

4405

ESTUDIO DE RAZAS DEL HONGO Botrytis cinerea Pers. Y SU

PATOGENECIDAD EN ALGUNAS ESPECIES

DE FLORES DE EXPORTACION

T E S I S

Presentada al Programa de Estudios para Graduados en

Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Colombia

Instituto Colombiano Agropecuario

Por

ELMIRA GARCÉS DE GRANADA

//

Como requisito parcial para obtener el título de

MAGISTER SCIENTIAE

Bogotá, Colombia

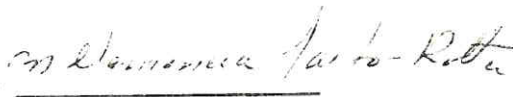
1983

TESIS APROBADA POR
COMITE CONSEJERO

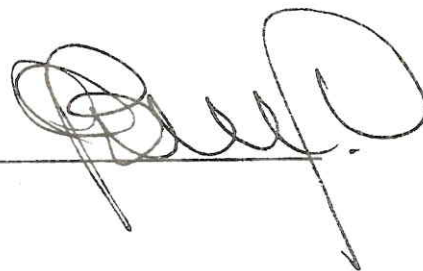
Dr. GERMAN ARBELAEZ T. M.S.



Dra. MARIA CLEMENCIA DE LA ROTTA M.S.



Dr. OSCAR BRICEÑO ESCOBAR I.A. Ph.D.



"El Presidente de Tesis y el Consejo Examinador de grado, no serán responsables de las ideas emitidas por el candidato" (Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional de Colombia).

DEDICO A :

Josué, Carlos Andrés e Isabel Cristina

AGRADECIMIENTOS

A

GERMAN ARBELAEZ TORRES, Consejero y Director de Tesis,
Profesor Facultad de Agronomía, Universidad Nacional

MARIA CLEMENCIA DE LA ROTTA, por su colaboración y conse-
jería.

OSCAR BRICEÑO ESCOBAR, por su colaboración y consejería.

LUZ MARINA OLARTE, por su colaboración

MARTHA DE AMEZQUITA, por su colaboración

MARINA C. DE RESTREPO, por su colaboración

JUAN OSPINA, Profesor Facultad de Agronomía, Universidad Nacional.

ALFREDO ACOSTA, Profesor Facultad de Agronomía, Universidad
Nacional.

GERMAN TOVAR RODRIGUEZ, Profesor Facultad de Agronomía,
Universidad Nacional

JARDINES DE LOS ANDES LTDA y AGRODEX LTDA., por su espec-
cial colaboración.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, Universidad Nacional.

Al personal del CENTRO DE COMPUTO Y PROCESAMIENTO DE
DATOS de la Universidad Nacional.

v

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Taxonomía	3
2.2 Variabilidad	5
2.3 Patogeneidad	8
2.4 Condiciones que predisponen la planta a la infección	9
2.5 Compuestos implicados en el proceso de infección	11
3. MATERIALES Y METODOS	13
3.1 Obtención de los cultivos puros	13
3.2 Observaciones macroscópicas	14
3.3 Observaciones microscópicas	14
3.4 Pruebas de patogeneidad	14
3.4.1 Diseño experimental	15
3.4.2 Inoculaciones	16

	Página
3.4.3 Evaluación de especificidad, tiempo de inoculación y agresividad	17
4. RESULTADOS Y DISCUSION	19
4.1 Estudio macroscópico de los aislamientos	19
4.2 Características microscópicas	23
4.3 Pruebas de patogenicidad	24
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
6. RESUMEN	67
7. BIBLIOGRAFIA	71

LISTA DE TABLAS

<u>Número</u>		<u>Página</u>
1	Escala de daño, porcentaje de área floral afectada y esporulación para la prueba de patogenicidad de <u>Botrytis cinerea</u> sobre variedades de Clavel y Crisantemo	18
2	Tamaño de las conidias en micras de los diferentes aislamientos obtenidos en el medio de cultivo PDA	25
3	Crecimiento micelial en centímetros de los aislamientos obtenidos de diferentes variedades de Clavel y Crisantemo en el medio de cultivo PDA a 22°C	26
4	Períodos de incubación de la enfermedad en horas en variedades de Clavel y Crisantemo	29
5	Análisis de varianza para promedios de área floral afectada por variedad y por aislamientos	30
6	Prueba de Duncan para promedios de área floral afectada por variedad y por tipo de aislamiento	32
7	Prueba de Duncan para efecto de variedades de clavel sobre el porcentaje de área afectada.	
	Prueba de Duncan para efecto de tipos de aislamiento sobre el porcentaje de área floral afectada.	35

<u>Número</u>		<u>Página</u>
8	Análisis de varianza para promedios de números de pétalos afectados por variedad y por aislamiento	36
9	Prueba de Duncan para promedios de números de pétalos afectados por variedad y por aislamiento	39
10	Prueba de Duncan para efecto de variedades sobre el promedio del número de pétalos afectados.	
	Prueba de Duncan para efecto de tipos de aislamientos sobre el promedio del número de pétalos afectados	43
11	Resultados de las pruebas de patogenicidad en Crisantemo a los nueve días de inoculación.	52

LISTA DE FOTOGRAFIAS

<u>Número</u>		<u>Página</u>
1	Colonias de los tipos Esporulante (abajo derecha), Esclerocial (arriba) e Intermedio (abajo izquierda), aisladas de diferentes variedades de clavel.	21
2	Colonias de los tipos Esporulante (arriba derecha), Esclerocial (arriba izquierda) e Intermedia (abajo), aisladas de diferentes variedades de Crisantemo.	22
3	Síntomas en flores de clavel de la variedad Lenna inoculadas con el aislamiento Tipo Esporulante.	47
4	Síntomas en las variedades Lenna (izquierda), Improved White (centro) y CSU Red (Derecha) a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Esporulante.	48
5	Síntomas en las variedades Lenna (izquierda), Improved White (centro) y CSU (derecha) a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Esclerocial.	49
6	Síntomas en las variedades Lenna (izquierda), Improved White (centro) y CSU (derecha) a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Intermedio.	50

<u>Número</u>		<u>Página</u>
7	Síntomas en flores de clavel de la variedad Improved White inoculadas con los Tipos Es- porulante (izquierda), Esclerocial (centro) e Intermedio (derecha).	51
8	Cabeceo de la flor y esporulación en el cáliz de la variedad Red Flamenco inoculadas con el aislamiento Tipo Esporulante.	56
9	Síntomas en flores de Crisantemo de la varie- dad Red Flamenco inoculadas con los Tipos Es- porulante (izquierda), Esclerocial (centro) e Intermedio (derecha).	57
10	Síntomas en flores de Crisantemo de la varie- dad Deep Telstar inoculadas con los Tipos Es- porulante (izquierda), Esclerocial (centro) e Intermedio (derecha).	58
11	Síntomas en flores de Crisantemo de la varie- dad Fire Brand a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Esporulante.	59
12	Síntomas en flores de Crisantemo de la varie- dad Fire Brand a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Esclerocial.	60
13	Síntomas en flores de Crisantemo de la varie- dad Fire Brand a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Intermedio.	61
14	Corte de pedúnculo floral de clavel donde se observa en la epidermis una gruesa capa de cera.	62

LISTA DE FIGURAS

<u>Número</u>		<u>Página</u>
1	Porcentaje promedio, de área floral afectada por Variedad y por Aislamiento.	33
2	Porcentaje promedio de área floral afectada por Variedad.	40
3	Promedio de área floral, en porcentaje por Aislamiento.	41
4	Promedio de número de pétalos afectados por Variedad y por Tratamiento.	42
5	Promedio de número de pétalos afectados por Variedad.	44
6	Promedio de número de pétalos afectados por Aislamiento.	45
7	Porcentaje de involucro en flores de Crisantemo afectado por Variedad y por Aislamiento.	53

1. INTRODUCCION

La industria de flores de exportación ha pasado a ocupar un lugar importante en la economía colombiana, generando nuevos empleos y mayores divisas al país. Uno de los factores limitantes en la producción de flores de corte, son los problemas fitosanitarios. Por esto se hace necesario el estudio a fondo de algunas enfermedades que afectan la producción y la calidad de dichos productos, tales como las ocasionadas por el hongo Botrytis cinerea Pers, que poseen diferentes razas morfológicas y tienen diferentes grados de agresividad; la cual varía según el clima y la variedad dentro de una misma especie vegetal.

La enfermedad conocida como "moho gris" causada por Botrytis cinerea, es una de las enfermedades más comunes de muchos cultivos como clavel, crisantemo, estatice y rosa. Las plantas pueden ser atacadas en el campo, en el transporte o el almacenamiento. La penetración del patógeno se realiza directamente a través de heridas causadas por insectos o por medios mecánicos.

El objetivo principal de este trabajo fué el estudio de la patogenicidad del hongo Botrytis cinerea, aislado de flores de exportación, su agresividad, esporulación, formación de esclerocios y período de incubación de la enfermedad. Para ello se utilizaron diferentes variedades de clavel ((Dianthus caryophyllus) y de crisantemo (Chrysanthemum morifolium).

2. REVISION DE LITERATURA

Botrytis cinerea Pers es un patógeno de amplia distribución en el mundo y que ataca diversas plantas ornamentales y frutales, en períodos prolongados de humedad relativa alta (7, 15, 19).

2.1 TAXONOMIA

La forma-género Botrytis Pers es ubicada por Hennebert dentro de los Hiphomycetos, familia Botrytidiaceae Lindley. Esta forma-género se caracteriza por poseer conidióforos erguidos, de ramificación numerosa y alterna. Las conidias son uniceladas, de color gris o pardo y de forma globosa u ovoide (5, 9).

El estado perfecto está referido al género Botryotinia Whetzel, del orden Heliotales, familia Sclerotiniaceae Whetzel (5, 13, 14).

Teniendo en cuenta recomendaciones de Hennebert (9) los

estados sexual y conidial del género Botrytis están clasificados así:

	<u>Estado Sexual</u>	<u>Estado Conidial</u>
División:	Mycota	Mycota
Clase:	Discomycetos	Hiphomycetos
Orden:	Heliotales	Moniliales
Familia:	Sclerotiniaceae	Botrytidiaceae
Género:	<u>Botryotinia</u>	<u>Botrytis</u>
Especie:	<u>Botryotinia convoluta</u>	<u>Botrytis convoluta</u>
	<u>B. porri</u>	<u>B. fabae</u>
	<u>B. nicini</u>	<u>B. cinerea</u>
	<u>B. squamosa</u>	<u>B. globosa</u>
	Y otras	Y otras.

De acuerdo a una reciente clasificación, el género Botrytis cuenta con 22 especies y el género Botrytinia con 13 especies (13, 14).

Morgan estudió 33 aislamientos de Botrytis cinerea valiéndose de la taxonomía numérica y utilizando 107 características; concluyó que este patógeno es un complejo de razas identifi-

cables por características culturales, pero ninguna distinta suficientemente de la otra como para ubicarlas en un nuevo taxo (14).

Hennebert afirma que las características culturales por poderse manejar con cierta amplitud, no tienen mucho valor en la diferenciación de razas (9).

2.2 VARIABILIDAD

Jarvis (1977) señala que el género Botrytis en cultivo puro puede ser dividido en tres tipos: Tipo Micelial, tipo Esporulante y tipo Esclerocial. Trabajos posteriores y recientes (3) confirman la existencia de un tipo intermedio entre los tipos Esporulante y Esclerocial (13).

