

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

**DIAGNOSTICO DEL AGENTE CAUSAL DE LA
RANCHA DE LA AZUCENA (*Lilium candidum L.*)**

Autor :
Bach. Eisen Carlos Usquiza Cruz

Asesor :
PhD. Pedro Javier Mansilla Córdova

Coasesor:
MSc. Walter Daniel Sánchez Aguilar

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A mis padres

Por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, que sin ellos no hubiera logrado una meta en la vida profesional.

A mis amigos

Que aman la ciencia, en sus diferentes ramas contando con amplia experiencia y profesionalismo, siempre apoyando con sus puntos de vistas y de mentalidad abierta.

A la comunidad científica de la UNTRM

Que viene innovando y creando ciencia, con la visión de liderazgo en investigación científica.

A la comunidad de Taquia

Debido a la actividad económica que realizan (Producción de flores de azucenas), que tienen necesidad de investigación para mejorar su producción.

AGRADECIMIENTO

A DIOS, por darme la vida, la sabiduría a lo largo del estudio, así como la fortaleza para seguir mis retos.

A mis padres Genaro Usquiza Torres y Dina de Jesús Cruz Torrejón, mis hermanos Daniel e Inés por ser de apoyo moral, entusiasmo que me brindaron para seguir adelante en mis retos.

Al "Proyecto de Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, al "Banco Mundial", y al "FONDECYT/CONCYTEC", a través del cual se ejecutó el subproyecto "Implementación de técnicas de diagnóstico de enfermedades en Pitahaya (*Hylocereus* spp.), Tara (*Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze) y Azucena (*Lilium* spp.) como parte de la creación de la Clínica Fitopatológica en la región Amazonas", también conocido como "Clínica Fitopatológica" y que hizo posible el financiamiento de la tesis, así como el incentivo recibido durante 11 meses.

Al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDESCES), por el apoyo de todos los que la conforman, incluyendo a su director, el Msc. Segundo Oliva, así como por la infraestructura que hizo posible la ejecución de este trabajo.

Al Dr. Carlos Millones por permitir el uso del área protegida para el mantenimiento de las plantas de azucena.

A mi asesor de tesis PhD. Pedro Javier Mansilla Córdova, por el apoyo en el desarrollo del proyecto de tesis y ejecución de la tesis, con sus sugerencias y experiencia, la motivación, las buenas prácticas profesionales, éticas, consejos y la consideración. Así mismo a mi co-asesor MSc. Walter Daniel Sánchez Aguilar, por sus sugerencias y acompañamiento en el desarrollo de la tesis.

A Ruddy, Danny, Erik, María y Kleiber. por su esmero y dedicación que pusieron al colaborar con los ensayos, incondicionalmente.

A la Asociación de productores de azucena cruz de mayo -Taquia y a la empresa SLAMP S.A.C, por la confianza y el apoyo brindado para el acceso a sus plantaciones de lirios híbridos mediante el Ing Jhordy Sanchez Alvarado.

A la comunidad de taquia por permitirme el acceso y las facilidades a sus plantaciones de azucenas, en los cuales se realizaron las evaluaciones y muestreos. Gracias.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO
RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

Rector

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

Vicerrector Académico

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

Vicerrectora de Investigación

Dr. ERICK ALDO AUQUIÑIVÍN SILVA

Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS

El docente de la UNTRM-A que suscribe, hace constar que ha asesorado la tesis titulada “**Diagnóstico del agente causal de la rancha de la azucena (*Lilium candidum*)**”, del bachiller en ingeniería Agrónoma egresado de la Escuela Profesional de ingeniería Agrónoma de la UNTRM-A.

Bach. Eisen Carlos Usquiza Cruz

El docente de la UNTRM-A que suscribe da su Visto Bueno para que la tesis mencionada sea presentada al jurado evaluador, manifestando su voluntad de apoyar al tesista en el levantamiento de observaciones y en el acto de sustentación de tesis.

Chachapoyas, 30 de enero del 2021



PhD. Pedro Javier Mansilla Córdova

Docente FICA-UNTRM

Asesor

VISTO BUENO DEL COASESOR DE LA TESIS

El docente de la UNTRM-A que suscribe, hace constar que ha asesorado la tesis titulada “**Diagnóstico del agente causal de la rancha de la azucena (*Lilium candidum*)**”, del bachiller en ingeniería Agrónoma egresado de la Escuela Profesional de ingeniería Agrónoma de la UNTRM-A.

Bach. Eisen Carlos Usquiza Cruz

El docente de la UNTRM-A que suscribe da su Visto Bueno para que la tesis mencionada sea presentada al jurado evaluador, manifestando su voluntad de apoyar al tesista en el levantamiento de observaciones y en el acto de sustentación de tesis.

Chachapoyas ,30 de enero del 2021

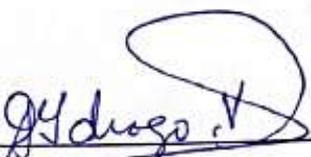


MSc. Walter Daniel Sánchez Aguilar

Docente FICA-UNTRM

Co-asesor

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Ing. Guillermo Idrogo Vázquez
PRESIDENTE



Ph.D. Ligia Magali García Rosero
SECRETARIO



Ing. Mg. Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz
VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



REGLAMENTO GENERAL PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-0

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Diagnóstico del Agente Causal de la Rancho de la Azucena (Lilium candidum L.)

presentada por el estudiante ()/egresado (x) EISEN CARLOS USQUIZA CRUZ de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma con correo electrónico institucional eisen.usquiza.epg@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 74 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
b) La citada Tesis tiene ____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 27 de MARZO del 2021

SECRETARIO

M. Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz DNI 05374749 VOCAL

PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-Q

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 14 de abril del año 2022, siendo las 17:00 horas, el aspirante: Eisen Carlos Uguziza Cruz, defiende en sesión pública presencial () / a distancia (X) la Tesis titulada: Diagnóstico del agente causal de la rancha de la azucena Chilium candidum L.

_____ , teniendo como asesor a PhD. Pedro Javier Mansilla Córdova, para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Guillermo Idiago Vázquez

Secretario: Ligia Magali García Roseiro

Vocal: Segundo Manuel Oliva Cruz

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (X)

Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 18:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

SECRETARIO

M. Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz
DNI 05374749

VOCAL

PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS	vi
VISTO BUENO DEL COASESOR DE LA TESIS	vii
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	viii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS	ix
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS	x
ÍNDICE GENERAL	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xivii
RESUMEN	xivxi
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCION	23
II. MATERIAL Y METODOS	25
2.1. Lugar de estudio	25
2.2. Obtención de las muestras	25
2.3. Diagnóstico inicial	25
2.4. Identificación por microscopía al agente causal de la ranca en azucenas	27
2.4.1. Aislamiento	27
2.4.2. Aislamiento directo	27
2.4.3. Aislamiento indirecto	27
2.4.4. Obtención de cultivo puro	27
2.4.5. Postulado de Koch	27

2.4.6.	Preparación del inóculo	28
2.4.7.	Inoculación	28
2.4.8.	Evaluación del cuadro sintomático	28
2.4.9.	Re-aislamiento.....	28
2.4.10.	Obtención de cultivo monospórico.....	28
2.4.11.	Caracterización morfológica	29
2.4.12.	Conservación de cepas.....	29
2.5.	Caracterización Fisiológica.....	30
2.5.1.	Preparación de inóculo.....	30
2.5.2.	Ensayo de crecimiento del patógeno en diferentes temperaturas	30
2.5.3.	Ensayo de crecimiento del patógeno en diferentes pH.....	30
2.5.4.	Ensayo de crecimiento del patógeno en diferentes medios de cultivo.	30
2.5.5.	Ensayo de crecimiento del patógeno con dos fuentes de carbono	31
2.6.	Interacción planta patógeno	31
2.6.1.	Ensayo de resistencia de híbridos orientales.....	31
2.6.2.	Ensayo de virulencia del patógeno de acuerdo con su localización en la hoja.....	31
2.6.3.	Ensayo de virulencia del patógeno en plantas en cámara húmeda.....	32
2.6.4.	Ensayo de virulencia en hojas in vitro	32
2.6.5.	Ensayo de rango de hospederos del microorganismo aislado.....	32
2.6.6.	Ensayo de virulencia de <i>Botrytis cinerea</i> . aislado de fresa en azucenas 33	
2.6.7.	Ensayo de enfrentamiento entre <i>Botrytis cinerea</i> aislado de fresa y de azucena	33
III.	RESULTADOS	34
3.1.	Identificación por microscopía al agente causal de la racha en azucenas.....	34
3.1.1	Diagnóstico situacional.....	34
3.1.2.	Pre-identificación.....	34

3.1.3.	Postulado de Koch	34
3.1.4.	Caracterización morfológica	35
3.2.	Caracterización fisiológica del patógeno	39
3.2.1.	Ensayo de crecimiento del microorganismo en varias temperaturas .	39
3.2.2.	Ensayo de crecimiento del patógeno en diferentes pH.....	40
3.2.4.	Ensayo de desarrollo de <i>Botrytis sp.</i> in vitro con dos fuentes de carbono	45
3.3.	Interacción planta patógeno	47
3.3.1.	Ensayo de resistencia de híbridos orientales.....	47
3.3.2.	Ensayo de virulencia del microorganismo de acuerdo con la edad de la hoja.....	48
3.3.3.	Ensayo de virulencia del microorganismo en plantas mantenidas en cámara húmeda	51
3.3.4.	Ensayo de virulencia del microorganismo aislado en hojas in vitro.....	53
3.3.5.	Ensayo de rango de hospederos del microorganismo aislado.....	54
3.3.6.	Ensayo de virulencia de <i>Botrytis cinerea</i> aislado de fresa	56
3.3.7.	Ensayo de enfrentamiento entre <i>Botrytis cinerea</i> aislado de fresa y <i>Botrytis sp.</i> aislado de azucena	58
IV.	DISCUSIÓN	59
V.	CONCLUSIONES	63
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
VII.	ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Medidas de los macroconidios de microcultivo	35
Tabla 2.	Medidas de los microconidios de microcultivo.....	36
Tabla 3.	Medidas estandarizadas para cada especie.	37
Tabla 4.	Tendencia de crecimiento a diferentes temperaturas.....	40
Tabla 5.	Tendencia de crecimiento en varios pH	42
Tabla 6.	Tendencia de crecimiento en varios medios.....	45
Tabla 7.	Tendencia de crecimiento en dos fuentes de carbono	47
Tabla 8.	Promedio de los porcentajes de severidad.....	48
Tabla 9.	Tendencia del incremento del área necrosada, tratamiento sin heridas.....	49
Tabla 10.	Tendencia del incremento del área necrosada, tratamiento con heridas....	50
Tabla 11.	Tendencia del incremento del área necrosada en las hojas de plantas en cámara húmeda	52
Tabla 12.	Tendencia del área necrosada en hojas de azucena inoculadas in vitro	54
Tabla 13.	Medidas de macroconidios de Botrytis cinerea aislado de fresa.	56
Tabla 14.	Tendencia del área necrosada en hojas de azucena inoculadas con Botrytis cinerea asilado de fresa.....	58
Tabla 15.	Prueba Tukey, ensayo diferentes temperaturas.	74
Tabla 16.	Medias de los datos del ensayo en diferentes temperaturas.	74
Tabla 17.	ANOVA de los datos del ensayo en diferentes temperaturas.....	74
Tabla 18.	Medias de los datos del ensayo en diferentes pH.	74
Tabla 19.	ANOVA de los datos del ensayo en diferentes pH	75
Tabla 20.	Tukey comparación simultanea t-values (d.f. =114), en varios pH.....	75
Tabla 21.	Medias de los datos del ensayo resistencia en variedades.....	75
Tabla 22.	ANOVA de los datos del ensayo de resistencia en variedades introducidas, tratamiento con herida.	75
Tabla 23.	Tukey simultaneous comparison t-values (d.f. = 12), ensayo de Resistencia	76

