida, Catalonia, Spain, p.p. 11-14.
- Martínez, J.A., Roca, M., Bañón, S. (2012).** *Bacillus velezensis* affects growth of *Botrytis cinerea* isolates obtained from potted plants. 64th International Symposium on Crop Protection (ISCP 2012), Ghent, Belgium, 22nd mayo 2012.
- Martínez, J.A. (2012).** Natural Fungicides Obtained from Plants, Fungicides for Plant and Animal Diseases, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), ISBN: 978-953-307-804-5, InTech, Con acceso en: <http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/natural-fungicides-obtained-from-plants>.
- Melton, R.E., Flegg, L.M., Brown, J.K.M., Oliver, R.P., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. (1998).** Heterologous expression of *Septoria lycopersici* tomatinase in *Cladosporium fulvum*: effects on compatible and incompatible interactions with tomato seedlings. Mol. Plant-Microbe Interact. 11, 228-236.
- Memenza, M.E. (2009).** Control biológico in vitro de *Botrytis cinerea* (Pers) mediante el uso de hongos antagonistas, en vid (*Vitis vinifera*). Tesis para optar el título profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Marcos.
- Mendger, K., Deising, H. (1993).** Infection structures of fungal plant pathogens-a cytological and physiological evaluation. New Phytol. 124, 193-213.

- Mendger, K., Hahn, M. and Deising, H. (1996).** Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 34, 367-386.
- Mercier, J. Arul, J., Ponnanapalan, R., Boulet, M. (1993).** Induction of 6-methoxymellein and resistance to storage pathogens in carrot slices by UV-C. *J. Phytopathol.*, 137, 44-54.
- Mitchell KA, Markham KR, Boase MR (1998).** Pigment chemistry and colour of *Pelargonium* flowers. *Phytochemistry* 47(3): 355-361.
- Mohsin, G. A. I. (1990).** Le cycle sexue in vitro de *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) forme parfaite de *Botrytis cinerea* (Pers.): Dèterminisme; optimisation des conditions d'obtention. Tesis doctoral. Universidad de Lille.
- Montaño, W. (2005).** Evaluación de la incidencia de *Botrytis cinerea* sobre rosa cultivar Classy con aplicaciones de fungicidas químicos y *Trichoderma*. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional. Bogotá.
- Morrissey, J. and Osbourn, A. (1999).** Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (3): 708-724.
- Munger, G.T. (2002).** *Lonicera japonica*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory. Fire Effects Information System.p.43. <http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/vine/lonjap/all.html>.
- Munir,A.A.(1996).**Ataxonomic review of *Lantana camara* and *L. montevidensis* (Spreng.) Briq. (Verbenaceae)in Australia .*Journal of the Adelaide Botanic Gardens* 17,p. 127.

N

- Nakamura, L. K. (1989).** Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 39, 295–300.
- Nakamura, L.K., Roberts, M.S., Cohan, F.M. (1999).** Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. Nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1211-1215.
- Narayanasamy, P. (2006).** Postharvest Pathogens and Disease Management. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, p. 578.
- Nessmann P (1998).** Los geranios. Jardinería práctica. Susaeta ediciones S.A., Madrid, p. 69.
- Nigro, F., Ippolito, A., Lima, G. (1998).** Use of UV-C to reduce *Botrytis* storage rot of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 13, 171-181.

O

- Ogleeve B (1998).** *Pelargonium x hortorum*. Cutting geraniums. Ball Redbook. Ed. Ball V. Ball Publishing, Batavia, Illinois. pp.657-667.
- Onega, M., Jacques, P.(2008).** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115-125.

Osbourn, A.E. (1996a). Performed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831.

Osbourn, A.E. (1996b). Saponins and plant defense - a soap story. *Trends Plant Sci.* 1(1): 4-6.

Osbourn, A.E. (1999). Review - Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Gen. Biol.* 26, 163-168.

P

Palou, L. 2007. Evaluación de alternativas para el tratamiento antifúngico en poscosecha de cítricos de Producción Integrada. *Horticultura*, Vol. XXV, núm. 3 junio 2007, pp.83-93.