Otros investigadores han encontrado características morfológicas variables, de acuerdo al contenido de nutrientes en los medios de cultivo donde se desarrolle el patógeno y a las condiciones del medio ambiente; Vanev (1972) encontró que las conidias de B. cinerea, B. paconiae, B. tulipae y B. gladiolorum variaban en tamaño según el hospedante original y el medio de cultivo utilizado; las conidias cambiaban

nuevamente de tamaño cuando el hongo se reaislaba de hospederos infectados artificialmente (13).

Paul (1929) citado por Jarvis (12), reconoció tres tipos morfológicos de Botrytis cinerea: micelial, esclerocial y esporulante; encontró diferencias en el tamaño de las conidias, lo mismo que un crecimiento más lento de las razas esporulantes. En cuanto a patogenicidad, encontró que las razas miceliales tuvieron un crecimiento más rápido y que las razas esclerociales presentaron menor patogenicidad (13, 18).

Berkeley (1924) caracterizó cuatro razas morfológicas de Botrytis cinerea aislados de geranio, calabaza, girasol y cáñamo, teniendo en cuenta la forma como metabolizaron el nitrógeno; también encontró diferencias en patogenicidad sobre los diferentes hospedantes (13, 18).

Saponaro (1953) dividió los aislamientos de Botrytis cinerea obtenidos de uva, en siete razas morfológicas basándose en diferencias de tamaño de las conidias (18).

Lauber (1971) halló diferentes razas fisiológicas de cinco aislamientos distintos. Confirmó que el tamaño de la conidia

dependía del pH, de la relación C:N y de los nutrientes del medio de cultivo, de la edad del cultivo así como de la humedad relativa del medio. Este autor sugiere la estandarización de un medio de cultivo para los estudios de este hongo, con el fin de evitar variaciones en las características morfológicas (13, 18).

Chaves y Henao (1981) encontraron diferentes razas morfológicas de B. cinerea, afectando cultivos de flores en la Sabana de Bogotá (3).

Stakman y Pienmeisel (1917) reconocieron diferentes razas fisiológicas en royas, capaces de infectar solo ciertos cultivos homogéneos desde el punto de vista genético; encontraron que la identificación de las razas fisiológicas se basa en su patogenicidad a ciertas variedades de la planta hospedante. Además confirmaron que algunos patógenos que crecen bien en medios diferentes, pueden producir innumerables razas morfológicas de acuerdo al medio de cultivo, pero esta característica raramente está correlacionada con la agresividad o virulencia (16).

2.3 PATOGENECIDAD

Botrytis cinerea tiene hospedantes en Monocotiledóneas, Dicotiledóneas y ocasionalmente en Pteridófitos. Las demás especies de Botrytis atacan Monocotiledóneas de las familias Iridaceae, Amaryllidaceae, Liliaceae y Ranunculaceae con alguna especificidad (14).

Pwelson y Jarvis demostraron que Botrytis cinerea puede afectar las partes florales de fresas y frambuesas en los primeros estadios de desarrollo y que las infecciones pueden permanecer latentes para finalmente destruir los frutos (13).

Chastagner y Ogawa (1978) encontraron daños en tomate causados por Botrytis cinerea, observándose infecciones latentes en los frutos jóvenes.

Ronbach (1969-72) relacionó la infección con hojas de Macademia, con períodos de fuertes lluvias, indicando que en estas condiciones no se produce la enfermedad debido a la pérdida de conidias por lavado a consecuencia de las lluvias; como también por pérdida de conidias a causa del viento. Temperaturas superiores a los 22°C también redujeron la

incidencia de la enfermedad (11, 14, 15).

Jarvis (1981) confirma que Botrytis cinerea es un patógeno común durante la floración; las partes florales aportan un excelente sitio de infección y una vez colonizadas éstas por el micelio, se convierten en inóculo potencial listo para atacar frutos y otras partes de la planta (14).

En Colombia Botrytis cinerea a menudo ocasiona pérdidas considerables en cultivos de uva, fresa, mora y ornamentales, especialmente en períodos de alta precipitación (20).

2.4 CONDICIONES QUE PREDISPONEN LA PLANTA A LA INFECCION

Se ha confirmado que el etileno predispone flores y frutos de algunas plantas al ataque por Botrytis cinerea (15), Williamson (1950) encontró un incremento de etileno en los tejidos de crisantemo y clavel, atacados por Botrytis cinerea. El etileno daña las flores y facilita el ataque por el patógeno (13).

Los tejidos senescentes de las plantas hospedantes se convierten en un sustrato adecuado para el hongo (10, 13).

El incremento de agua y el intercambio gaseoso en los tejidos conducen al aumento de la permeabilidad celular, predisponiendo así los tejidos a la infección. Mishra experimentó con tubérculos de papa y comprobó que éstos se hicieron susceptibles al patógeno con un mayor contenido de agua (13).

El contenido de carbohidratos en los tejidos es un factor importante de la predisposición a la enfermedad. Kamoen (1972) encontró que un alto contenido de azúcar en hojas de Begonia hacía susceptible la planta a la infección por Botrytis cinerea (13).

Las deficiencias nutricionales de la planta juegan un papel de predisposición, pues conducen a ésta a una senescencia prematura facilitando así el ataque del patógeno. El exceso de algunos elementos también pueden predisponer a la planta. Un exceso de Nitrógeno en fresas, naranja, uva y crisantemo predisponen los frutos y flores al ataque por Botrytis cinerea (13).

Hay otros factores que predisponen los cultivos a la infección tales como las heladas, las quemaduras por el sol y el viento,

polución atmosférica, insectos, nemátodos y bacterias (13, 15).

2.5 COMPUESTOS IMPLICADOS EN EL PROCESO DE INFECCION

Muchas especies de Botrytis secretan enzimas pectinolíticas y otras enzimas que degradan las paredes celulares, facilitándole al patógeno la invasión a los tejidos de la planta (13).

Ilieva (1971) encontró que las toxinas producidas por Botrytis cinerea fueron responsables de la abscisión de peciolo de frutos de tomate cuando éstos fueron inoculados artificialmente (13).

Uvcarov (1937) considera que la acumulación de tiourea en los tejidos parasitados por Botrytis cinerea podría ser responsable de amarillamiento de las hojas y por ende en una reducción en la actividad fotosintética (13).

Otras toxinas como ácidos cítrico y oxálico han sido consideradas por algunos investigadores rusos en la patogénesis de Botrytis cinerea en repollo. El efecto bioquímico de las

toxinas producidas por este hongo en los tejidos de repollo interfieren los procesos fotosintéticos (13).

La resistencia de algunas plantas a Botrytis cinerea ha sido atribuida a sustancias especiales en el hospedante, las cuales interfieren con el desarrollo y la multiplicación del patógeno. La resistencia química del tulipán a Botrytis cinerea y B. tulipae se debe a la presencia de tulipósidos (l-acylglicosidos) que son liberados por los pistilos. Bajo la influencia de Botrytis cinerea los tulipósidos pueden degradar las lactonas con una alta actividad antifúngica (12).

Jarvis (1975) confirma que hasta el momento no se han encontrado genes mayores de resistencia a Botrytis spp. en plantas ornamentales (12).

3. MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron flores cortadas tipo exportación, cultivadas bajo invernaderos, pertenecientes a las siguientes especies y variedades: Clavel (Dianthus caryophyllus), variedades Improved White, Lenna, CSU Red; Crisantemo (Chrysanthemum morifolium), variedades Red Flamenco, Firebrand, Blue Marble, Starsburst y Deep Telstar.

3.1 OBTENCION DE LOS CULTIVOS PUROS

Las flores con los síntomas típicos de la enfermedad, pequeñas manchas pardas y acuosas, se colectaron en cultivos ubicados en los municipios de Madrid y Mosquera. Estos materiales se colocaron por separado en cámaras húmedas con el fin de inducir la esporulación.

Se realizaron siembras del hongo en cajas de petri con papa-dextrosa-agar (PDA) como medio de cultivo hasta obtener aislamientos puros.

3.2 OBSERVACIONES MACROSCOPICAS

Los aislamientos se caracterizaron de acuerdo a la forma, elevación y color de la colonia, tipo de crecimiento y formación de esclerocios.

El estudio del crecimiento micelial consistió en siembras del hongo en tubos de ensayo de 20 cm de longitud, usando PDA como medio de cultivo los cuales se incubaron a una temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.3 OBSERVACIONES MICROSCOPICAS

- Con el fin de comprobar si todos los aislamientos obtenidos pertenecían a la especie Botrytis cinerea, se hizo estudio de tamaño y forma de conidias. En una lámina porta-objeto se tiñeron las conidias con azul de metileno, observando 50 conidias por aislamiento.

3.4 PRUEBAS DE PATOGENECIDAD

El propósito de esta prueba fué determinar la agresividad de los tipos morfológicos del patógeno, mediante la observación de los síntomas sobre cada variedad de clavel y crisantemo.

Además de conocer el tiempo de incubación del hongo en cada hospedante, se determinó la velocidad de avance de la enfermedad y la especificidad del hongo.

Para la realización de las pruebas de patogenicidad se seleccionaron de clavel las variedades Lenna de flores color rosado, Improved White de color blanco y CSU Red de color rojo.

En las pruebas de patogenicidad con crisantemos las variedades inoculadas fueron Deep Telstar de flores color morado, Fire Brand de color amarillo y Red Flamenco de color rojo.

En esta prueba se trabajó con flores en grado comercial de abertura, inoculando los pétalos externos de cada flor con el fin de facilitar las observaciones posteriores.

3.4.1 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones; la unidad experimental consistió en 9 enlermeyers de un litro de capacidad con tres (3) flores cada uno, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 1%, enjuagados y llenados con 600 ml de agua destilada estéril.

Los erlenmeyers con las flores se colocaron dentro de cámaras húmedas de madera de 1 metro de altura, 1.80 metros de largo, cubiertas en polietileno. Con el fin de medir la humedad y la temperatura dentro de las cámaras se utilizó un higrotermógrafo.

Cada 24 horas se realizaron medidas repetidas del número de pétalos afectados, tomando como base doce pétalos externos; sobre esta misma unidad se midió en solo tres pétalos, el área de los pétalos afectados. Las variables de respuesta fueron: Número de pétalos afectados ($n = 12$) y porcentaje de área floral afectada (3 pétalos).

3.4.2 Inoculaciones

De cada uno de los aislamientos obtenidos se preparó una suspensión con una concentración de 60.000 esporas por mililitro con ayuda de un hermacitómetro.

Una buena esporulación de los aislamientos se obtuvo en el medio de peptona-agar.

La inoculación se hizo con atomizadores plásticos, asperjando solo las partes externas del botón floral.

3.4.3 Evaluación de especificidad, tiempo de incubación y agresividad

Se diseñó una escala de patogenicidad para todos los hospedantes, con cinco grados de afección, porcentaje de área afectada (0-100%) y presencia o ausencia de esporulación (Tabla 1); estas observaciones se realizaron diariamente durante 9 días.

La agresividad del patógeno se determinó mediante la variación de los síntomas sobre cada hospedante, el tiempo de incubación de la enfermedad, el porcentaje de afección de los pétalos de clavel y del involucro del crisantemo.

Al término de 9 días y teniendo en cuenta el momento en que los testigos comenzaron a presentar la enfermedad por contaminación con los tratamientos inoculados, se realizó el patógeno con el fin de comprobar al final si tenía características iguales a los aislamientos utilizados en las pruebas iniciales.