Tabla 24.	Media y desviación estándar del crecimiento micelial en diferentes medios	76
Tabla 25.	Resumen de datos del experimento de fuentes de carbono	76
Tabla 26.	Análisis de varianza de dos fuentes de carbono	77
Tabla 27.	Descriptiva del ensayo de severidad sin heridas por la ubicación de las hojas en la planta.....	77
Tabla 28.	ANOVA de severidad por la ubicación de la hoja en la planta.....	77
Tabla 29.	Prueba post hoc, Tukey de la severidad por la ubicación de la hoja en la planta	77
Tabla 30.	Descriptivo descriptiva del ensayo de severidad con heridas por la ubicación de las hojas en la planta	78
Tabla 31.	ANOVA del ensayo de severidad en el tratamiento con heridas por la ubicación de las hojas en la planta.....	78
Tabla 32.	Medias y desviación estándar de la severidad de plantas heridas e inoculadas cámara húmeda.....	78
Tabla 33.	Análisis de varianza de la severidad de plantas heridas e inoculadas por haz y envés	78
Tabla 34.	Prueba F de los datos del ensayo de virulencia en hojas invitro.	79
Tabla 35.	Prueba F de los datos del ensayo de virulencia de Botrytis cinerea (aislado de fresa) en azucena.....	79
Tabla 36.	Prueba F para varianzas de dos tratamientos: con herida y sin heridas, Botrytis cinerea aislado de fresa inoculado en azucena.....	79
Tabla 37.	Componentes del medio agar-agua (AA)	81
Tabla 38.	Componentes de Medio Papa Dextrosa Agar (PDA)	81
Tabla 39.	Componentes del Medio Papa Sacarosa Agar (PSA).....	82
Tabla 40.	Componente del Medio Zanahoria Agar (MZA).....	82
Tabla 41.	Componentes del medio Vo-Agar con carbonato de calcio	83
Tabla 42.	Componentes del medio V8-Agar	83
Tabla 43.	Componente del medio nutritivo	83

Tabla 44.	Componentes del medio Czapek Dox Agar	84
Tabla 45.	Formula estándar de Czapek Dox Agar.....	84
Tabla 46.	Componentes del medio Cor Meal Agar	84
Tabla 47.	Formula de Corn Meal Agar.....	85
Tabla 48.	Componentes del medio agar lilium.....	85
Tabla 49.	Componentes del medio Difco	85
Tabla 50.	Componentes del medio malta	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del laboratorio de diagnóstico de enfermedades de la UNTRM y de las parcelas muestreadas ;1,2,3,4,5,6 en Taquia.	26
Figura 2. Primeras observaciones macro y microscópicas; A) plantas de azucenas con síntomas de tizón; B) Hoja con síntomas de tizón observados bajo estereoscopio con aumento de 40X, mancha marrón con borde de marrón oscuro en el haz; C) Presencia de signo con esporulación aérea en una hoja (envés) y micelio color marrón claro en la hoja, bajo estereoscopio a 100X; D) Observación bajo estereoscopio a 160X, donde se evidencia esporulación aérea, las esporas traslucidas de aspecto blanquecino, en forma racimosa.	36
Figura 3. Esporas germinadas después de 6 horas observadas en microscopio de luz (100X).	37
Figura 4. Estructuras del microorganismo aislado en microscopio de luz; A) Placa con colonia de 15 días de edad, incubado a 20° C; B) Macroconidios, obtenidos en microcultivo a los 7 días de incubación a 20 °C; C) Microconidios obtenidos también en microcultivo a los 7 días, en forma racimosa, con microconidios de 4 a 6 µm.	38
Figura 5. Media acumulada de crecimiento radial del microorganismo aislado en varias temperaturas.	39
Figura 6. Medias de los grupos de temperaturas y desviación estándar del crecimiento radial con tratamientos de cuatro temperaturas.	39
Figura 7. Imagen de crecimiento radial en diferentes temperaturas a los 7 días de incubación. A. crecimiento a 10°C, B. crecimiento a 20°C, C. crecimiento a 25 °C y D. Crecimiento a 28 ° C.....	40
Figura 8. Crecimiento radial promedio del microorganismo en medio PDA con diferentes pH.....	41
Figura 9. Comparación de grupos medias y desviación estándar en los 7 días de evaluación, incubados a 20 °C.....	41
Figura 10. Crecimiento de micelio Botrytis sp. de 7 días de incubación a 20 ° C de temperatura. A. Medio pH4, B. medio pH4.5, C medio pH5, D medio Ph5.5, E medio pH6 y F. medio pH12.	42

Figura 11. Promedio de crecimiento de micelio en diferentes medios por 7 días a 20 °C.	43
Figura 12. Crecimiento radial en diferentes medios, incubados por 7 días a 20 °C. A) Medio Difco; B) Medio zanahoria dextrosa; C) Medio Nutritivo; D) Medio V8; E) Medio papa dextrosa agar; F) Medio V8 más carbonato de calcio; G) Medio papa dextrosa agar más malta; H) Medio harina de maíz; I) Medio agar agua; J) Medio papa sacarosa agar; K) Medio extracto de hojas de azucenas dextrosa agar; L) Czapek.	44
Figura 13. Promedio de crecimiento de micelio en el tiempo en diferentes medios de cultivo, incubados en el lapso de 7 días a 20 °C.....	45
Figura 14. Línea de tiempo de crecimiento radial de <i>Botrytis</i> sp. en medio de cultivo con diferentes fuentes de carbono.....	46
Figura 15. Promedio de crecimiento radial de <i>Botrytis</i> sp. en medios de cultivo in vitro con dos fuentes de carbono.....	46
Figura 16. Crecimiento radial de <i>Botrytis</i> sp. en medios con varias fuentes de carbono; A) Sacarosa; B) Glucosa.....	47
Figura 17. Promedio porcentajes de severidad de <i>Botrytis</i> sp. inoculado en 4 variedades, después de 5 días a 15 °C y 80% de humedad relativa.....	48
Figura 18. Promedio de área necrosada en el tiempo en hojas sin heridas.....	49
Figura 19. Medias del área necrosada en las hojas de acuerdo a su ubicación tratamiento sin heridas.....	49
Figura 20. Promedio de área necrosada en el tiempo en hojas con heridas.....	50
Figura 21. Medias del área necrosada en las hojas de acuerdo a su ubicación tratamiento con heridas.....	50
Figura 22. Medias y desviación estándar de la severidad de plantas heridas e inoculadas	51
Figura 23. Desarrollo de la incidencia de la enfermedad en plantas inoculadas y puestas en cámara húmeda con parámetros atmosféricos controlados.....	52
Figura 24. Plantas en edad de floración inoculadas en el haz y el envés con discos de PDA con micelio.....	53

Figura 25. . Promedio de la severidad 9 días después de la inoculación de hojas con y sin heridas.	53
Figura 26. Promedio de la severidad en el tiempo de plantas inoculadas previa realización de heridas.	54
Figura 27. Inoculación en hojas de rosa (<i>Rosa</i> spp.), colocadas en cámara húmeda..	55
Figura 28. Inoculación es varias plantas con <i>Botrytis</i> sp. aislado de azucenas; A) Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>), B) lechuga (<i>Lactuca sativa</i>), C) Col (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i>), D) cebolla china (<i>Allium fistulosum</i>), E) Frejol (<i>Phaseolus vulgaris</i>), F) Pepinillo (<i>Cucumis sativus</i>).	55
Figura 29. Sintoma y colonia de <i>Botrytis cinerea</i> aislado de fresa.; A) Planta de fresa, con necrosis del fruto y evidencias de crecimiento de estructuras aéreas de un microorganismo fúngico, B) Crecimiento del microorganismo 15 días después a 20°C, en placa de Petri con medio PDA.	56
Figura 30. Porcentaje de severidad de <i>Botrytis cinerea</i> en 7 días, en hojas de azucenas.	57
Figura 31. Hojas de azucenas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> , transcurrido 3 días, A) Inoculación sin heridas. B) Inoculación con heridas.	57
Figura 32. Porcentaje promedio de severidad de <i>Botrytis cinerea</i> en azucenas hasta 17 días, con dos tratamientos con heridas y sin heridas.	57
Figura 33. Enfrentamiento entre <i>Botrytis cinerea</i> (izquierda) y <i>Botrytis</i> . sp (derecha), transcurridos 10 días a 20 ° C.	58
Figura 34. Parcelas tomadas para muestreo situadas en la localidad de taquia.	70
Figura 35. Recolección de hojas con síntomas, con marcas de tizón (A y B), C) Bolsas de papel conteniendo las muestras, llevadas al laboratorio.	70
Figura 36. Aislamiento indirecto (porción de tejido sintomático; A) Corte de porción de tejido mitad con tejido necrosado y mitad aparentemente sano, de 5x5 mm aproximado, B) Desinfección de las porciones de tejido con: alcohol (70°), Hipoclorito de sodio 10 veces diluido (4%), agua estéril, y secado en papel estéril, C) Colocados en medio de cultivo (PDA),3 porciones de tejido en forma triangular, D) Colocando a Incubadora, para incubar por 3 días.	71

- Figura 37.** Test de patogenicidad; **A)** Hoja traída de campo con síntomas de tizón, **B)** hoja cultivada en el vivero UNTRM e inoculado con el microorganismo aislado de la primera hoja. Síntomas similares de tizón. 72
- Figura 38.** Ensayo de virulencia por ubicación de la hoja en la planta. **A)** Selección de hojas, superior, media, inferior, **B)** lavado de las hojas con agua corriente potable, **C)** desinfección de hojas en alcohol (70°), hipoclorito de sodio (0.01%), y enjuagado en agua estéril, **D)** Inoculando las hojas con discos de agar conteniendo micelio y colocadas en la cámara húmeda..... 72
- Figura 39.** Virulencia del microorganismo aislado en plantas; **A)** Plantas de azucenas cultivadas en el vivero UNTRM, en entapa de floración, **B)** Realizando las heridas con un estilete flameado .**C)** Realizando inoculación, por el haz y en vez, **D)** Hojas inoculadas y rotuladas..... 73

RESUMEN

En la comunidad de Taquia se cultivan azucenas y esta representa una de sus principales actividades económicas. En los últimos años, los productores enfrentan varios problemas fitosanitarios, destacándose lo que se conoce en la región como la ranca de la azucena. En consecuencia, se realizó el diagnóstico, caracterización fisiológica y morfológica de esta enfermedad. Para esto se realizaron muestreos en varias parcelas de la localidad de Taquia. En la Clínica Fitopatológica del Laboratorio de Fitopatología y Entomología de la UNTRM se realizó el aislamiento, purificación, caracterización morfológica y fisiológica, además de ensayos de virulencia. Como resultado, los síntomas en las muestras, así como las inducidas por el microorganismo aislado fueron manchas marrones claras con bordes marrones, presencia de esporas ovaladas aéreas, agrupadas y de color gris. Macroscópicamente las colonias aisladas presentaron color blanco con textura algodonosa, presencia de abundantes microconidios de 4 a 5 μm y conidios 24.6 - 63.9 \times 16.2 - 34.8 μm . Esas dimensiones son características de la especie *B. elíptica*. El medio que permitió el mayor crecimiento fue el jugo V8-agar (ocho verduras) y el medio a base de hojas de azucena, con un pH de 4 a 6. La temperatura óptima de crecimiento fue de 20 °C. Los ensayos in vitro confirmaron que la virulencia del patógeno presenta diferencias significativas con respecto a la edad de la hoja de azucena. También se encontró que el aislado de azucena es más virulento en azucena que un aislado de *Botrytis cinerea* obtenido de fresa.

Palabras clave:

Botrytis, diagnóstico, caracterización, etiología, tizón.