Panova, L.N. (1986). Adaptation of introduced woody plants to low temperatures in the steppe region of the southern Ukraine. *Byulleten' -Glavnogo-Botanicheskogo-Sada* 142, 17-19.

Papadopoulou, K., Melton, R., Leggett, M., Daniels, M. and Osbourn, A. (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *PNAS* 96(22): 12923-12928.

Parkinson, D. & Waid, J. (1960). *The Ecology of Soil Fungi*- Liperpool University Press.

Parsons, W. T., Cuthbertson, E. G. (2001). *Noxious Weeds of Australia*, 2nd edition. CSIRO Publishing, Melbourne. pp. 627-634.

Paulitz, T. and Bélanger, R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 103-133.

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 553-363.

Peypoux, F., Guimand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B.C., Lederec, E. (1978). Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 17, 3992-3996.

Porat, R., Lers, A., Dori, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Wilson, C.L., Droby, S. (1999). Induction of chitinase and β -1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. *Phytoparasitica*, 27, 233-238.

Powell, A.L.T., D'Hallewin, G., Hall, B.D., Stotz, H., Labavitch, J.M., Bennett, A.B. (1994). Glycoprotein inhibitors of fungal polygalacturonases: expression of pear PGIP improves resistance in transgenic tomatoes. *Plant Physiol.*, 105, 159.

Pradhanang, P.M., Mogol, M.T., Olson, S.M, Jones, J.B. (2000). Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant. Dis* 87 (4): 423-427.

Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., Berkeley, R. C. W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 37, 69-71.

Prusky, D., Plumbley, R.A., Kobiler, I. (1991). Modulation of natural resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides* by CO₂ treatment. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 39, 325-334.

Prusky, D., Keen, N.T. (1995). Inducible preformed compounds and their involvement in the resistance of plants to pathogens. En: Reuveni, R. (ed.), *Novel Approaches to Integrated Management*, Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp. 139-152.

Pryor, S.W., Gibson, D.M., Hay, a.G., Gossett, J.M., Walker, L.P. (2007). Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 143, 63-79.

R

Rahman, M.S., Ano, T., Shoda, M. (2006). Short communication Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. *J Biotechnol* 125, 513-515.

Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Jacques, P., Destain, J., Thonart, P. (1993). Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 639, 81-85.

Renou JP, Aubry C, Serveau M, Jalouzot P (1997). Evaluation of the genetic variability in the genus *Pelargonium* using RAPD markers. *Journal of Horticultural Science* 72(2): 229-237.

Reyes, A.A. (1990). Pathogenicity, growth, and sporulation of *Mucor mucedo* and *Botrytis cinerea* in cold or CA storage. *HortScience*, 25(5): 549-552.

Rice, E.L. (1987). Allelopathy: an overview. En: Waller, G.E. *Allelochemicals: role in agriculture and forestry*. pp. 8-22. Oklahoma state university. American chemical society, Washinton, DC.

Roberts, M. S., Nakamura, L. K. & Cohan, F. M. (1994). *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence and differences in fatty acid composition. *Int J Syst Bacteriol* 44, 256–264.

Roberts, M. S., Nakamura, L. K. & Cohan, F. M. (1996). *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis* isolated from soil in Death Valley, California. *Int J Syst Bacteriol* 46, 470–475.

Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J.L., Dávila, J.C., Pérez-García, A. (2007a). Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Pososphaera fusca*. *J Appl Microbiol* 103, 969-976.

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.V., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P. (2007b). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* towards *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 430-440.

Rosslenbroich, H.J. (1999). Efficacy of fenhexamid (KBR 2739) against *Botrytis cinerea* and related fungal pathogens. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 52(2): 127-144.

Rosslenbroich, H.J. and Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea* - History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Prot.* 19, 557-561.

Ruiz-García, C., Bejar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 55, 191-195.

S

Salinas, J., Glandorf, D.C.M., Picavet, F.D., Verhoeff, K. (1989). Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Neth. J. Pl. Path.* 95, 51-64.