TABLA 1 Escala de daño, porcentaje de área floral afectada y esporulación para la prueba de patogenicidad de Botrytis cinerea sobre variedades de Clavel y Crisantemo.

Escala	Sintomatología	% de área floral afectada
0 =	Sin síntomas visibles	0
1 =	Aparición de lesiones pequeñas	0 - 20
2 =	Desarrollo de lesiones y aparición de lesiones nuevas	21 - 40
3 =	Coalescencia y aparición de lesiones nuevas	41 - 60
4 =	Necrosis parcial y desarrollo de lesiones nuevas	61 - 80
5 =	Afección total	81 - 100

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 ESTUDIO MACROSCOPICO DE LOS AISLAMIENTOS

Los diecisiete aislamientos obtenidos de diferentes variedades de clavel y crisantemo se agruparon en tres tipos de acuerdo a la elevación y la coloración de la colonia, la formación de esclerocios y la intensidad de esporulación así:

Tipo Esporulante : Aislado de las variedades de clavel OSU Red, Exquisite, Pallas y Nhora. De variedades de crisantemo Starsburst, Jambori, Golden Polaris, White Marble, Don López y Super Yellow.

Tipo Esclerocial : Aislado de la variedad de clavel Improved White y de la variedad de crisantemo Red Flamenco.

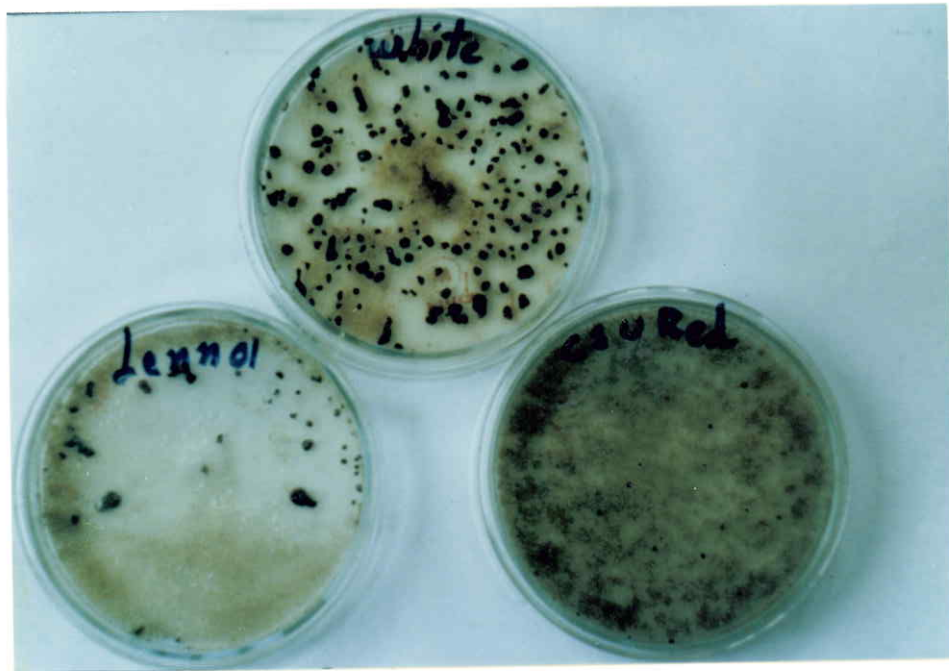
Tipo Intermedio entre los tipos Esporulante y Esclerocial:
Aislado de las variedades de clavel Lenna, Manon y de las

variedades de crisantemo Blue Marble, Florida Marble y Deep Telstar.

Sin embargo los aislamientos mostraron una gran variabilidad morfológica cuando fueron sometidos a condiciones similares de temperatura, luz y medios de cultivo. La variabilidad consistió principalmente en la elevación, forma y color de la colonia, lo mismo que en la formación de esclerocios.

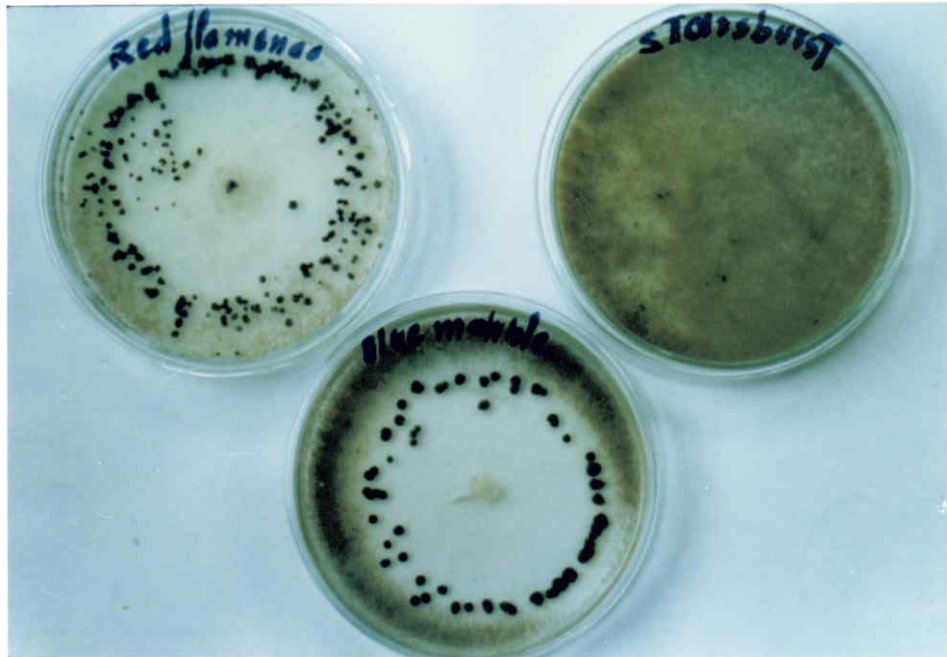
Los aislamientos pertenecientes al tipo Esporulante presentaron colonias algodonosas, altas y de color grisáceo; después de 20 días de incubación, las colonias formaron en los bordes del medio de cultivo esclerocios pequeños y redondeados.

Los aislamientos correspondientes al tipo Esclerocial presentaron colonias de poca elevación, deprimidas y de coloración crema. A los cuatro días de incubación las colonias formaron en todo el medio de cultivo esclerocios de color blanco que poco a poco se tornaron oscuros hasta tener un color negro; a los diez días todo el medio de cultivo estaba lleno de esclerocios grandes y pequeños, de forma irregular.



FOTOGRAFIA 1

Colonias de los tipos Esporulante (abajo derecha),
Esclerocial (arriba) e Intermedia (abajo izquierda),
aisladas de diferentes variedades de clavel.



FOTOGRAFIA 2

Colonias de los tipos Esporulante (arriba derecha), Esclerocial (arriba izquierda) e Intermedia (abajo), aisladas de diferentes variedades de crisantemo.

En el Tipo Intermedio se incluyeron los aislamientos que presentaron dos zonas de crecimiento: una algodonosa con abundante esporulación y otra deprimida con formación de esclerocios. Los esclerocios formados por las colonias de este tipo fueron grandes y pequeños de forma irregular.

4.2 CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS

Además de estudiar las características macroscópicas de los aislamientos, se hizo un estudio microscópico del hongo, criterio para la clasificación de las especies del género Botrytis. Una de las bases para la clasificación de estas especies es la forma y el tamaño de las conidias.

La variación del tamaño de las conidias de los diferentes aislamientos fué muy pequeña (Tabla 2).

El aislamiento Tipo Esclerocial de clavel presentó esporas de dimensiones más pequeñas (9.8 micras de largo x 6.8 micras de ancho), mientras que el aislamiento tipo Intermedio de Crisantemo presentó las conidias de mayores dimensiones (11.0 micras de largo x 8.2 micras de ancho).

De los resultados se concluye que las variaciones en tamaño de las conidias dependen posiblemente de la genética de cada

hospedero, pues se utilizaron condiciones similares de luz, temperatura y medio de cultivo.

Messinger, según Chaves y Henao (1982) consideró la dimensión y la forma de la conidia como valores dudosos en la taxonomía de Botrytis por las variaciones que pueden presentar las conidias debido al medio de cultivo (3).

4.3 PRUEBAS DE PATOGENECIDAD

En la Tabla 4 se observa que el período de incubación fué más corto cuando las variedades de clavel se inocularon con el aislamiento Tipo Esporulante, siendo la variedad Lenna en donde se presentó el período de incubación más corto (45 horas). Cuando las variedades de clavel se inocularon con el tipo Esclerocial, las variedades Lenna, CSU Red e Improved White mostraron los primeros síntomas a las 159 horas.

Cuando las variedades de clavel se inocularon con el aislamiento Tipo Intermedio, el período de incubación en la variedad Lenna fué de 96 horas, mientras que en la variedad Improved White y CSU Red, el período de incubación fué de 159 horas.

De acuerdo al tamaño de las conidias (Tabla 2), todos los aislamientos obtenidos pertenecen a la especie Botrytis cinerea (3).

TABLA 2 Tamaño de las conidias en micras de los diferentes aislamientos obtenidos en el medio de cultivo PDA.

Tipo de Aislamiento	Variedad	Tamaño de la conidia	
		Largo x	Ancho
Esporulante - Clavel	CSU Red	10.0	x 7.8
	Exquisite	10.1	x 7.8
	Pallas	10.0	x 7.5
	Nhora	10.0	x 7.8
Esclerocial - Clavel	Improved White	9.8	x 6.8
	Lenna	10.5	x 7.0
Intermedio - Clavel	Manon	10.6	x 7.2
	Starsburst	10.3	x 7.2
Esporulante - Crisantemo	Jambori	10.2	x 7.0
	Golden Polaris	10.3	x 7.0
	White Marble	10.0	x 7.2
	Super Yellow	10.0	x 7.2
	Don López	10.3	x 7.0
Esclerocial - Crisantemo	Red Flamenco	10.0	x 8.2
	Blue Marble	11.0	x 8.2
Intermedio - Crisantemo	Florida Marble	10.8	x 8.2

TABLA 3. Crecimiento micelial en centímetros de los aislamientos obtenidos de diferentes variedades de Clavel y Crisantemo en el medio de cultivo PDA a 22°C.

Tiempo de observación en horas	Variedades de Clavel				Variedades de Crisantemo				
	CSU Red Tipo	Imp. White Tipo	Lenna Tipo	Starsburst Tipo	Red Flamenco Tipo	Blue Marble Tipo	Esporulante Esclerocial	Intermedio Esclerocial	Intermedio
24	2.0	1.5	1.5	0.5	0.4	1.3			
48	3.0	2.8	3.0	1.5	1.0	4.0			
72	3.8	4.8	4.0	2.5	1.6	7.6			
96	4.8	5.3	5.0	3.0	5.0	10.0			
118	6.0	8.0	6.5	4.0	7.5	12.0			
142	7.2	10.0	8.0	5.0	8.3	13.0			
166	9.0	16.0	13.0	9.0	16.0	15.0			
214	16.0	-	16.0	11.0	-	16.0			
238	-	-	-	16.0	-	-			

En la Tabla 3 se observa que el Tipo Esporulante aislado de Clavel presentó el crecimiento micelial más rápido que el Tipo Esporulante aislado de Crisantemo, pues mientras ese aislamiento de Clavel creció 16.0 cm en 214 horas el de Crisantemo necesitó 238 horas para los 16.0 cm.