ABSTRACT

Lilies are grown in the community of Taquia and this represents one of its main economic activities. In recent years, producers have faced various phytosanitary problems, highlighting what is known in the region as late blight. Consequently, the diagnosis, physiological and morphological characterization of this disease was carried out. For this, samplings were carried out in several plots in the town of Taquia. Isolation, purification, morphological and physiological characterization, as well as virulence tests were performed at the Phytopathological Clinic of the Laboratory of Phytopathology and Entomology of the UNTRM. As a result, the symptoms in the samples, as well as those induced by the isolated microorganism, were light brown spots with brown edges, presence of oval, grouped and gray-colored aerial spores. Macroscopically, the isolated colonies presented white color with a cottony texture, presence of abundant microconidia of 4 to 5 μm and conidia $24.6 - 63.9 \times 16.2 - 34.8 \mu\text{m}$. These dimensions are characteristic of the species *B. elliptica*. The medium that allowed the highest growth was the V8-agar juice (eight vegetables) and the medium based on lily leaves, with a pH of 4 to 6. The optimum growth temperature was 20°C. In vitro tests confirmed that the virulence of the pathogen presents significant differences with respect to the age of the lily leaf. The lily isolate was also found to be more virulent in lily than a *Botrytis cinerea* isolate obtained from strawberry.

Keywords:

Botrytis, diagnostic, characterization, etiology, blight.

I. INTRODUCCIÓN

En el mundo se ha reportado la enfermedad de la ranca o tizón en lirios, (Grant 2014; Zhang 2010, Song 2017; Dhyani ,2012, Leyva et al ,2009), causando grandes pérdidas, siendo la enfermedad más importante en *Lilium* (Chastagner et al.,1992; Walker et al., 2011; Cotton, 1933; Hsiang et al., 2001).

La azucena es un producto con alta demanda. En la localidad de Taquia una gran parte de la población se dedica a este cultivo (*Lilium candidum*). Estos han ido intensificando su producción, pero con baja tecnología, y la proliferación de *Botrytis sp.* ha ido incrementado con los años. El control de enfermedades se basa en el control químico, sea con productos recomendados por la autoridad en sanidad vegetal (SENASA) o no. Las aplicaciones llegan a ser de hasta 3 veces por campaña, y con mezclas de hasta 3 fungicidas. Migheli et al., (1989) han demostrado que productos generalmente utilizados como los benzimidazoles y dicarboximidias, están generando resistencia en especies como *Botritis elliptica*. Debido a la fase sexual muy frecuente que tienen estas especies, existen muchas variaciones en las poblaciones de este género. (Staats, 2007; Grant et al., 2014) en su investigación muestra que *Botrytis elíptica* tiene poblaciones con más variaciones, mientras que en otras especies es más frecuente encontrar genotipos repetitivos, conocidos como poblaciones clonales como en *Botrytis tulipae*.

Los productores de Taquia han visto disminuir la producción en los últimos años y esto empeora por el costo del control químico. El manejo integrado no se utiliza de forma correcta. Por ejemplo, el riego que utilizan es riego por aspersión con pocos aspersores por cuadrantes con alta potencia, salpicando suelo hacia las hojas junto con la lluvia, que es frecuente, diseminando el patógeno que puede sobrevivir en el suelo (Taylor 1934). La agresividad y la virulencia de una especie a otra puede variar mucho (van, 1931) siendo que algunas especies no requieren de heridas para poder infectar (Kessel, 2001). Para el control efectivo de una enfermedad es esencial un buen diagnóstico, así como el conocimiento de la biología del patógeno (Elad, 2007). Entidades responsables y con infraestructura para el monitoreo de enfermedades, han realizado diagnósticos, pero la validez de esos reportes no es muy clara. En base todo lo anterior, se realizó el presente trabajo de investigación de diagnóstico del agente causal de la ranca de la azucena, con los objetivos específicos de identificar y caracterizar fisiológicamente como

morfológicamente, también la interacción planta patógeno, para un control acertado del problema y que el cultivo de azucenas sea sostenible.

II. MATERIAL Y METODOS

2.1. Lugar de estudio

El trabajo de diagnóstico fue realizado esencialmente en la Clínica de Diagnóstico de Enfermedades de Plantas, que funciona en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología y Entomología del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la UNTRM-A. Las plantas fueron mantenidas también en el área de invernaderos del INDES-CES.

2.2. Obtención de las muestras

Las muestras de azucenas fueron recolectadas en cinco ocasiones de la localidad de Taquia, perteneciente a la provincia de Chachapoyas de la Región Amazonas. Las coordenadas de Taquia son 6°15'26.1"S 77°49'54.7"W (figura 1). En la primera y segunda ocasión se recolectó de 2 huertas diferentes (parcela 1 y 2, figura 1). En la tercera se recolectaron muestras de 2 parcelas más (parcela 1, 2, 3, 4 figura 1). En la cuarta se recolectó de una sola parcela (parcela 4, figura 1). En la quinta oportunidad se recolectó de tres parcelas (parcela 4, 5, 6, figura 1). Las muestras fueron flores y hojas sintomáticas y asintomáticas colectadas al azar de plantas de 4 parcelas de distintos productores de la localidad. Las hojas se recolectaron de la parte media y superior de las plantas. Las plantas de las que se recolectaron las muestras presentaban entre tres y seis meses de edad, con presencia de síntomas, tal como descrito por Gant et al. (2014). Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel Kraft y estas dentro de bolsas de plástico, separándolas de acuerdo con la parcela y la presencia o no de síntomas, así como cuidando de separar las muestras de parcelas con evidente aplicación de agrotóxicos. Las bolsas fueron rotuladas, cerradas de forma hermética y trasladadas inmediatamente al laboratorio. Para el diagnóstico situacional práctico en las parcelas 1,2,4 (figura 1), se tomó 20 plantas al azar en forma de zigzag de cada parcela, se procedió a revisar todas las hojas para determinar si tenía síntomas.

2.3. Diagnóstico inicial

Las lesiones de las muestras fueron observadas en detalle con ayuda de un estereoscopio, anotando las características de los síntomas y signos provenientes de campo. Literatura diversa, esencialmente artículos científicos y libros fueron

consultados para descartar enfermedades abióticas, injurias mecánicas o confirmar la causa biótica o infecciosa.



Figura 1. Localización del laboratorio de diagnóstico de enfermedades de la UNTRM y de las parcelas muestreadas ;1,2,3,4,5,6 en Taquia.

2.4. Identificación por microscopía al agente causal de la ranca en azucenas

2.4.1. Aislamiento

El aislamiento de microorganismos presentes en las lesiones de las azucenas se realizó esterilizando previamente los instrumentos a utilizar y la limpieza de la mesa con detergente líquido, alcohol de 70°, hipoclorito de sodio (producto comercial al 4% p/p diluido 10 veces). Dos mecheros de alcohol fueron utilizados. El aislamiento realizado fue de dos tipos, el aislamiento directo y aislamiento indirecto (Alfenas & Mafia, 2016).

2.4.2. Aislamiento directo

El aislamiento directo se realizó de hojas sintomáticas y con presencia de signo (esporas aéreas). Con la ayuda de un estereoscopio se procedió a retirar esporas con la punta de un estilete (flameado) y estos fueron sembrado en una placa de Petri conteniendo papa dextrosa agar. El microorganismo fue incubado a 20 °C por 3 días (Alfenas & Mafia, 2016).

2.4.3. Aislamiento indirecto

El aislamiento se realizó cortando pequeñas porciones conteniendo tejido sintomático y asintomático de 4 a 6 mm². Estas fueron desinfectadas sumergiéndolas en alcohol 70° por 30 segundos, después en hipoclorito de sodio (producto comercial 4% p/p diez veces diluido en agua destilada) por 1 minuto. Seguidamente se procedió a enjuagarlo en agua tipo II estéril, para retirar el residuo de hipoclorito de sodio. Luego se secó en papel toalla estéril con la ayuda de una pinza (flameada). Los fragmentos de tejido fueron sembrados en agar agua, con un máximo de 3 y de forma equidistante y se incubaron a 20 °C por 3 días (Alfenas & Mafia, 2016).

2.4.4. Obtención de cultivo puro

Una vez realizado el aislamiento y transcurrido los 3 días, se procedió a repicar del borde de la colonia con un estilete flameado a otra placa de Petri conteniendo papa dextrosa agar (Alfenas & Mafia, 2016).

2.4.5. Postulado de Koch

Para comprobar que los microorganismos aislados son agentes causales de la enfermedad de la ranca en azucena se procedió a realizar el postulado de Koch (Leyva

et al., 2009; Dhyani et al., 2012; Cabrera et al., 2015). A continuación, se detallarán algunos aspectos importantes de las cuatro etapas del cumplimiento de los postulados.

2.4.6. Preparación del inóculo

La preparación de inóculo consistió en repicar en placas de papa dextrosa agar e incubar por 7 días a 20 °C.

2.4.7. Inoculación

La inoculación se realizó con discos conteniendo micelio joven de 7 días de edad, con un estilete se colocó los discos en 5 hojas de azucenas aparentemente sanas (*Lilium candidum*) mantenidas en una cámara húmeda constituida por un recipiente plástico cerrado y a 20 °C.

2.4.8. Evaluación del cuadro sintomático

Los síntomas se observaron a los 5 días de la inoculación, registrando de forma escrita y con fotografías los síntomas que aparecieron.

2.4.9. Re-aislamiento

El re-aislamiento se realizó recolectando las hojas sintomáticas y utilizando la misma metodología que el aislamiento indirecto, descrito previamente. El microorganismo aislado se comparó con el inicialmente aislado.

2.4.10. Obtención de cultivo monospórico

La metodología para la obtención del cultivo monospórico fue la recomendada por Alfenas & Mafia (2016). A partir de una hoja de azucena con signos característicos, se obtuvieron racimos de esporas con ayuda de un estilete flameado y un estereoscopio. La hoja se manipuló sobre una tapa de placa de Petri de plástico. El estilete conteniendo las esporas se sumergieron en una gota de agua estéril de 20 µl previamente depositada en una placa de Petri conteniendo medio papa dextrosa agar. Las esporas se esparcieron con una espátula de Drigalsky flameada en un área delimitada por un círculo de 2 cm de diámetro marcada con plumón permanente externamente en la base de la placa. Aproximadamente 4 horas se esperaron para que germinen las esporas. Estas se extrajeron del medio con la ayuda de un bisturí N° 11 y se trasladaron a una nueva placa con medio papa dextrosa agar. Después de tres días se procedió a realizar el repique a

otra placa de la punta de una hifa para garantizar que el cultivo era homogéneo genéticamente.

2.4.11. Caracterización morfológica

La identificación se realizó observando las características de la colonia que creció en la placa de Petri (color, aspecto), el tamaño de los microconidios, y macroconidios, se midió con un microscopio óptico con cámara integrada calibrada. La medición se realizó con la ayuda del software image tool 3.0 a partir de las imágenes obtenidas. El porcentaje de germinación se obtuvo con el siguiente procedimiento. En una capa de 10 mm x 10 mm de agar agua obtenida cortando el medio previamente preparado, vertido y mantenido en una placa de Petri, se depositaron esporas desprendidas de un cultivo puro con ayuda de una espátula de Drigalsky (esterilizada). Cada 2 horas las esporas fueron observadas con ayuda de un microscopio de luz con un aumento de 40x. Las esporas germinadas se identificaron por la aparición del tubo germinativo con un tamaño igual o mayor al diámetro de las esporas. El número fue registrado. Para observaciones más detalladas de caracterización del hongo se realizaron montajes con porciones de micelio (de los cultivos puros) en laminas porta objeto (técnica montada en fresco, con colorante azul de lactofenol y agua destilada). La forma del micelio, de las esporas y forma de agrupación de los conidios fueron registradas con fotografías. Esas características se compararon con los datos publicados de las especies de *Botrytis spp.* (Leyva et al., 2009; Dhyani et al., 2012; Cabrera et al., 2015).