Sanz-Elorza, M., Dana, E.D., Sobrino, E. (2001). Aproximación al listado de plantas alóctonas invasoras reales y potenciales en España. *Lazaroa* 22, 121-131.

Seaby, D.A. (1996). Investigation of the epidemiology of green mould of mushroom (*Agaricus bisporus*) compost caused by *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology* 45, 913-923.

Shanks, J.B., Link, C.B., (1951). Effects of temperature and photoperiod on growth and flower formation in hydrangeas. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 58, 357-366.

Singh, H., Batish, D. and Kohlil, R. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22(3-4): 239- 311.

Slepecky, R.A., Hemphill, H.E. (1992). The Genus *Bacillus* Nonmedical. *The Prokaryotes*. New York, EUA 2, 112-119.

Smith, R.H., (1992). *Plant Tissue Culture-Techniques and Experiments*. Academic Press.

Sneath, P.H.A. (1986). Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore EUA.2(13): 1104-1140.

Snowdon, A.L. (1990). *A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*. Volume 1: General Introduction and Fruits. Wolfe Scientific Ltd., Cambridge, Reino Unido, p. 302.

Spadaro, D. and Gullino, M.L. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* 24, 601-613.

Stabb, E.V., Jacobson, L.M., Handlesman, J. (1994). Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl Environ Microbiol* 60, 4404-4412.

Stanley, T. D. and Ross, E. M. (1986). *Flora of SouthEastern Queensland*. Department of Primary Industries, Brisbane. 2, 622.

Staples, R.C. and Mayer, A.M. (1995). Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 1-7.

Starman, T.W., Abbitt, S. (1997). Evaluating genetic relationships of geranium using arbitrary signatures from amplification profiles. *HortScience* 32(7): 1288-1291.

- Stein, J., Brake, J., Faust, M. (2005).** Evaluation of transgenic hybrid com (VIP3A) in broiler chickens. *Poultry Sci.* 84, 503-512.
- Stewart, A. (2001).** Commercial biocontrol – reality or fantasy. *Aust. Plant Pathol.* 30, 127-31.
- Stirton, C.H.(1977).**Some thoughts on the polyploidy complex *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Proceedings of the 2nd National Weeds Conference of South Africa. pp.321-340.
- Stotz, H.U., Powell, A.L.T., Damon, S.E., Greve, C.L., Bennett, A.B., Labavitch, J.M. (1993).** Molecular characterization of polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv. Barlett. *Plant Physiol.*, 102, 133-138.
- Swarbrick, J.T., Wilson, B.W, Hannan Jones, M.A. (1998).** *Lantana camara*. The Biology of Australian Victoria. 9(2): 119-140.

T

- Tabei, Y., Kitade, S., Nishizawa, Y., Kikuchi, N., Kayano, T., Hibi, K. & Akutsu, K. (1997).** Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports* 17.
- Taga, M. & Murata, M. (1994).** Visualization of mitotic chromosomes in filamentous fungi by fluorescence staining and fluorescence in situ hybridization. *Chromosoma* 103, 408-413.
- Ten Have, A. 2000.** The *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase gene family. Thesis (doctoral)-WageningenUniversiteit. <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis2791.pdf>. [Revisado el 7 de Noviembre de 2013].
- Tewari, S.N. (1990).** Toxic effect of few botanicals on three fungal pathogens of rice. Proc. Symposium Botanical Pesticides in IPM, Neem Foundation, India. pp. 397–403.
- Thaman,R.R.(1974).** *Lantana camara*: Its introduction, dispersal and impact on island of the tropical Pacific Ocean. *Micronesica,Journal of the University of Guam*,10,17-39.
- Thrower, S.L. (1976).** Hong Kong herbs and vines. Government Printer. Hong Kong. p.114.
- Touré, Y., Onega, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. (2004).** Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol* 96, 1151-1160.
- Tudzynski, P., Siewers, V. (2004).** Approaches to molecular genetics and genomics of *Botrytis*. En: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 53-66.
- Tuset, J.J. (1987).** Podredumbre de los Frutos Cítricos. Consejería de Agricultura y Pesca. Generalitat Valenciana, p. 206.