Los aislamientos Tipo Esclerocial aislados de Clavel y Crisantemo mostraron la misma tasa de crecimiento la cual fué de 16.0 cm en 190 horas.

Los aislamientos Tipo Intermedio aislados de Clavel y de Crisantemo presentaron la misma tasa de crecimiento 16.0 cm a las 214 horas.

Los aislamientos de tipo Esclerocial fueron los que más rápido formaron esclerocios.

El período de incubación en las tres variedades de Crisantemo fué el mismo cuando se inocularon con los aislamientos tipos Esporulante y Esclerocial, el cual fué de 65 horas.

El aislamiento tipo Intermedio ocasionó un período de incubación más largo. La variación en el período de incubación

fué menor en crisantemo que en clavel.

La Tabla 4 muestra que todos los aislamientos utilizados fueron patogénicos para las variedades de clavel y crisantemo estudiadas.

Los diferentes aislamientos fueron patogénicos en las tres variedades de clavel inoculadas; sin embargo se observaron variaciones tanto en su morfología como en su agresividad. (Tabla 6).

El aislamiento tipo Esporulante fué el más agresivo en flores de clavel siendo Lenna la variedad más afectada con un 93 % de daño después de 9 días de inoculación (Figura 1 y Fotografías 3 y 4). Esta misma variedad con el aislamiento tipo Esclerocial resultó afectada en un 77% (Figura 1 y Fotografía 5). El aislamiento tipo Intermedio solo afectó esta variedad en un 16% (Figura 1 y Fotografía 6).

La variedad de clavel Improved White también fué bastante afectada por el aislamiento tipo Esporulante presentando un 67% de área floral afectada. Con el aislamiento tipo

TABLA 4 Períodos de incubación de la enfermedad en horas en variedades de Clavel y Crisantemo.

Tipo de Inóculo	VARIEDAD		
	Lema	Improved White	CSU Red
CLAVEL			
Esporulante	45	72	48
Esclerocial	96	96	96
Intermedio	96	159	159
CRISANTEMO			
Esporulante	68	68	68
Esclerocial	68	68	68
Intermedio	92	92	68

TABLA 5 Análisis de varianza para promedios de área floral
afectada por variedad y por aislamientos.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	
Bloques	2	0.500	0.250	NS
Tratamientos	8	23055.623	2.881.952	**
Variedad (V)	2	3.703.418	1.851.709	**
Tipo de Aislante (A)	2	18.612.865	9.306.432	**
Variedad por tipo de Aislamiento A x V)	4	739.338	184.834	NS
Error	16	1.382.667		
TOTAL	26	24.438.79		

SN: No existe diferencia significativa

** : Hay diferencia significativa al nivel $\alpha = 0.01$.

Promedio de área floral afectada por variedad y por tipo de aislamiento.

Aislamiento	Bloque	VARIEDAD		
		Improved White	Lenna	CSU Red
Tipo Esporulante	1	68.3	96.5	41.6
	2	50.0	88.2	62.5
	3	70.0	95.7	60.0
Tipo Esclerocial	1	50.0	75.8	48.3
	2	42.5	90.8	45.0
	3	55.0	66.6	51.6
Tipo Intermedio	1	3.4	13.8	17.3
	2	4.7	29.8	0.0
	3	4.4	6.6	6.6

TABLA 6 Prueba de Duncan para promedio de área floral afectada por variedad y por tipo de aislamiento.

Variedad		Tipo de Aislamiento	Grado de Afección	Area floral Afectada (%)	
Lenna	x	Esporulante	5	93.46	a
Lenna	x	Esclerocial	4	77.73	ab
Improved White	x	Esporulante	4	67.76	bc
CSU Red.	x	Esporulante	3	54.70	bc
Improved White	x	Esclerocial	3	49.16	c
CSU Red	x	Esclerocial	3	48.30	c
Lenna	x	Intermedio	1	16.73	d
Improved White	x	Intermedio	1	7.96	d
CSU Red	x	Intermedio	1	4.16	d

Promedios con igual letra son iguales al nivel de $\alpha = 0.01$.

Esclerocial se presentó una afección del 49% del área floral. El aislamiento tipo Intermedio fué el menos agresivo de los tres (Figura 1 y Fotografía 7).

La variedad de clavel CSU Red fué la variedad menos afectada por los tres tipos de aislamientos; sin embargo el tipo Esporulante logró afectarla en un 54%. Con el aislamiento tipo Esclerocial, esta variedad mostró un porcentaje de área floral afectada de 48.30%, mientras que con el aislamiento tipo Intermedio fué de 4% (Figura 1, Fotografías 4, 5 y 6).

El aislamiento menos agresivo para las tres variedades de clavel fué el tipo Intermedio (Tabla 6).

A nivel estadístico el análisis de varianza (Tabla 5) no se registraron diferencias significativas para las interacciones Aislamiento por Variedad (A x V), aunque sí se presentaron para las principales fuentes de variación: Aislamiento (A) y Variedad (V).

Las pruebas de Duncan (Tablas 6 y 7) confirmaron que Lenna fué la variedad más afectada, encontrándose diferencias

TABLA 7 Prueba de Duncan para efecto de variedades de clavel sobre el porcentaje de área floral afectada.

Variedad	Promedio de área floral afectada (%)	
Lenna	62.642	a
Improved White	38.699	b
CSU Red	36.988	b

Prueba de Duncan para efecto de tipos de aislamientos sobre el porcentaje de área floral afectada.

Tipo de aislamiento	Promedio de área floral afectada (%)	
Esporulante	70.31	a
Esclerocial	58.39	a
Intermedio	9.62	b

Promedios con igual letra no tienen diferencia significativa al nivel de $\alpha = 0.01$.

TABLA 8 Análisis de varianza para promedios de números de pétalos afectados por variedad y por aislamiento.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio
Bloques	2	3.138	1.569
Tratamientos	8	361.883	45.235 xx
Variedad (V)	2	88.800	44.400 xx
Tipo de Aislamiento (A)	2	241.460	120.730 xx
V x A	4	31.622	7.905 xx
Error	16	7.280	0.455
TOTAL	26	372.302	

xx : Hay diferencia significativa al nivel de $\alpha = 0.01$.

significativas entre esta variedad y las variedades Improved White y CSU Red cuando se inocularon con los aislamientos tipo Esporulante y Esclerocial; sin embargo no hubo diferencias significativas entre la variedad Improved White y CSU Red.

Las pruebas de Duncan (Tabla 7 y Figuras 2 y 3) demostraron que el aislamiento tipo Esporulante fué el más agresivo de las tres y que la variedad Lenna fué la más susceptible.

Las variedades con mayor número de pétalos afectados fueron Improved White y Lenna 9 días después de inoculación con el aislamiento tipo Esporulante (Tabla 9 y Figura 4); de la misma manera cuando se inocularon con el aislamiento tipo Esclerocial, fueron las variedades más afectadas.

La variedad de clavel con menor número de pétalos afectados fué CSU Red con el aislamiento tipo Intermedio.

A nivel estadístico los análisis de varianza (Tabla 8) registraron diferencias significativas para las interacciones Aislamiento por Variedad (A x V), como para las principales

fuentes de variación: Aislamiento (A) y Variedad (V).

Las pruebas de Duncan (Tablas 9 y 10) demostraron que no se presentaron diferencias significativas entre el número de pétalos afectados de la variedad Lenna y la variedad Improved White cuando se inocularon con los aislamientos tipo Esporulante y Esclerocial, pero sí se presentaron diferencias significativas entre éstas dos variedades y la variedad CSU Red, menos afectada por estos aislamientos.

Cuando las variedades fueron inoculadas por el aislamiento Tipo Intermedio, el análisis estadístico demostró que no se presentaron diferencias significativas entre las variedades Improved White y CSU Red, pero sí entre estas dos variedades y la variedad Lenna (Tabla 9).

Las pruebas de Duncan para efecto de variedades y aislamientos sobre promedios de número de pétalos afectados (Tabla 10, Figuras 5 y 6) confirmaron que la variedad más afectada fué Lenna y que el aislamiento tipo Esporulante fué el más agresivo, aunque no se presentaron diferencias significativas entre éste y el tipo esclerocial.

TABLA 9 Prueba de Duncan para promedios de números de pétalos afectados por variedad y por aislamiento.

Variedad		Tipos de Aislamiento	Promedios de números de pétalos afectados	
Improved White	x	Esporulante	11.53	a
Lenna	x	Esporulante	11.33	a
Improved White	x	Esclerocial	10.06	ab
Lenna	x	Esclerocial	9.30	bc
CSU Red	x	Esporulante	8.40	bcd
Lenna	x	Intermedio	7.20	de
CSU Red	x	Esclerocial	5.86	e
Improved White	x	Intermedio	2.80	f
CSU Red	x	Intermedio	0.55	f

Promedios con igual letra no tienen diferencia significativa al nivel de $\alpha = 0.05$.

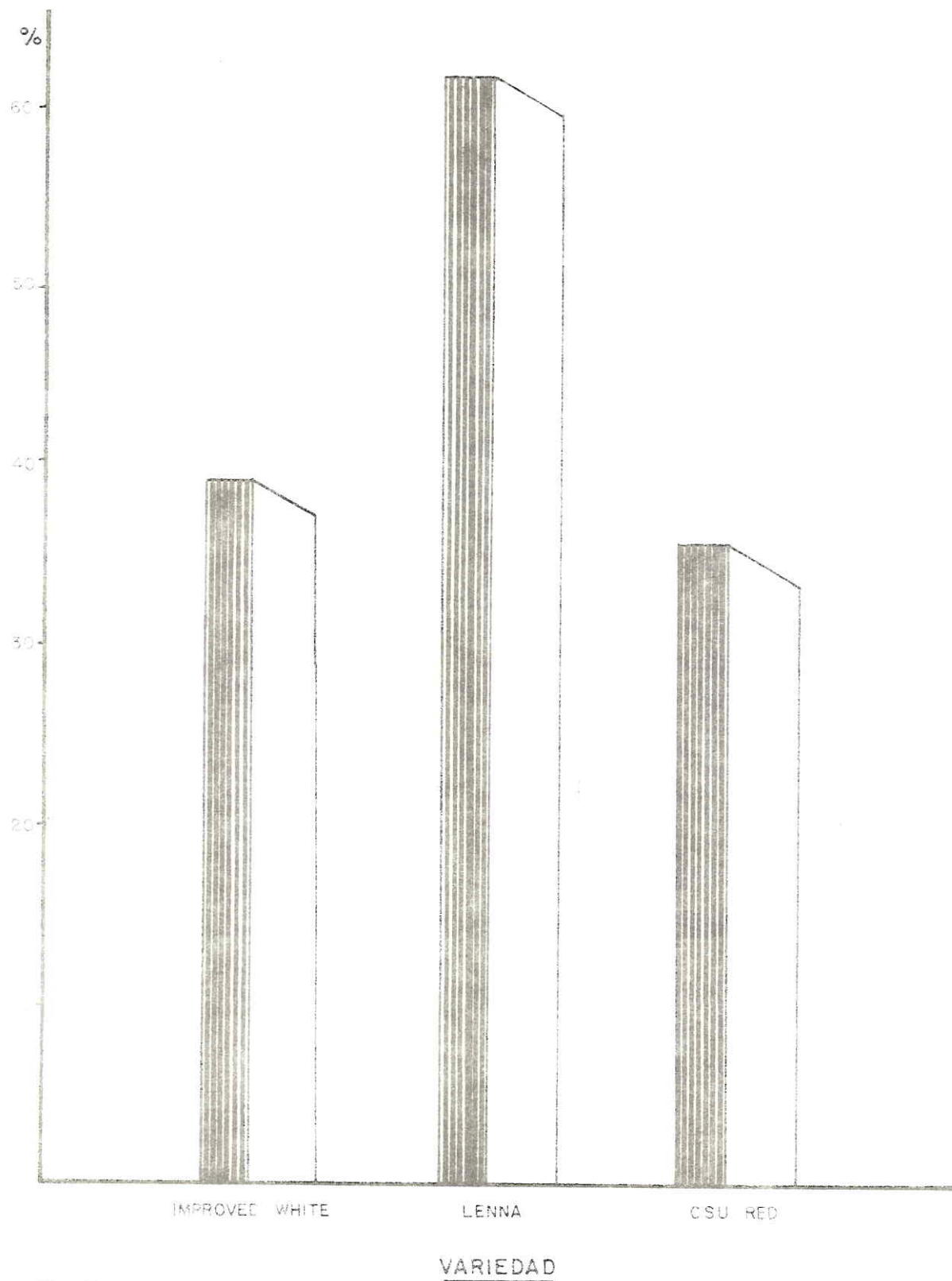


Fig. 2:

Porcentaje promedio de Area Floral afectada por Variedad, (ciavel)

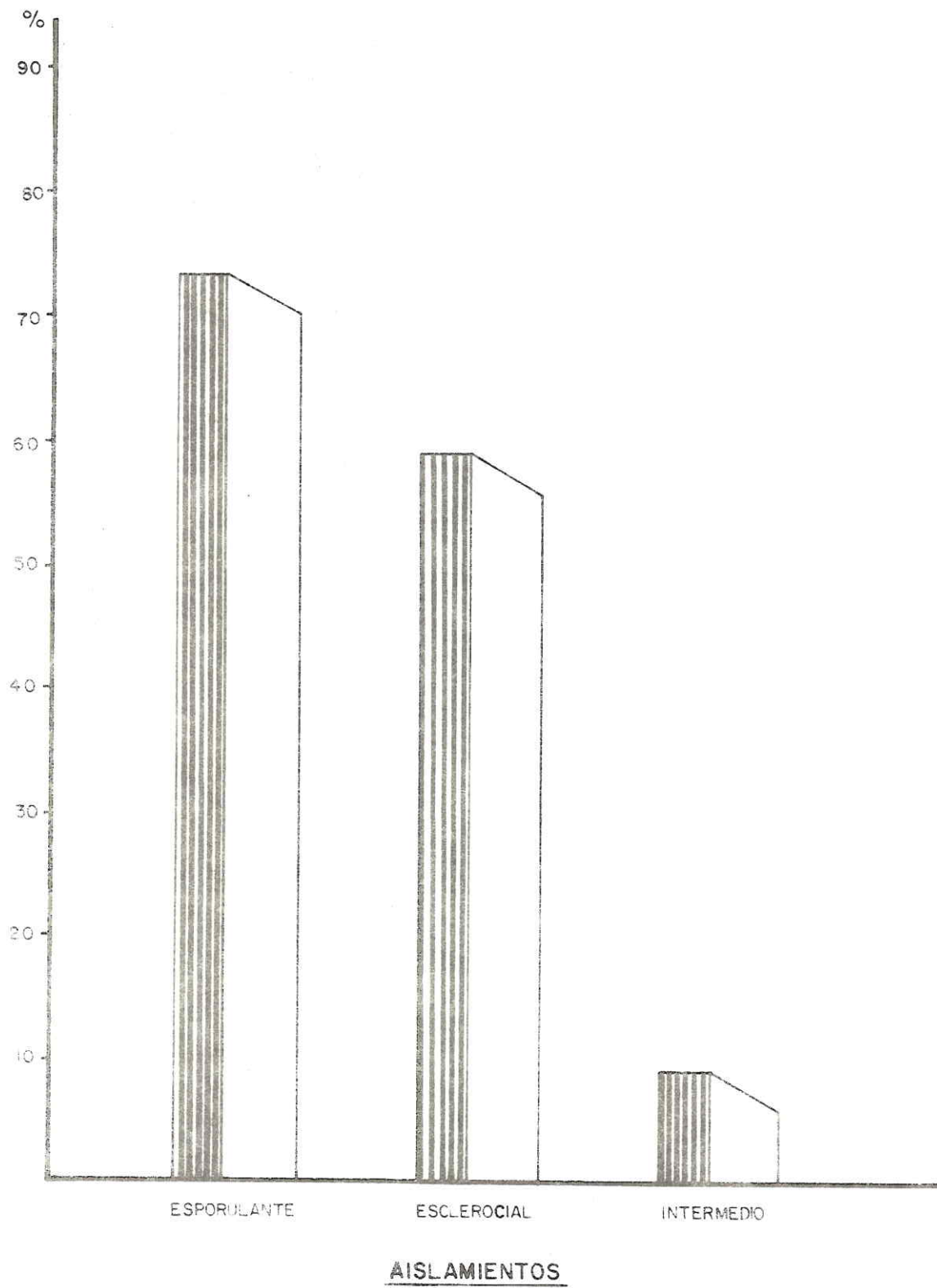


Fig. 3: Promedio de Area Floral , en porcentaje por Aislamiento. (CLAVEL).

Nº. Pétalos

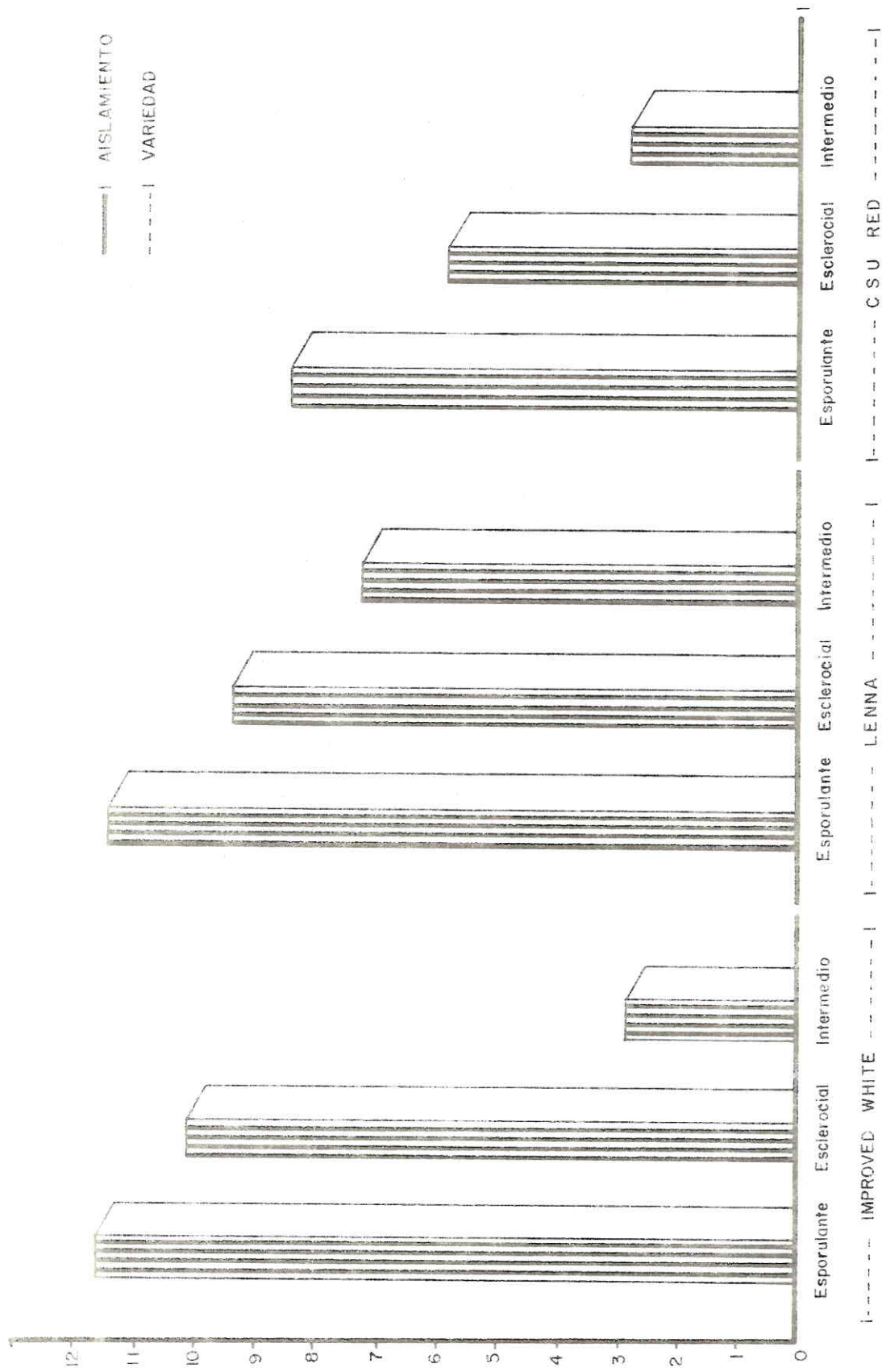


Fig. 4: Promedio de número de pétalos afectados por Variedad y por Tratamiento. (CLAVEL).

TABLA 10 Prueba de Duncan para efecto de variedades sobre el promedio del número de pétalos afectados.

Variedad	Promedio de número de pétalos afectados	
Lenna	9.27	a
Improved White	7.93	a
CSU Red	4.93	b

Prueba de Duncan para efecto de tipos de aislamientos sobre el promedio del número de pétalos afectados.

Tipos de Aislamiento	Promedio del número de pétalos afectados	
Esporulante	10.42	a
Esclerocial	8.40	a
Intermedio	3.31	b

Promedios con igual letra no tienen diferencia significativa al nivel de $\alpha = 0.05$.

Nº Petalos.