2.4.12. Conservación de cepas

Las cepas fueron conservadas por el método de Castellani: 5 discos de medio de cultivo con el microorganismo fueron obtenidos con sacabocados de placas incubadas por 7 días. Estos fueron transferidos con ayuda de un estilete flameado a viales de 15 ml conteniendo 10 ml de agua destilada. Todo el procedimiento fue realizado en cámara de flujo laminar previamente esterilizada. También se realizó la conservación temporal en tubos sellados de 15 ml conteniendo medio PDA. El microorganismo fue sembrado en el medio con un estilete flameado. Los viales y los tubos tapados fueron guardados en una refrigeradora a 10 °C, proceso sugerido por Alfenas & Mafia (2016).

2.5. Caracterización Fisiológica

2.5.1. Preparación de inóculo

La preparación del inóculo consistió en realizar repique de una porción de micelio con la ayuda de un estilete flameado en 20 placas conteniendo medio sólido PDA. Las placas se colocaron en una incubadora por 7 días. Discos de 5 mm de diámetro fueron obtenidos con un sacabocado del borde de la colonia.

2.5.2. Ensayo de crecimiento del patógeno en diferentes temperaturas

El microorganismo fue cultivado en PDA y expuesto a temperaturas de 10 °C, 20 °C, 25 °C y 28 °C, con 3 placas por cada temperatura. El crecimiento radial de las colonias fue medido durante 7 días, sin descontar el área del disco, el análisis estadístico se realizó por ANOVA, análisis Tukey y análisis de tendencia.

2.5.3. Ensayo de crecimiento del patógeno en diferentes pH

El procedimiento fue semejante al anterior. En este caso, el microorganismo se cultivó en PDA preparado con pH calibrado para 4, 4.5, 5.5, 6, 8 y 12. El crecimiento radial se midió con un vernier electrónico por 7 días, sin descontar el área del disco, el análisis estadístico se realizó por ANOVA, análisis Tukey y análisis de tendencia.

2.5.4. Ensayo de crecimiento del patógeno en diferentes medios de cultivo

Los medios utilizados fueron los siguientes: medio nutritivo, medio V8 (jugo de ocho verduras) más carbonato de calcio, agar-agua, Czapek, zanahoria-agar, PDA, maíz-agar, *Lilium*-agar, Difco, medio V8, medio malta, papa sacarosa agar (PSA). El microorganismo sembrado en cada uno de los medios fue obtenido a partir de una colonia de 7 días de edad y transferido con previa realización de discos obtenidos con sacabocados de 5 mm y con ayuda de un estilete esterilizado por flameado. Las placas de Petri se incubaron a 20 °C por 15 días. Las mediciones del crecimiento radial fueron realizadas con un vernier electrónico diariamente durante 7 días, sin descontar el área del disco, el análisis estadístico se realizó por ANOVA, análisis Tukey y análisis de tendencia.

2.5.5. Ensayo de crecimiento del patógeno con dos fuentes de carbono

El ensayo consistió en la preparación de medios de PDA con fuentes de energía como dextrosa y sacarosa. Placas de Petri de 90 mm de diámetro y 15 mm de altura recibieron aproximadamente 10 cm³ de medio. Un disco de medio de 5 mm de diámetro conteniendo micelio de 7 días de edad fue sembrado con la ayuda de un estilete esterilizado en cada una de las placas y se incubó durante 7 días a 20 °C. El crecimiento fue medido diariamente con un vernier electrónico, sin descontar el área del disco. Se analizó estadísticamente la diferencia entre dos grupos con la prueba F y análisis de tendencia.

2.6. Interacción planta patógeno

2.6.1. Ensayo de resistencia de híbridos orientales

El ensayo de evaluación de resistencia de variedades consistió en inocular en 4 híbridos asiáticos del género *Lilium*, incluyendo *Lilium candidum* como control. Los híbridos fueron obtenidos de la Asociación de Productores de Azucenas Cruz de Mayo, que importaron semilla de Holanda. Las plantas fueron mantenidas en cuarentena (N.º 180700000001), contando con el permiso sanitario de importación Nº PFI: 189913258-MINAGRI-SENASA-DSV-SCV. Discos con micelio de 7 días de edad fueron depositados con ayuda de un estilete flameado en la parte céntrica de hojas retiradas de cada híbrido. Las inoculaciones fueron replicadas en hojas previamente heridas con un estilete fabricado con aguja entomológica y el daño mecánico fue realizado evitando atravesar la lámina foliar. El área de las lesiones fue medido y registrado diariamente para determinar la virulencia del patógeno en cada híbrido asiático. Las variedades que se evaluaron fueron: yellow diamond (amarillo), Hyde Park (naranja), Champion Diamond (crema), Rojo (Batabus), el análisis estadístico se realizó por ANOVA, análisis Tukey y análisis de tendencia.

2.6.2. Ensayo de virulencia del patógeno de acuerdo con su localización en la hoja

Hojas del tercio inferior, medio y superior fueron extraídas aleatoriamente de 5 plantas de azucena distintas y lavadas en agua destilada y detergente líquido. Seguidamente, fueron sumergidas durante aproximadamente 30 segundos en alcohol 70° y luego en

hipoclorito de sodio a 0.4% p/p durante 60 segundos. Una parte de las hojas, considerando cada uno de los tercios y plantas, fue herida con una aguja entomológica utilizada como estilete, cuidando no atravesar la lámina foliar y previamente flameado. Inmediatamente, discos de 5 mm de medio conteniendo micelio fueron depositados sobre las hojas con heridas y sin heridas, cuidando que el microorganismo quede en contacto directo con el tejido vegetal. Las hojas inoculadas y no inoculadas (control con heridas) fueron mantenidas en cámara húmeda a temperatura ambiente monitoreada con un higrómetro. En este experimento, el objetivo fue verificar si había diferencia en la respuesta de la planta cuando la inoculación se realizaba en el área más próxima al ápice o a la base.

El análisis estadístico se realizó por ANOVA, análisis Tukey y análisis de tendencia.

2.6.3. Ensayo de virulencia del patógeno en plantas en cámara húmeda.

El mismo ensayo anterior fue replicado en plantas enteras, sin retirar las hojas inoculadas. Para eso, fueron utilizadas plantas producidas en invernadero, con 5 meses de edad y en etapa de floración. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en una cámara húmeda construida con una estructura de madera de 100 × 80 × 100 cm cubierta con plástico, y las condiciones ambientales fueron registradas con un datalogger. La respuesta de la planta fue registrada durante 15 días y el avance de la lesión fue medido con un vernier electrónico. El análisis estadístico se realizó por ANOVA, análisis Tukey y análisis de tendencia.

2.6.4. Ensayo de virulencia en hojas in vitro

El ensayo fue esencialmente el mismo que el realizado en el punto 2.17.7, con la única diferencia que las inoculaciones fueron realizadas en la zona central de las hojas y la cámara húmeda consistió en una caja de plástico de 10 litros previamente esterilizada. Las hojas fueron colocadas sobre malla metálica esterilizada y se mantuvo una capa fina de agua en la base del recipiente. Se realizó el análisis de datos con la prueba F para dos grupos y el análisis de tendencia.

2.6.5. Ensayo de rango de hospederos del microorganismo aislado

El ensayo de agresividad consistió en sembrar algunas plantas en el invernadero de la UNTRM-INDESES, las variedades de, tomate, lechugas, frejol, cebolla china, pepinillo, col, Al transcurrir los 15 días se procedió a inocular con discos de 5 mm de diámetro

con la ayuda de un estilete flameado, posteriormente se colocó en cámara húmeda a temperatura ambiente, la evaluación del comportamiento del organismo se realizó midiendo con un vernier electrónico, las evaluaciones se realizaron diariamente por 7 días.

2.6.6. Ensayo de virulencia de *Botrytis cinerea*. aislado de fresa en azucenas

El microorganismo *Botrytis cinerea* es hospedero en cultivo de fresa. Un aislado fue obtenido por medio del método directo (ver subtítulo 2.5 y 2.6). Los conidios fueron medidos y las características de la colonia fueron registradas. Discos de PDA de 5 mm conteniendo micelio fueron obtenidos de una colonia incubada por 7 días a 20 °C. Estos fueron transferidos a hojas de azucena con y sin herida y el procedimiento fue semejante al descrito anteriormente, en el punto 2.17.9. Hojas inoculadas por el envés fueron incluidas en el ensayo. Fueron consideradas cinco repeticiones por tratamiento. Se realizó el análisis de datos con la prueba F para dos grupos y el análisis de tendencia.

2.6.7. Ensayo de enfrentamiento entre *Botrytis cinerea* aislado de fresa y de azucena

El enfrentamiento consistió en colocar un disco con micelio en un extremo de una placa de Petri y un disco con micelio del aislado diferente en el extremo opuesto. Cinco días después fue evaluado el crecimiento y el antagonismo o falta de este entre las cepas.

III. RESULTADOS

3.1. Identificación por microscopía al agente causal de la rancha en azucenas

3.1.1 Diagnóstico situacional

Se recolectó hojas para el aislamiento, también se realizó un diagnóstico situacional práctico en las parcelas 1, 2, 4 (figura 1): la incidencia promedio de la enfermedad, de 3 plantíos fue de 95%, en marzo del 2019.

3.1.2 Pre-identificación

Las primeras observaciones de las hojas recolectadas en campo pusieron en evidencia manchas necróticas secas, con apariencia de haber sido quemadas, que es típico del síntoma conocido como tizón o rancha. El centro de la lesión presentaba un color beige con el borde marrón oscuro. Con el estereoscopio fue posible observar micelio y esporas del aparente patógeno (figura 2).

3.1.3 Postulado de Koch

Durante los varios intentos de aislamiento se obtuvieron diferentes microorganismos, pero uno se encontró con una frecuencia, Este fue utilizado para desarrollar el postulado de Koch para comprobar si el organismo aislado es el causante de la enfermedad. Para eso, se realizó la inoculación con discos de PDA conteniendo micelio. Muchas pequeñas necrosadas de color marrón claro aparecieron en las hojas 2 días después de la inoculación. La apariencia, a los siete días después de la inoculación, era de quemadura seca, típica del tizón, dando con resultado que los síntomas que se observó en campo son similares a las que se encontró inoculando (figura 37 en anexo), demostrando que el microorganismo era patogénico. En ese momento se repitió el aislamiento indirecto considerando la intersección entre tejido con síntomas y sin síntomas. Siete días después la colonia obtenida presentó apariencia blanquecina, algodonosa. Bajo el microscopio pudo observarse hifas tabicadas y filamentosas con microconidios en forma racimosa. El procedimiento fue realizado tres veces y en todos ellos el resultado fue el mismo. Así, pudo verificarse que el microorganismo aislado es el causante de la rancha en azucenas.

3.1.4 Caracterización morfológica

Varios aislamientos fueron realizados en diferentes momentos. Distintos hongos fueron observados, pero en la mayoría de aislamientos uno se repetía con más frecuencia, de crecimiento con 3 cm por día, la colonia mostraba crecimiento blanquecino esponjoso, se observó en microscopio de luz, encontrándose con un microorganismo fúngico de hifa tabicadas y filamentosas, de color translucido, incoloro, en los primeros aislamientos no se logró ver estructuras reproductivas, se procedió a utilizar medios de esporulación como son agar agua, agar malta, medio mitad nutricio mitad sin nutriente, rayado de la colonia en pleno crecimiento, todos estos medios y métodos de esporulación dio como resultado la aparición de micro conidios en gran cantidad, con medidas de 3.7-6.3 x 3.91-6.53 μm (Tabla 3). Pero no macroconidios, cuando realizamos micro cultivo para fotografiar estructuras del microorganismo aislado, se encontró macroconidios el cual tenían la medida de 24.6-63.9x 16.2-34.8 μm (Figura 3 y Tabla 1), encontrándose en el rango para *Botrytis elliptica* (Tabla 4). En cuanto a la germinación de macroconidios se realizó tres veces en porción de agar, separando 100 esporas, realizando la observación cada dos horas, dando como resultado que a las 4 horas habían germinado 45 esporas de 48 (Figura 4).