U

- Urbasch, I. (1983).** Über entstehung und keimung der chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathologische Zeitschrift* 108, 54-60.

Urbasch, I. (1985). Ultrastructural studies on the microconidia of *Botrytis cinerea* Pers. and their phialoconidial development. *Phytopathology* 112, 229-237.

Urbasch, I. (1986). *In vivo*-untersuchungen zur entstehung und funktion der chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. am wirt-parasit-system *Fuchsia hybrida*-*B. cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift* 117, 276-282.

V

Valdes, R., (2011). Cultivo de hortensia en maceta bajo agua residual depurada salina: eficacia del lavado con agua buena. Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena.

Van Der Walt JJA (1977). *Pelargoniums of Southern Africa I*, Juta, Cape Town. p.89.

Van Der Walt JJA, Vorster PJ (1981). *Pelargoniums of Southern Africa II*, Juta, Cape Town. p.88.

Vandamme E., Demain A. (1976). Nutrition of *bacillus brevis* ATCC 9999, the producer of Gramicidin S. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; Vol. 10, No. 2. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC429733/> [Revisado el 23 de Julio de 2013].

Van Etten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E. (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell* 6, 1191-1192.

VanEtten, H.D., Sandrock, R.W., Wasmann, C.C., Soby, S.D., McCluskey, K., Wang, P. (1995). Detoxification of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. *Can. J. Bot.* 73(1):18-S525.

Vanittanakom, N., Loeffler, w., Koch, U., Jung, G. (1986). Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J antibiot* 39, 888-901.

Van Oosterhout, E. (2004). *Lantana Control Manual. Current Management and Control Options for Lantana (Lantana camara) in Australia.* Queensland Department of Natural Resources, Mines and Energy. Brisbane, p.88.

Venegas, E, Ciampi, L., Collado, L., Costa, M., Fuentes, R., Nissen, J., Schobitz, R., Schoebitz, M. (2006). Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género *bacillus cohn* antagonistas de cepas patógenas de *fusarium link*. *Agro sur.* p.33 (2):1-12. Disponible: http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S030488022005000200001&lng=es&nrm=iso. ISSN 0304-8802 [Revisado el 15 de Julio de 2013].

W

Wagner, W.L., D.R. Herbst, and S.H. Sohmer. (1989). Contributions to the flora of hawaii (USA): II. Begoniaeae-Violaceae and the monocotyledons. *Bishop Museum Occasional Papers* 29, 88-130.

Webb, C.J.; Sykes, W.R.; Garnock-Jones, P.J. (1988). *Flora of New Zealand, Vol. IV.* Botany Division, DSIR.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W. (1995). DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. Boca Ratón, Florida. USA.

Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G. & Waterhouse, P. M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal* 27, 581-590.

Windels, C. & Lindow, S. (1985). Biological control on the Phylloplane. St. Paul MN: American Phytopathological Society.

Winder, J. A. (1980). Factors Affecting the Growth of Lantana in Brazil. Doctor of Philosophy Thesis, University of Reading, Reading, England.

Y

Yu S-N, Horn WAH (1998). Additional chromosome numbers in Pelargonium (Geraniaceae). *Plant Syst Evolution* 159,165-171.

Yang, H-J, Sung, Y. (2011). Biocontrol of mildew with *Bacillus subtilis* in bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seeds during germination. *Scientia Horticulturae*. 130, 38-42.

Yunis, H. Elad, Y. (1989). Survival of dicarboximide resistant strains of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica* 17, 13-21.

Yunis, H., Elad, Y. and Mahrer, Y. (1990). Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on grey mould of cucumbers in unheated greenhouses. *Phytoparasitica* 18, 203-215.

Z

Zimmerman, C. (1998a). Geraniaceae. Geranium. *Disponible:* <http://biology.nwc.when.edu/biology/bot2100/>. [Revisado el 12 de Enero de 2013].

Zimmerman, C. (1998b). Pelargonium-Geranium. *Disponible:* <http://www.msue.msu.edu/msue/imp/mod03/>. [Revisado el 12 de Enero de 2013].