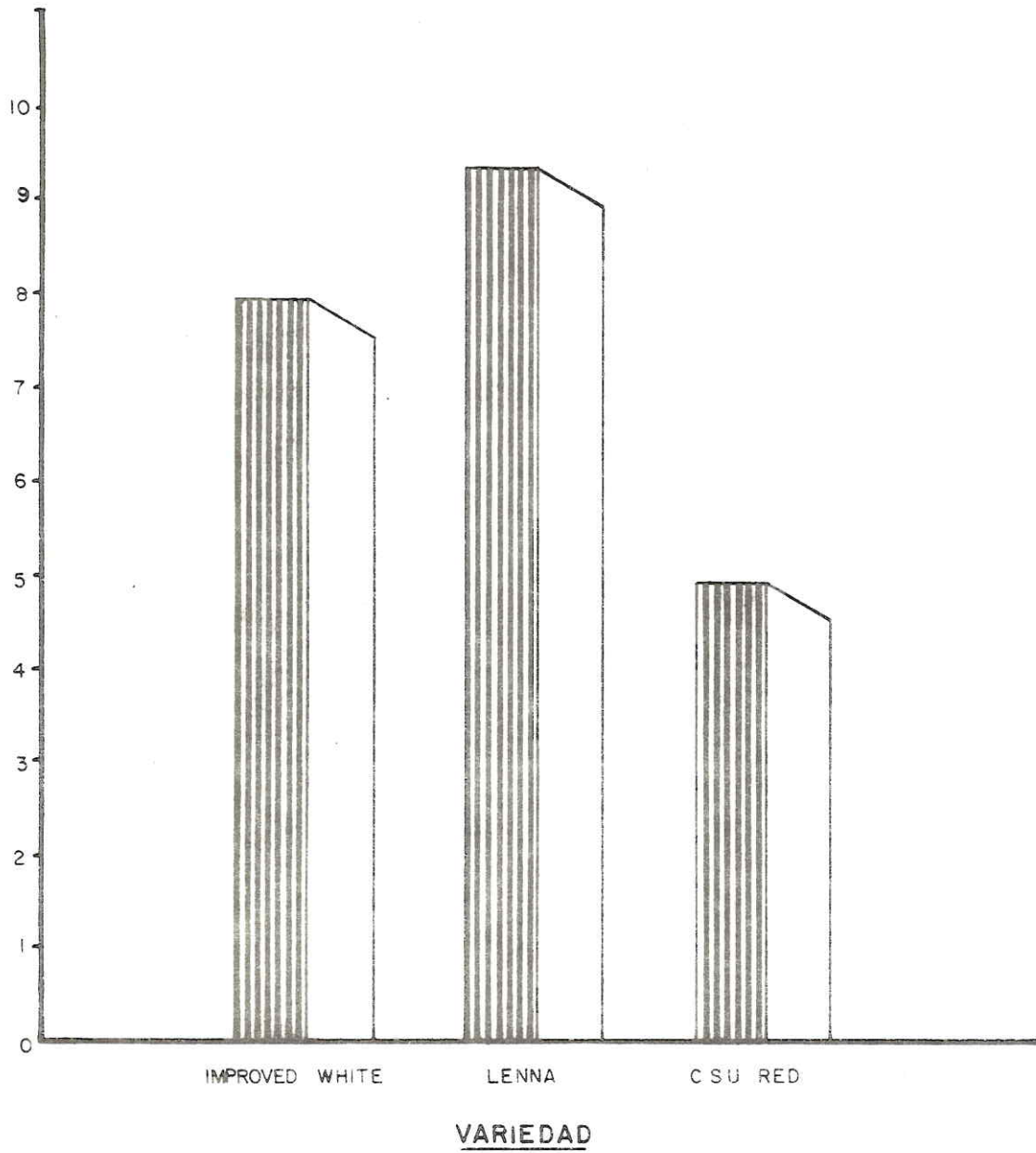


Fig. 5: Promedio de Número de Petalos afectados por Variedad. (CLAVEL).

Nº Petalos.

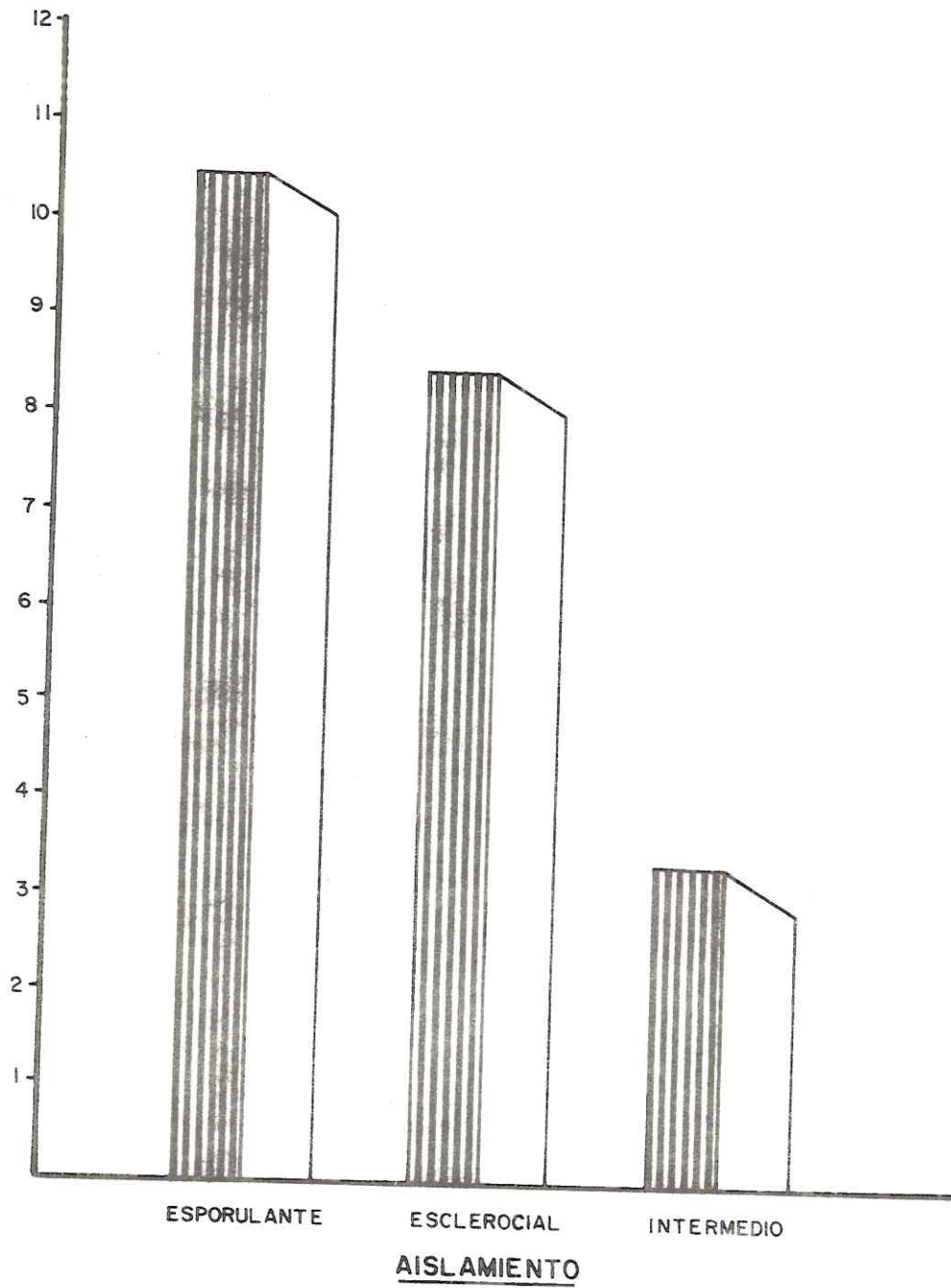


Fig. 6: Promedio de Número de Petalos afectados por Aislamiento.
(CLAVEL).

Se presentaron diferencias significativas entre el número de pétalos afectados de la variedad CSU Red y las variedades Lenna e Improved White.

La afección en crisantemo se midió en el cáliz (involucro), pues la enfermedad no se presentó en los pétalos sino apenas en el involucro (Tabla 11 y Figura 7).

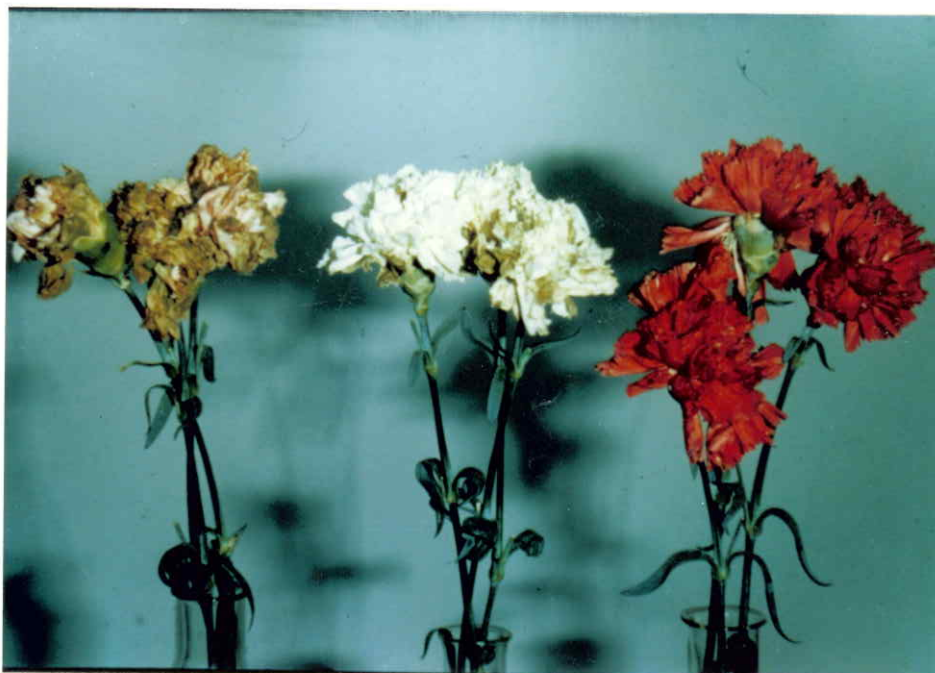
El aislamiento tipo Esporulante fué el más agresivo en flores de crisantemo, como ocurrió en flores de clavel. La variedad Red Flamenco fué la variedad más afectada con un 80% de afección, presentándose además el cabeceo de la flor después de 9 días de inoculación (Fotografía 8). Esta misma variedad inoculada con el aislamiento tipo Esclerocial resultó afectada en un 70% presentándose también cabeceo de la flor. El tipo Intermedio fué el aislamiento menos agresivo causando un cabeceo moderado de la flor con porcentaje de afección de 50% a los 9 días de inoculación (Fotografía 9).

La variedad Deep Telstar cuando se inoculó con el aislamiento tipo Esporulante presentó un 65% del involucro afectado ocasionando cabeceo de la flor, pero cuando se inoculó con



FOTOGRAFIA 3

Síntomas en flores de clavel de la variedad Lenna
inoculadas con el aislamiento Tipo Esporulante.



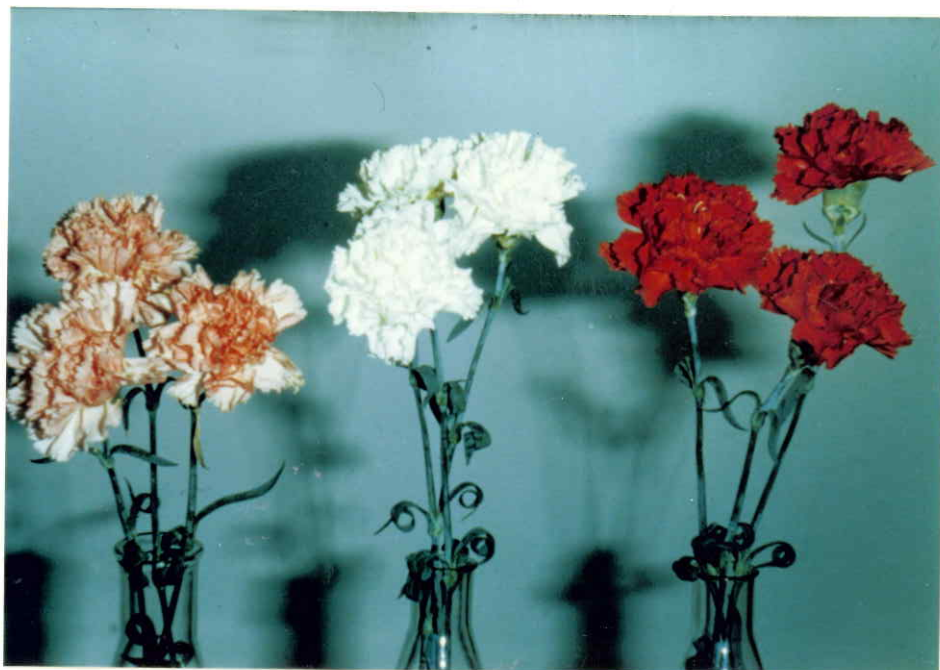
FOTOGRAFIA 4

Síntomas en las variedades Lenna (izquierda), Improved White (centro) y CSU Red (Derecha) a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Esporulante.