Tabla 1. Medidas de los macroconidios de microcultivo

Longitudinal			Transversal		
Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio
16.2	34.0	25.2	24.6	64.0	39.2

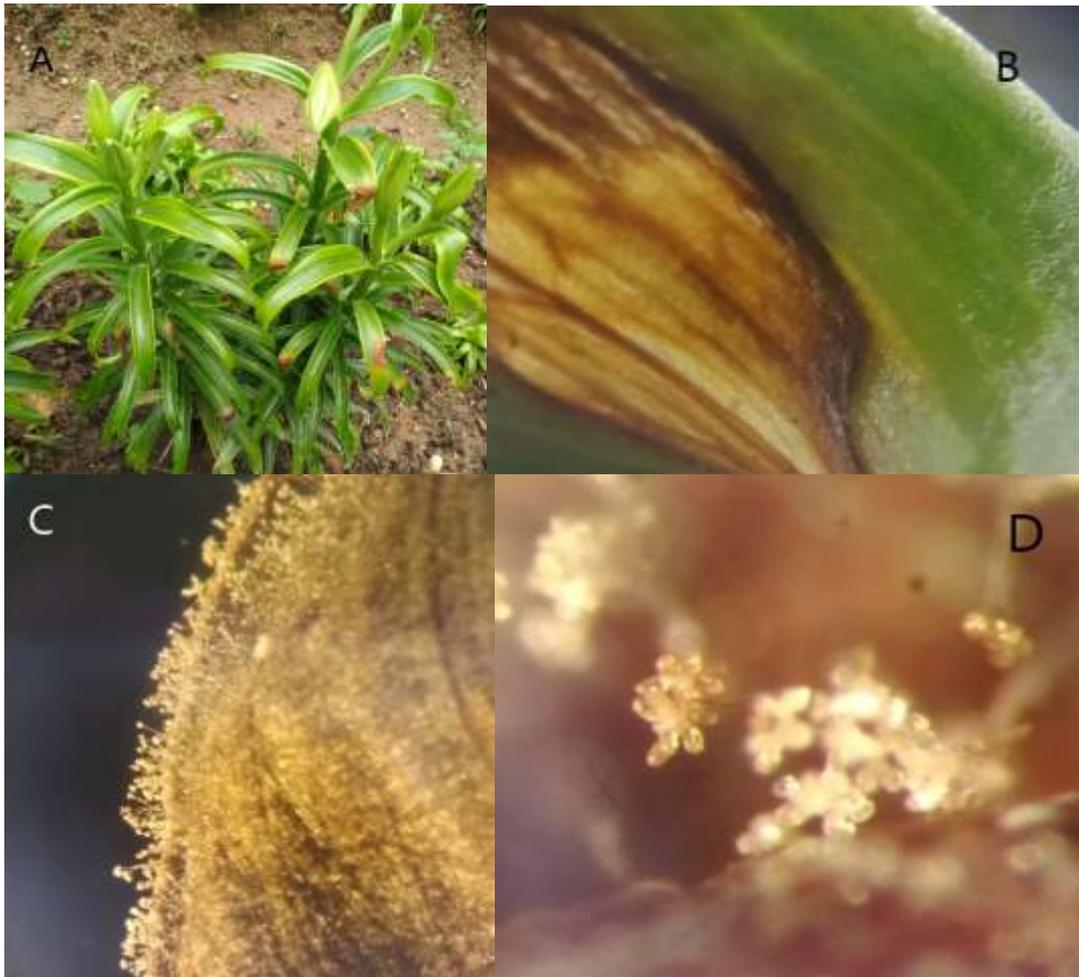


Figura 2. Primeras observaciones macro y microscópicas; A) plantas de azucenas con síntomas de tizón; B) Hoja con síntomas de tizón observados bajo estereoscopio con aumento de 40X, mancha marrón con borde de marrón oscuro en el haz; C) Presencia de signo con esporulación aérea en una hoja (envés) y micelio color marrón claro en la hoja, bajo estereoscopio a 100X; D) Observación bajo estereoscopio a 160X, donde se evidencia esporulación aérea, las esporas translucidas de aspecto blanquecino, en forma racimosa.

Tabla 2. Medidas de los microconidios de microcultivo.

Longitudinal			Transversal		
Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio
3.7	6.3	4.9	3.91	6.53	5.11

Tabla 3. Medidas estandarizadas para cada especie.

Insolation	Conidial size (um)
<i>Botrytis cinerea</i>	6.-18 × 4-11 (generalmente 8-140 × 6-9)
<i>Botrytis elliptica</i>	16-35 × 10-24 (generalmente 20-30 × 13-18)
<i>Botrytis scamosa</i>	16-26 × 10-18 (generalmente 15-21 × 16)
<i>Botrytis tulipae</i>	12-22 × -15 (generalmente 16-20 × 10-13)

Fuente: Ellis (1971)

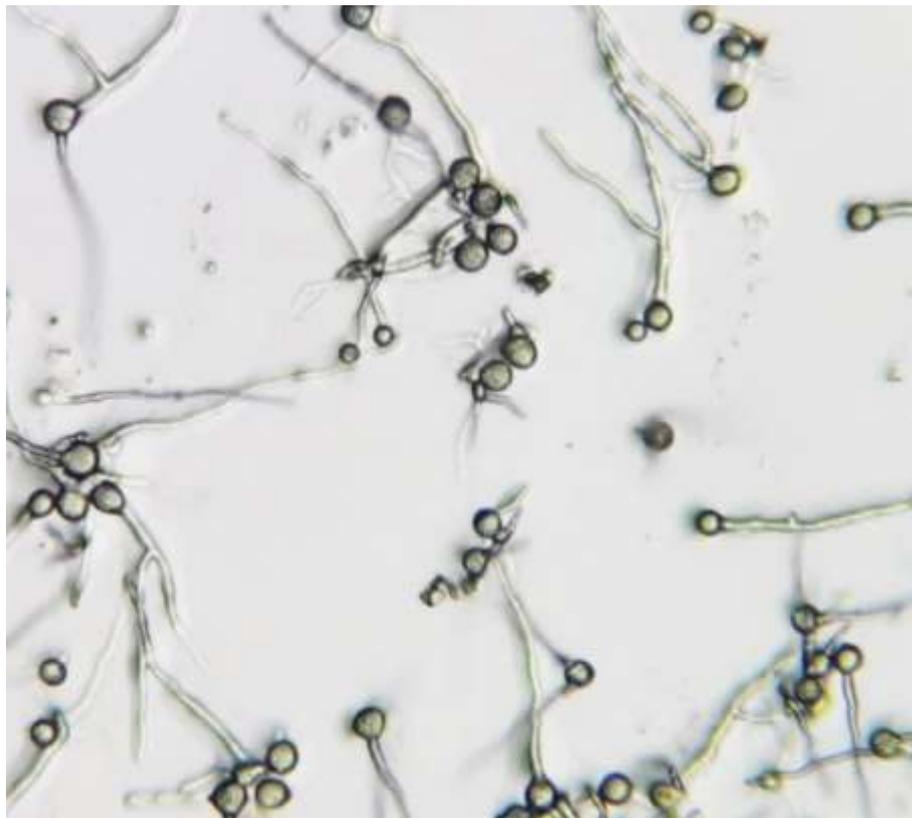


Figura 3. Esporas germinadas después de 6 horas observadas en microscopio de luz (100X).

En la figura 4 A, se observa la colonia color blanco algodónoso, que se está empezando a tornar color crema, debido a la acumulación de microconidios.

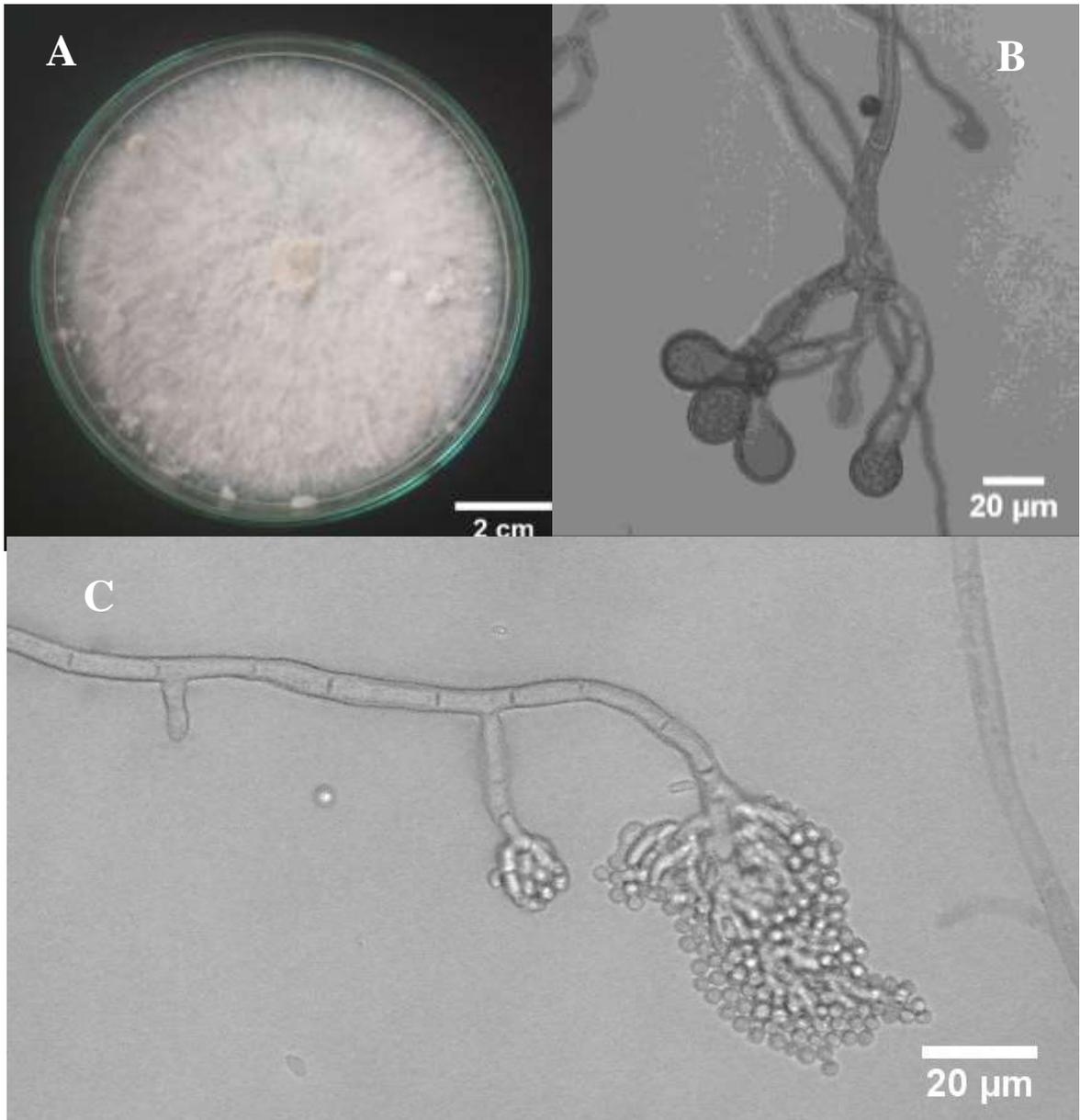


Figura 4. Estructuras del microorganismo aislado en microscopio de luz; **A)** Placa con colonia de 15 días de edad, incubado a 20° C; **B)** Macroconidios, obtenidos en microcultivo a los 7 días de incubación a 20 °C; **C)** Microconidios obtenidos también en microcultivo a los 7 días, en forma racimosa, con microconidios de 4 a 6 µm.

3.2. Caracterización fisiológica del patógeno

3.2.1. Ensayo de crecimiento del microorganismo en varias temperaturas

La temperatura de 20 °C permitió un mayor crecimiento del microorganismo (figura 6), con diferencias estadísticas con respecto a las otras temperaturas (tabla 26 del anexo), llenando la placa al séptimo día (figura 7) con una tasa de crecimiento de 5.52 (Tabla 5).

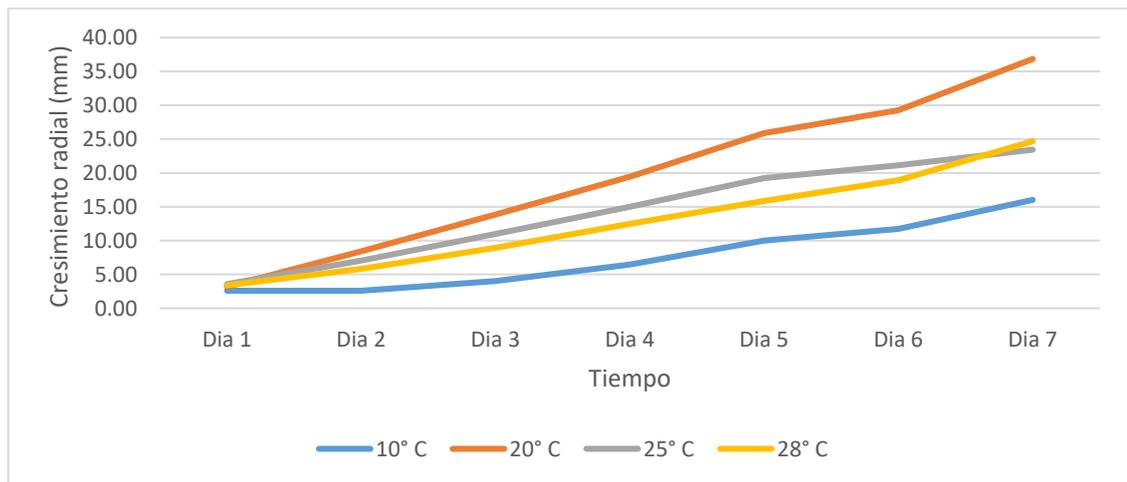


Figura 5. Media acumulada de crecimiento radial del microorganismo aislado en varias temperaturas.

Se aprecia que en la temperatura de 20 °C la tasa de crecimiento fue mayor que en las demás temperaturas.

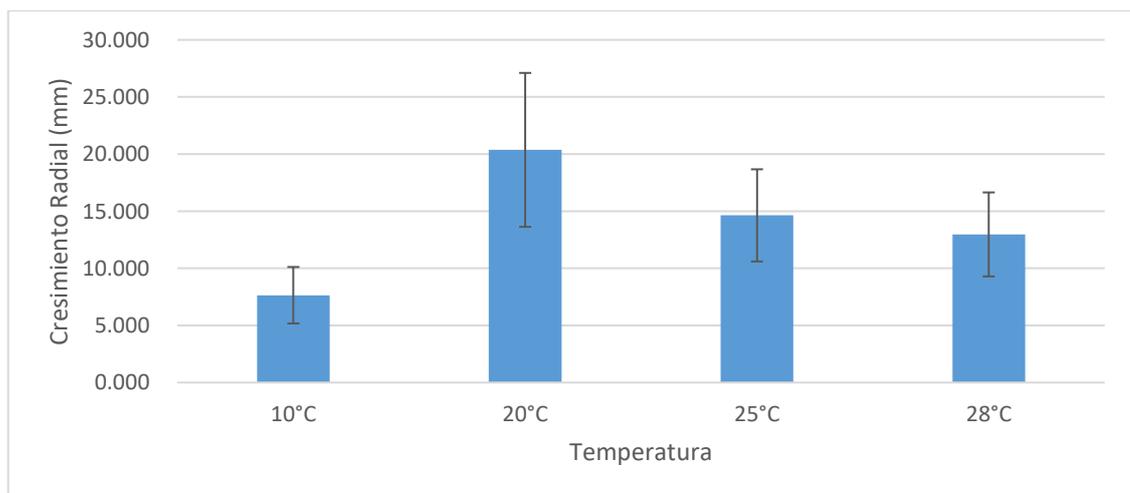


Figura 6. Medias de los grupos de temperaturas y desviación estándar del crecimiento radial con tratamientos de cuatro temperaturas.

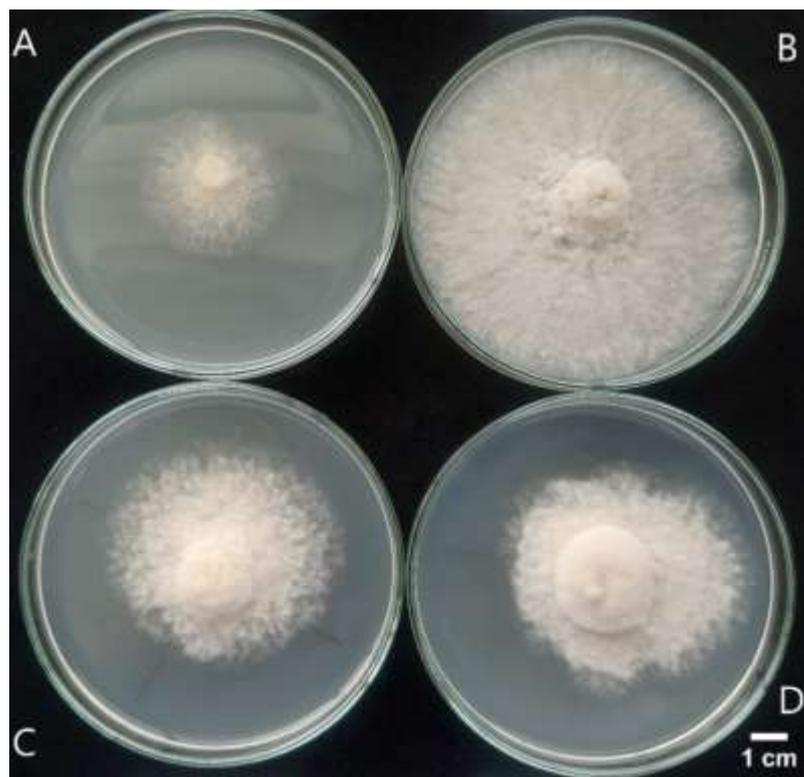


Figura 7. Imagen de crecimiento radial en diferentes temperaturas a los 7 días de incubación. **A.** crecimiento a 10°C, **B.** crecimiento a 20°C, **C.** crecimiento a 25 °C y **D.** Crecimiento a 28 °C.

Tabla 4. Tendencia de crecimiento a diferentes temperaturas

Temperatura	Tasa de crecimiento	Ecuación	R ²
10°C	2.3	$Y=2.3024x-1.5991$	0.9414
20°C	5.52	$Y=5.5226x-2.5313$	0.9965
25°C	3.42	$Y=3.4265x-0.6296$	0.9868
28°C	3.46	$Y=3.4644x-0.9922$	0.9874

3.2.2. Ensayo de crecimiento del patógeno en diferentes pH

Se realizó el ensayo en medio nutritivo con pH diferente. El patógeno presentó un crecimiento más lento en pH 12, siguiéndole el pH 8, pero en medio con pH 4 y 5.5 fue más rápido. En un periodo de 7 días las colonias llenaron toda la placa (Tabla 6).

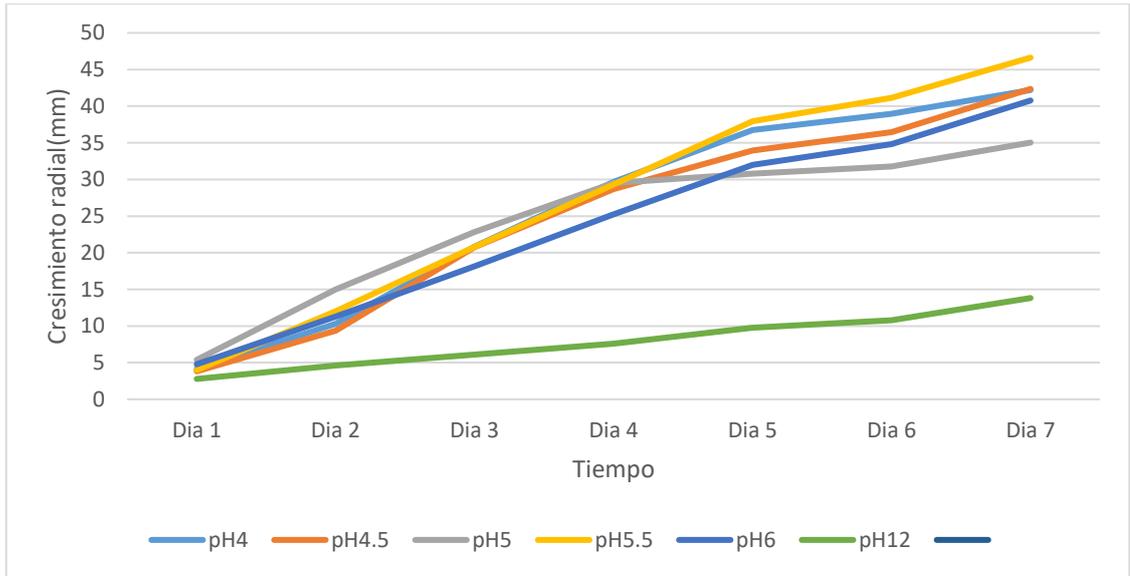


Figura 8. Crecimiento radial promedio del microorganismo en medio PDA con diferentes pH.

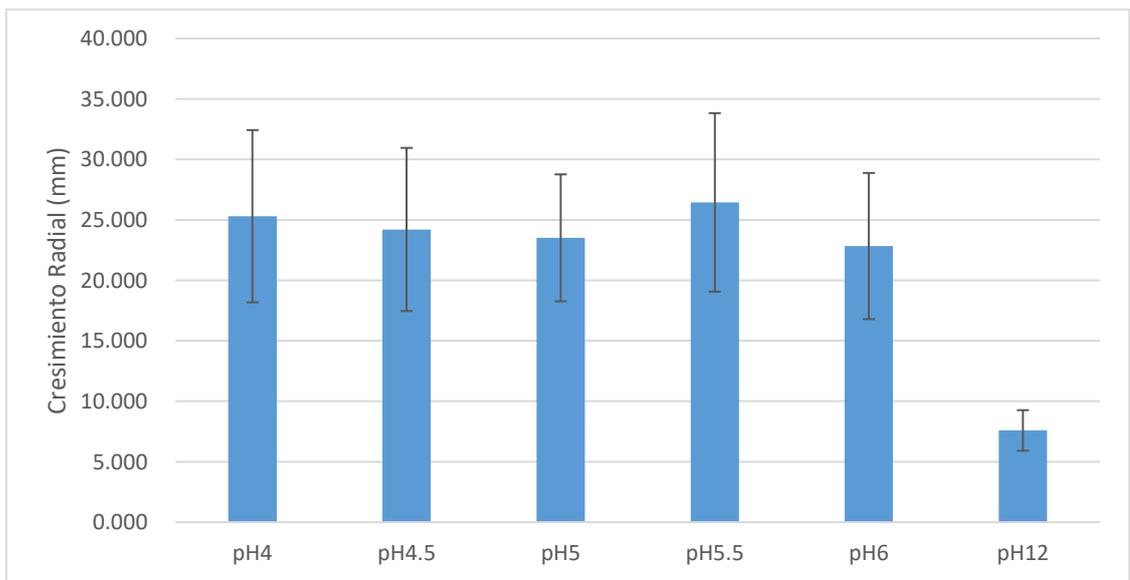


Figura 9. Comparación de grupos medias y desviación estándar en los 7 días de evaluación, incubados a 20 °C.

Se realizó un ANOVA que mostró la existencia de diferencias entre grupos. La prueba Tukey mostró que el crecimiento a pH 12 fue significativamente diferente que a pH 4, pH4.5, pH5 y pH6.