FOTOGRAFIA 5

Síntomas en las variedades Lenna (izquierda), Improved White (centro) y CSU (derecha) a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Esclerocia.



FOTOGRAFIA 6

Síntomas en las variedades Lenna (izquierda), Improved White (centro) y CSU Red (derecha) a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Intermedio.



FOTOGRAFIA 7

Síntomas en flores de clavel de la variedad Improved
White inoculadas con los Tipos Esporulante (izquierda)
Esclerocial (centro) e Intermedio (derecha).

TABLA 11 Resultados de las pruebas de patogenicidad en Crisantemo a los nueve días de inoculación.

Tipo de Aislamiento	Variiedad	% de involucro afectado	Grado de Afección	Esporulación	Síntomas en la flor
Esporulante	Red Flamenco	80	4	+	Cabeceo
	Deep Telstar	65	4	+	Cabeceo
	Fire Brand	53	3	+	Cabeceo moderado
Esclerocical	Red Flamenco	70	4	+	Cabeceo
	Deep Telstar	28	2	+	Distorsión leve
	Fire Brand	30	2	+	Distorsión fuerte
Intermedio	Red Flamenco	50	3	+	Cabeceo moderado
	Deep Telstar	20	1	+	No hubo distorsión
	Fire Brand	20	1	-	No hubo distorsión

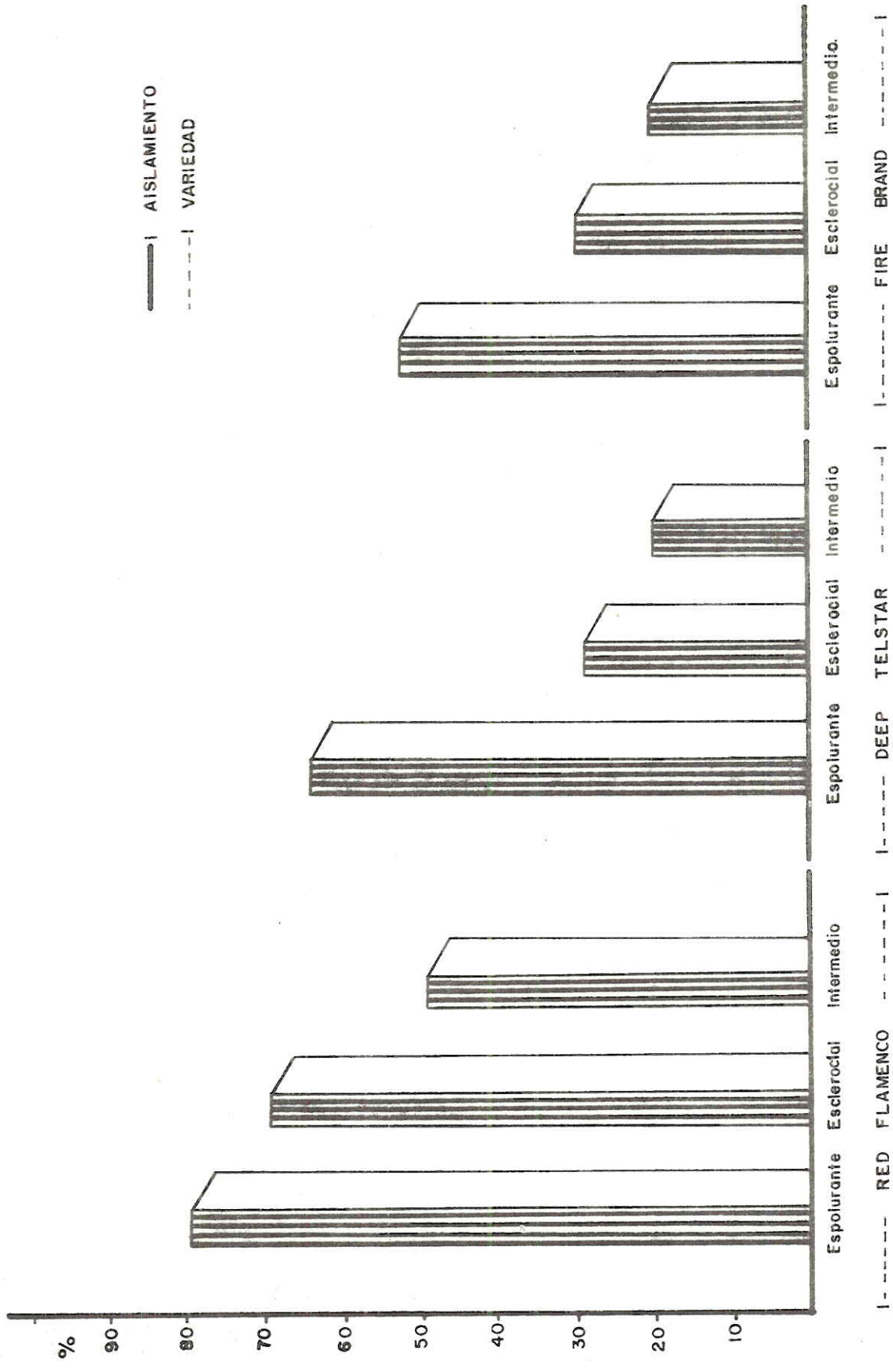


Fig. 7: Porcentaje de involucro afectado por VariEDAD y por Aislamiento. (CRISANTEMO)

el aislamiento tipo Esclerocial solo alcanzó un 28% de afectación en el involucro y solamente ocasionó una distorsión leve de la flor. El aislamiento tipo Intermedio no logró distorsionar la flor (Fotografía 10).

La variedad Fire Brand fue la variedad de crisantemo menos afectada por el patógeno, aunque el tipo Esporulante la afectó ocasionando un cabeceo moderado y el tipo Esclerocial distorsionó la flor (Figura 7, Fotografías 11, 12 y 13).

Los resultados demostraron que la variedad de crisantemo más afectada fue la Red Flamenco. Las variedades Deep Telstar y Fire Brand fueron las menos afectadas. El aislamiento tipo Esporulante fue el más agresivo y el aislamiento tipo Intermedio el menos agresivo para las tres variedades de crisantemo.

La enfermedad no progresó en los pétalos de las flores del crisantemo, sino que afectó únicamente el involucro y el pedúnculo floral. En las variedades de clavel el patógeno solamente afectó los pétalos pero no el cáliz.

Al respecto se cree que por estar cubierto tanto el cáliz como el tallo y las hojas del clavel, de una gruesa capa de cera (Fotografía 14), ésta actúe como repelente del agua impidiendo así la penetración del hongo en estas partes de la planta; es posible también que esta capa de cera actúe como protector mecánico a la penetración del hongo.

El clavel pertenece a la familia Caryophyllaceae y el crisantemo a las Compositae y por lo tanto sus flores presentan una morfología, anatomía y aún una genética diferentes.

En cortes a nivel de pedúnculo floral se encontraron diferencias en cuanto a las capas de parénquima y colénquima, siendo estas capas más numerosas en el crisantemo; no se conoce que implicación puedan tener estas capas en la colonización de los tejidos por el hongo; es posible también que sustancias presentes en los pétalos de crisantemo actúen como inhibidores del desarrollo del patógeno.



FOTOGRAFIA 8

Cabeceo de la flor y esporulación en el cáliz de la variedad Red Flamenco inoculadas con el aislamiento Tipo Esporulante.



FOTOGRAFIA 9

Síntomas en flores de Crisantemo de la variedad Red Flamenco inoculadas con los Tipos Esporulante (izquierda), Esclerocial (centro) e Intermedio (derecha).



FOTOGRAFIA 10

Síntomas en flores de Crisantemo de la variedad Deep Telstar inoculadas con los Tipos Esporulante (izquierda), Esclerocial (centro) e Intermedio (derecha).



FOTOGRAFIA 11

Síntomas en flores de Crisantemo de la variedad Fire
Brand a los 9 días de inoculación con el aislamiento
Tipo Esporulante.



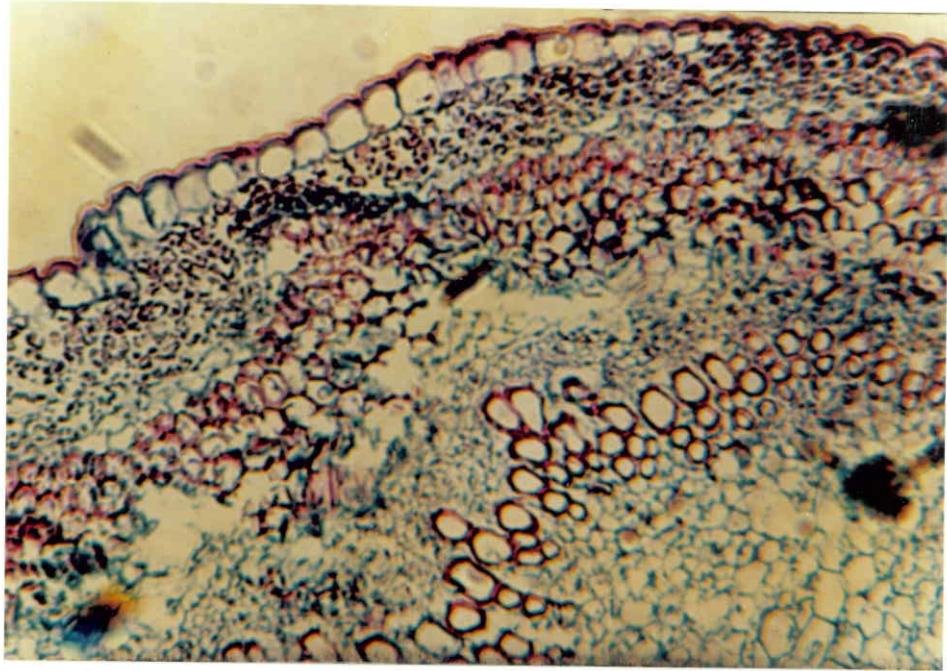
FOTOGRAFIA 12

Síntomas en flores de Crisantemo de la variedad Fire Brand a los 9 días de inoculación con el aislamiento Tipo Esclerocial.



FOTOGRAFIA 13

Síntomas en flores de Crisantemo de la variedad Fire
Brand a los 9 días de inoculación con el aislamiento
Tipo Intermedio.



FOTOGRAFIA 14

Corte de pedúnculo floral de clavel donde se observa en la epidermis una gruesa capa de cera.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 5.1 Se encontraron tres tipos de aislamientos de Botrytis cinerea en variedades de clavel y crisantemo: Tipo Esporulante, Tipo Esclerocial y Tipo Intermedio entre Esporulante y Esclerocial.
- 5.2 Los tres tipos de aislamientos presentaron variaciones morfológicas. La variabilidad consistió principalmente en la elevación, forma y color de la colonia, formación de esclerocios y tamaño de las conidias.
- 5.3 No se encontró relación entre la tasa de crecimiento micelial en el medio de cultivo y la patogenicidad. El aislamiento tipo Esclerocial mostró una tasa de crecimiento más rápida y no fué el de mayor agresividad en variedades de clavel y crisantemo.
- 5.4 Se encontró una relación entre el período de incubación y la

patogenicidad del hongo. Los aislamientos tipo Esporulante y Esclerocial fueron más agresivos y presentaron el período de incubación más corto. Por el contrario el aislamiento tipo Intermedio fué el menos agresivo para las variedades de clavel y crisantemo y presentó el período de incubación más largo.

- 5.5 Los aislamientos de Botrytis cinerea de variedades de clavel y crisantemo presentaron diferencias patogénicas, con una mayor agresividad del aislamiento tipo Esporulante. El aislamiento tipo Esclerocial fué igualmente agresivo; a nivel estadístico no se encontraron diferencias significativas entre la agresividad de esos dos aislamientos.
- 5.6 Se comprobó que el aislamiento menos agresivo para las variedades de clavel y crisantemo estudiadas fué el tipo Intermedio.
- 5.7 La variedad de clavel más susceptible al ataque por Botrytis cinerea fué la variedad Lenna y la más resistente CSU Red. Así mismo la variedad de Crisantemo más susceptible fué Red Flamenco y la más resistente Fire Brand.

- 5.8 No se observó especificidad patogénica y los diferentes aislamientos no fueron más agresivos al ser inoculados en el hospedero originalmente aislado. Esto demuestra la amplia patogenecidad de la especie Botrytis cinerea.
- 5.9 A nivel estadístico los análisis de varianza mostraron diferencias en susceptibilidad de las variedades de clavel; esto confirma que no existe uniformidad genética en las variedades, pues en algunas se observó cierto grado de resistencia a la enfermedad.
- 5.10 Se concluye que hay razas patogénicas de Botrytis cinerea en variedades de clavel y crisantemo. Los diferentes aislamientos se probaron en base a la patogenecidad y a los tipos de reacción sobre diferentes hospederos de una misma especie.
- 5.11 Se comprobó que la especie Botrytis cinerea en variedades de clavel ataca los pétalos; sin embargo en variedades de crisantemo afecta el involucro y pedúnculo floral.

- 5.12 Se recomiendan estudios bioquímicos para la determinación de las razas fisiológicas, como la cuantificación de la pectinasa y poligalacturonasa existente en cada uno de los tipos de aislamientos.

6. RESUMEN

Para la realización del estudio sobre la presencia de posibles razas fisiológicas del hongo Botrytis cinerea se utilizaron flores cortadas tipo exportación, cultivadas bajo invernaderos, pertenecientes a las siguientes especies y variedades: Clavel (*Dianthus caryophyllus*), variedades Improved White, Lenna, CSU Red; Crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*), variedades Red Flamenco, Fire Brand y Deep Telstar.

Las flores con los síntomas típicos de la enfermedad se colectaron en cultivos ubicados en los municipios de Madrid y Mosquera. Después de aislado el patógeno, se hicieron estudios macroscópicos y microscópicos y se determinó la tasa de crecimiento micelial. Las diferencias encontradas en los aislamientos obtenidos permitieron separarlos en tres tipos: Esporulante, Esclerocial e Intermedio entre Esporulante y Esclerocial.

De cada uno de los aislamientos se preparó una suspensión de esporas y se inocularon las variedades de clavel como de crisantemo.

Para las pruebas de patogenicidad se utilizó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Cada 24 horas se hicieron lecturas del número de pétalos afectados tomando sobre estos mismos el área afectada. Se midió período de incubación de la enfermedad en cada variedad.

No se encontró una relación entre el período de incubación y la patogenicidad del hongo. Los aislamientos tipo Esporulante y Escle-rocial fueron más agresivos y presentaron el período de incubación más corto. Por el contrario el aislamiento tipo Intermedio fué el menos agresivo para las variedades de clavel y crisantemo y presentó el período de incubación más largo.

La variedad de clavel más susceptible al ataque por Botrytis cinerea fué la variedad Lenna y la más resistente CSU Red. Así mismo la variedad de crisantemo más susceptible fué Red Flamenco y la más resistente Fire Brand.

No se observó especificidad patogénica. Esto demuestra la amplia patogenicidad de la especie Botrytis cinerea.

Los aislamientos mostraron diferencias en patogenicidad. Se concluyó que existen razas patogénicas del hongo Botrytis cinerea en variedades de clavel y crisantemo.

SUMMARY

To realize the investigation about the presence of possible physiological races of the fungus Botrytis cinerea, there were utilized cut flowers (type for exportation) of the following species and varieties: carnation (Dianthus caryophyllus), varieties Improved White, Lenne and CSU Red; chrysanthemum (Chrysanthemum morifolium), varieties Red Flamenco, Fire Brand and Deep Telstar.

Flowers with the typical symptoms of the illness were collected in plantations situated in the municipalities Madrid and Mosquera. After the isolation of the pathogenous fungus, there were made macro- and microscopic studies and determinations of the rate of the mycelic growth. The differences found in the isolated samples, allowed to divide them in 3 types: "esporulante", "esclerocial" and the intermediate type between the two.

From each one of the isolated samples there were prepared suspensions of spores and inoculated into the different varieties of carnation and chrysanthemum.

To prove the pathogenity, there was utilized a design of bloques at random, with 3 repetitions. Each 24 hours there were made lectures of the number of affected petals, observing the affected surface of each one. It was measured the period of incubation of the illness in each variety.

A relation between the period of incubation and the pathogenity of the fungus could not be demonstrated. The isolated samples of the type "esporulante" and "esclerocial" were more aggressive and needed a shorter period of incubation. By way of contrast, the isolated samples of the intermediate type were less aggressive for the varieties of carnation and chrysanthemum and needed a longer period of incubation.

The variety of carnation more sensitive to be attacked by Botrytis cinerea was Lenne and the more resistant CSU Red. In chrysanthemum the more sensitive variety was Red Flamenco and the more resistant Fire Brand.

Pathogenic specification was not observed. That shows the wide pathogenity of the species Botrytis cinerea.

The isolated samples showed differences in pathogenity. It can be concluded that there exist pathogenic races of the fungus Botrytis cinerea in varieties of carnation and chrysanthemum.

7. BIBLIOGRAFIA

1. CLARK, C. A.; LORBER, J. A. Reaction of onion cultivares to Botrytis brown stain. Plant Disease. Reporter (Estados Unidos) V. 57 no. 3, p. 210-214. 1973.
2. CHASTAGNER, J. F.; OGAWA, S. M. Dispersal of conidia of Botrytis cinerea in tomato fields. Phytopathology (Estados Unidos) V. 69, p. 1172-1176. 1978.
3. CHAVES, J. F.; HENAO, J. Estudio del poder patogénico de Botrytis cinerea sobre cinco especies de flores de exportación. Bogotá, Universidad Nacional, Facultad de Agronomía, 1981. 95 p. (Tesis Ing. Agr.)
4. DIXON, G.R.; DOODSON, J. K. Technique used for testing dwarf french bean cultivars for resistance to grey-mould (Botrytis cinerea). Journal on the National Institute of Agriculture Botany (Inglaterra) V. 13 no. 3, p. 338-341. 1975.

5. DOWSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. Compendium of soil fungi. London, Academic Press, 1980. p. 149-154.
6. EPTON, H. A.; RICHMOND, V. D. Formation, structure and germination of conidia. Inglaterra, University of Manchester, 1980. p. 41-64.
7. GARCIA, A. M. Patología vegetal práctica, México, Limusa - Wiley, 1973. 164 p.
8. GONZALEZ, L. C. Introducción a la Fitopatología. San José, IICA, 1979. p. 32.
9. HENNEBERT, G. L. The principles of taxonomy in the form-genus Botrytis. Bélgica, Commun. To its Int. Mycol Congr., 1971.
10. HORST, R. K.; NELSON, P. E. Diseases of chrysanthemum. Plant. Sc. Plant. Pathology (New York) V. 8, p. 15-16. 1976.
11. HUNTER, J. E.; ROHRBACH, K. G.; KUNIMOTO, R. K. Epidemiology of Botrytis Blight of macadamia Racemes. Phytopathology (Estados Unidos), V. 62, p. 316-319. 1971.

12. HUNTER, J. E.; ROHRBACH, K. G.; KUNIMOTO, R. K.
Reduction of macadamia Nut Set by Botrytis cinerea
Phytopathology (Estados Unidos). V. 63, no. 1, p.939-941.
1973.
13. JARVIS, W. R. Botryotinia and Botrytis species: Taxonomy
physiology and pathogenicity. Canadá, Department of
Agriculture, Monograph No. 15, 1977. 194 p.
14. _____ The biology of Botrytis - taxonomy. Canadá,
Agriculture Research Station. Serie. 1981. 17 p.
15. _____ The biology of Botrytis: epidemiology. Canadá
Agriculture Research Station. Serie 1981. 16 p.
16. KIRALY, Z. Z.; KLEMENT, F.; SOLYMOS, T.; VOROS, J.
Methods in Plant Pathology. Budapest, Academiae Kiado,
1970. p. 291-304.
17. LEIF, S. Botrytis fabae, B. cinerea and Ascochyta fabae
on broad bean (*Vicia faba*) in Norway. Acta Agriculture
Scandinavia. V. 23 no. 1, p. 43-51. 1973.

18. LORBEER, W. J. Variation in Botrytis and Botryotinia.
New York, Plant Pathology, 1981. p. 19-35.
19. McKEEN, W. E. Mode of penetration of epidermal cell walls
of Vicia faba by Botrytis cinerea. Phytopathology (Estados
Unidos) V. 64 no. 4, p. 461-467. 1974.
20. PATIÑO, H. Enfermedades del cultivo del clavel y su con-
trol. Bogotá, ICA. Programa de Sanidad Vegetal,
1971. p. 17 (Publicación No. 15).
21. PIRSON, A. G.; ZIMMERMAN, M.H. Phytopathogens
which produce phytotoxic compound. Physiological plant
pathology (Estados Unidos), V. 4. p. 293-297. 1976.
22. SALMERON, D. H. Crisantemos. Hojas Divulgativas
(España) no. 23-24, 75 HD, 24 p. 1975.
23. SCHOMBERK, F.; SCHROEDER, J.C. Role of antimicro-
bial substances (Tuliposides) in Tulipa attacked by Botrytis
spp. Physiological Plant Pathology (Estados Unidos)
V. 2, p. 91-99. 1972.

24. SCHOMBERK, F.; SCHLOSSER, E. Preformed substances as potential protectants. *Physiological and Plant Pathology* (Estados Unidos) V. 4, p. 653-658. 1976.
25. SOMMER, N. F.; FORTLAGE, J. Reduction of postharvest losses of strawberry fruit from gray mold. *Journal of the American Society for Horticultural Science* (Estados Unidos). V. 98 no. 3, p. 285-288. 1973.
26. VERHOEFF, K. Latent infection by fungus. *Annual Review of Phytopathology* (Estados Unidos) V. 12, p. 99-100. 1974.
27. VAN DER PLANK, J. K. Principles of plant infection. New York, Academic Press, 1976. 216 p.
28. YODER, O. C.; WHALEN, M. L. Variation in virulence of Botrytis cinerea isolates to stored cabbage. *Phytopathology* (Estados Unidos) V. 63 no. 2, p. 210. 1973.