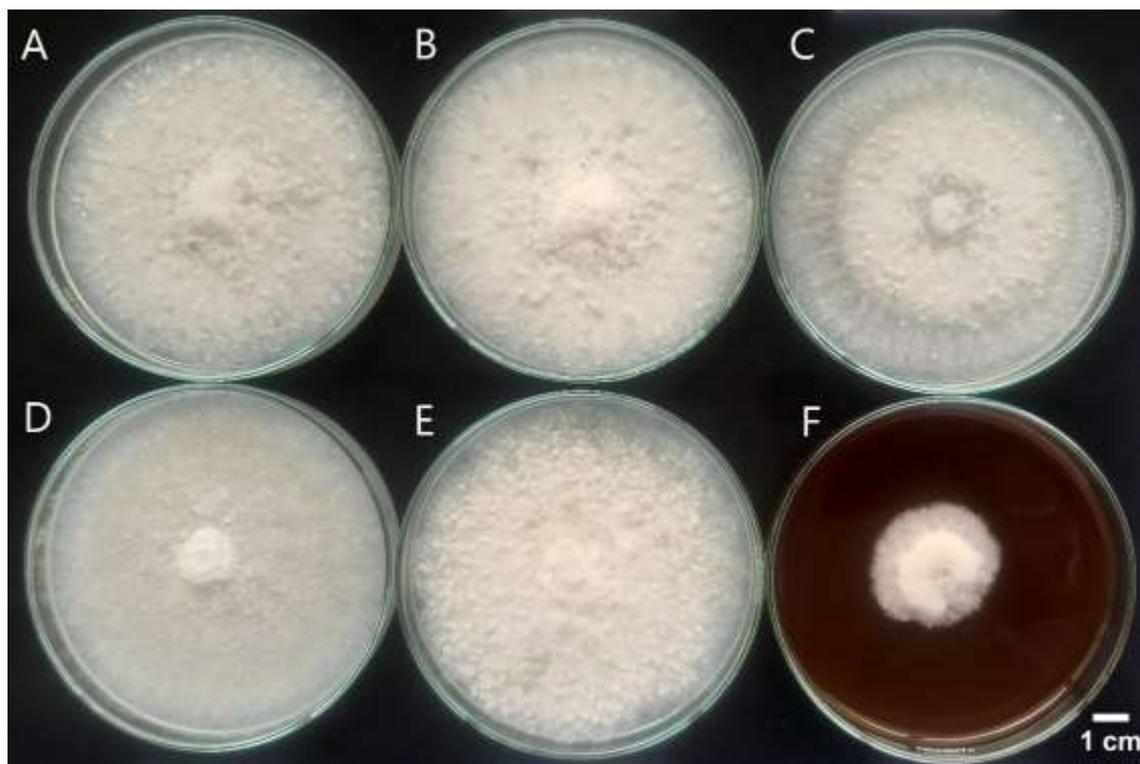


Figura 10. Crecimiento de micelio *Botrytis sp.* de 7 días de incubación a 20 ° C de temperatura. A. Medio pH4, B. medio pH4.5, C medio pH5, D medio Ph5.5, E medio pH6 y F. medio pH12.

Tabla 5. Tendencia de crecimiento en varios pH

pH	Tasa de crecimiento	Ecuación	R ²
4.0	6.69	$y=6.6924x-0.6392$	0.9573
4.5	6.53	$y=6.5343x-1.0796$	0.9664
5.0	4.65	$y=4.6592x+5.6943$	0.8849
5.5	7.25	$y=7.2588x-1.6254$	0.9831
6.0	6.029	$y=6.0294x-0.2462$	0.9900
12.			
0	1.75	$y=1.755x+0.907$	0.9887

El crecimiento de microorganismo tiene mayor tasa a pH 4.0, con 6.69.

3.2.3. Ensayo de desarrollo del patógeno en diferentes medios de cultivo

De los 12 medios de cultivo utilizados, el patógeno presentó el menor crecimiento en el agar agua y el mayor crecimiento en el medio V8, seguido por el agar medio *Lilium* y Czapek, alcanzando todos estos llenar la placa siete días después de la siembra, sin

embargo la tasa de crecimiento fue mayor en medio extracto de hojas de azucenas (MAL),(Tabla 8).

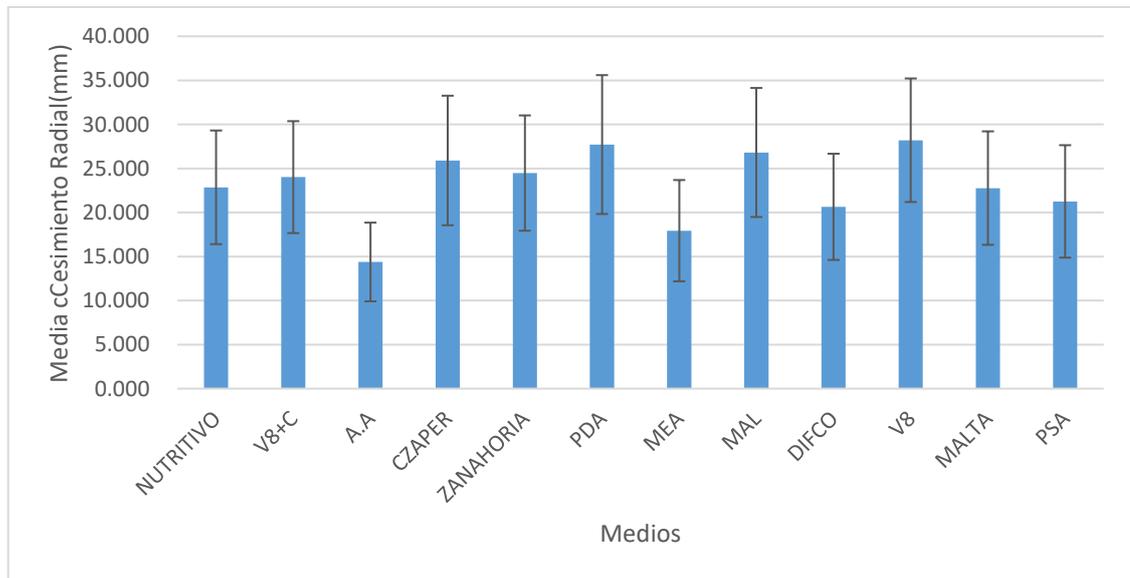


Figura 11. Promedio de crecimiento de micelio en diferentes medios por 7 días a 20 °C.

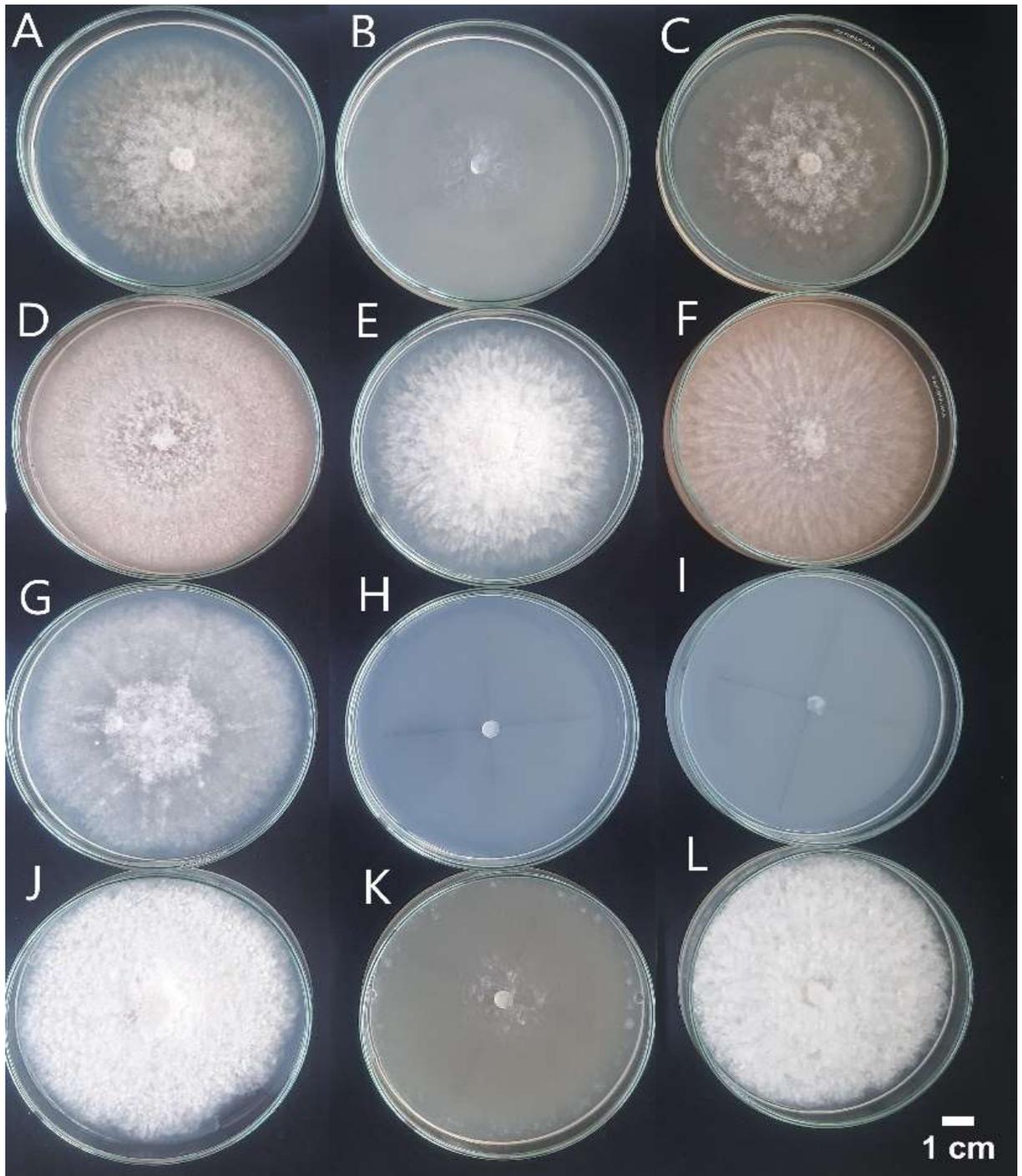


Figura 12. Crecimiento radial en diferentes medios, incubados por 7 días a 20 °C. **A)** Medio Difco; **B)** Medio zanahoria dextrosa; **C)** Medio Nutritivo; **D)** Medio V8; **E)** Medio papa dextrosa agar; **F)** Medio V8 más carbonato de calcio; **G)** Medio papa dextrosa agar más malta; **H)** Medio harina de maíz; **I)** Medio agar agua; **J)** Medio papa sacarosa agar; **K)** Medio extracto de hojas de azucenas dextrosa agar; **L)** Czapek.

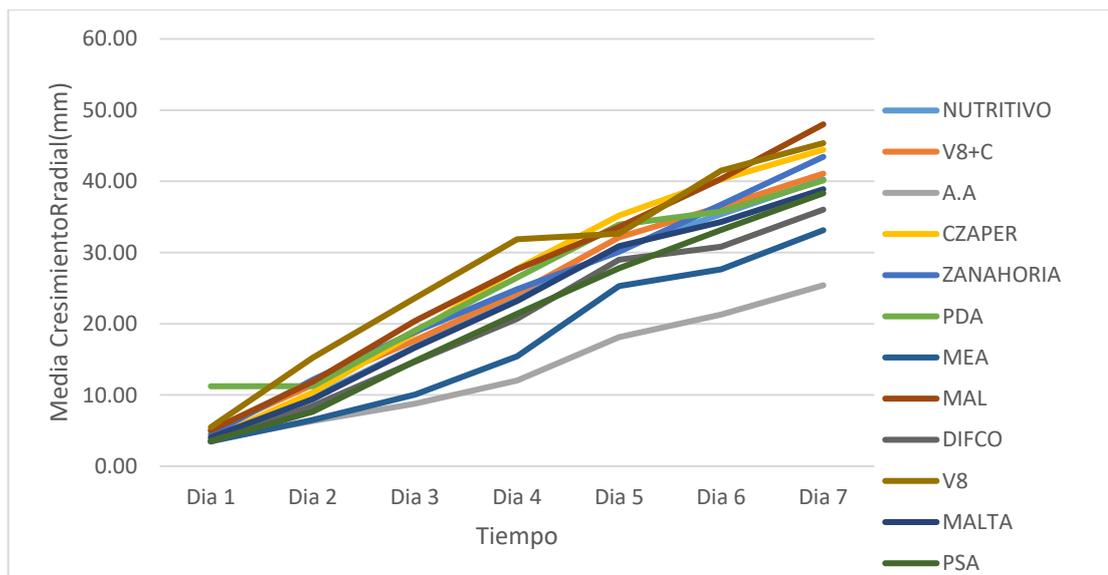


Figura 13. Promedio de crecimiento de micelio en el tiempo en diferentes medios de cultivo, incubados en el lapso de 7 días a 20 °C.

Tabla 6. Tendencia de crecimiento en varios medios

Medio	Tasa de crecimiento	Ecuación	R ²
Nutritivo	6.27	Y=6.2711X-2.249	0.995
V8+C	6.17	Y=6.1744X-0.698	0.9942
A. A	3.73	Y=3.7362X-1.2871	0.9846
CZAPER	7.06	Y=7.0641X-2.4601	0.9875
Zanahoria	6.33	Y=6.3329X-0.9602	0.9979
PDA	3.38	Y=5.3805X+3.8759	0.9647
MEA	5.23	Y=5.232X-3.5654	0.976
MAL	7.1063	Y=7.1063X-1.7281	0.9983
DIFCO	5.59	Y=5.5994X-1.9471	0.987
V8	6.47	Y=6.4737X+2.0701	0.9696
MALTA	6.02	Y=6.0211X-1.604	0.99
PSA	6.012	Y=6.012X-3.0989	0.9966

Medio con más tasa de crecimiento fue medio agar extracto Lilium (MAL), con 7.10.

3.2.4. Ensayo de desarrollo de *Botrytis sp.* in vitro con dos fuentes de carbono

El ensayo de desarrollo de *Botrytis sp.* con dos fuentes de carbono fue incubado por 7 días a 20 °C y medido el crecimiento radial diario, se obtuvo que el crecimiento es más

rápido con fuente de carbono sacarosa. (tabla 27 en anexo), con tasa de crecimiento de 5.24 (tabla 9).

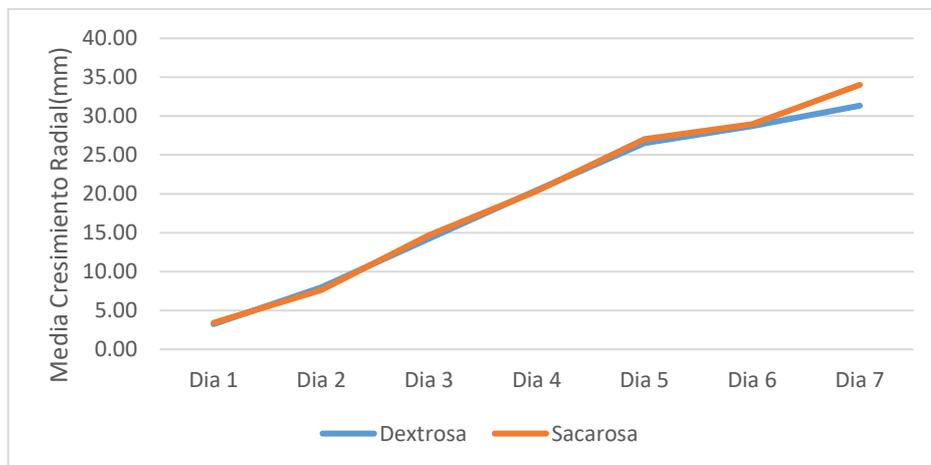


Figura 14. Línea de tiempo de crecimiento radial de *Botrytis sp.* en medio de cultivo con diferentes fuentes de carbono.

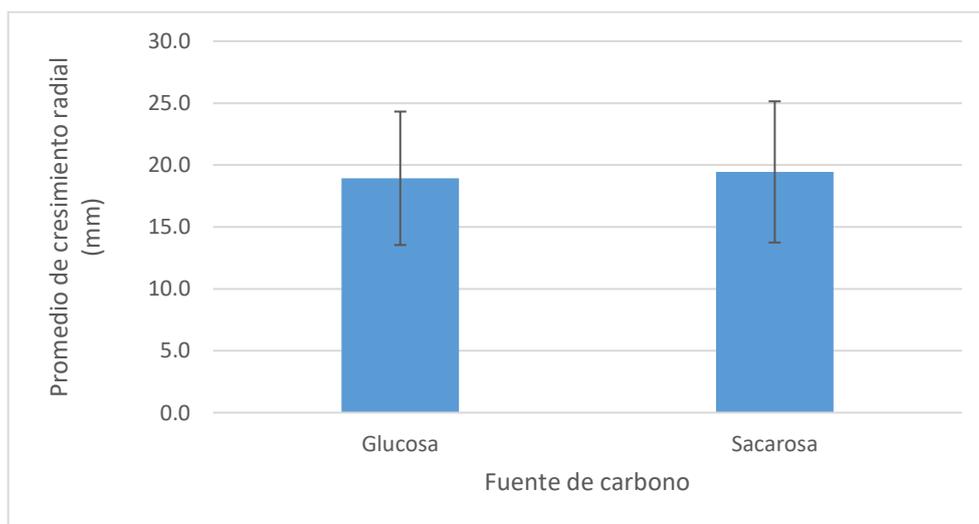


Figura 15. Promedio de crecimiento radial de *Botrytis sp.* en medios de cultivo in vitro con dos fuentes de carbono.

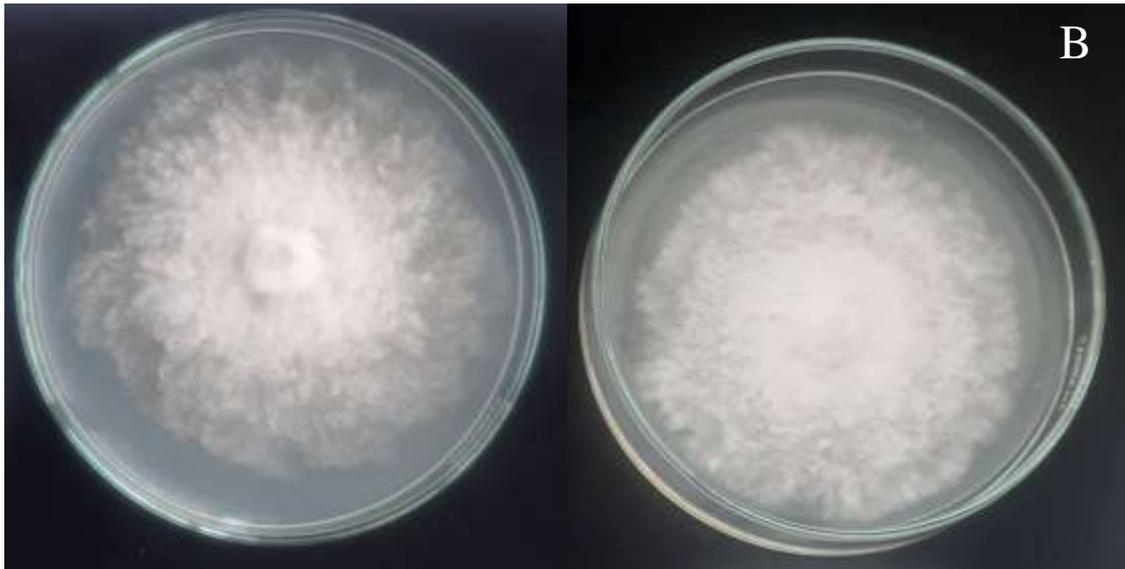


Figura 16. Crecimiento radial de *Botrytis sp.* en medios con varias fuentes de carbono; A) Sacarosa; B) Glucosa.

Tabla 7. Tendencia de crecimiento en dos fuentes de carbono

Fuente de Carbono	Tasa de crecimiento	Ecuación	R ²
Dextrosa	4.92	$Y=4.9284x-0.7838$	0.9753
Sacarosa	5.24	$y=5.2423x-1.5273$	0.9861

La fuente de carbono con más tasa de crecimiento fue la sacarosa con 5.24 mm por día.

3.3. Interacción planta patógeno

3.3.1. Ensayo de resistencia de híbridos orientales

Los síntomas característicos del tizón pudieron ser observados un día después de la inoculación de los híbridos orientales introducidos para la producción local. Estos consistieron en necrosis con apariencia acuosa. La variedad híbrida oriental Hyde Park, de color anaranjado, presentó la mayor severidad, cinco días después de la inoculación con heridas, con 55% del área foliar necrosada, y con 38 % de severidad cuando la inoculación fue sin heridas. La variedad híbrida oriental Fucsia presentó la menor incidencia, con 32% y 28% de severidad, cuando la inoculación fue con y sin heridas, respectivamente. La azucena blanca (*Lilium candidum*), que es comúnmente cultivada en la zona y utilizada como control, presentó la menor severidad, de 14% y 10% al ser inoculada con heridas y sin heridas, respectivamente.

Tabla 8. Promedio de los porcentajes de severidad.

Híbridos Asiáticos	Media Heridas	con Std. Dev	Media Sin Heridas	Sin Std. Dev
Fucsia	31.82	5.88	27.59	8.15
Crema	50.29	14.16	39.38	15.33
Naranja	55.33	11.78	37.53	6.41
Azucena	12.89	7.97	10.42	1.07

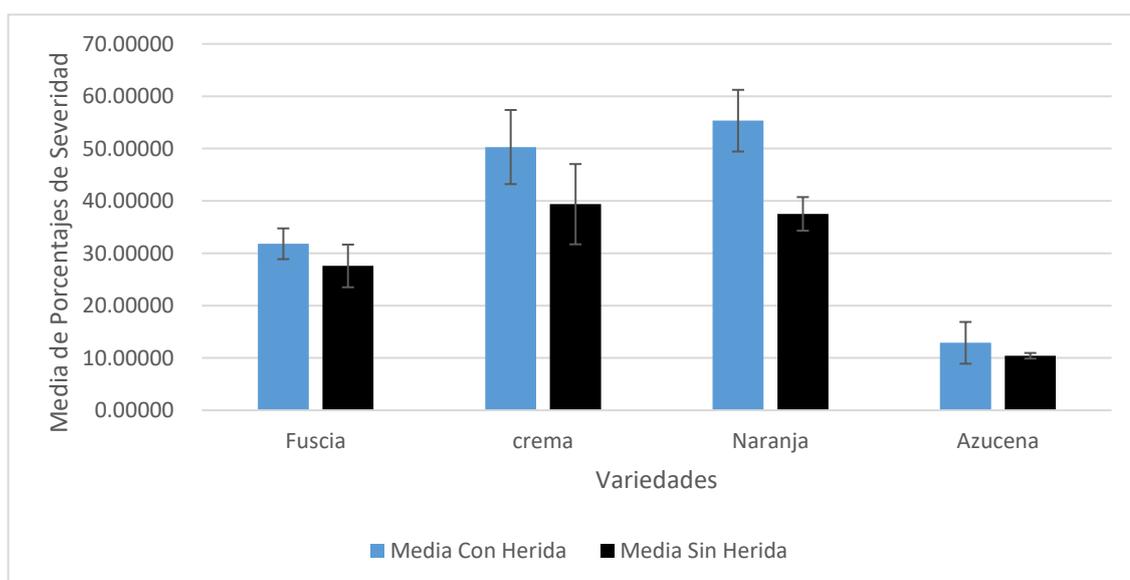


Figura 17. Promedio porcentajes de severidad de *Botrytis sp.* inoculado en 4 variedades, después de 5 días a 15 °C y 80% de humedad relativa.

3.3.2. Ensayo de virulencia del microorganismo de acuerdo con la edad de la hoja

Las hojas fueron recolectadas de plantas de 3 meses de edad cultivadas en invernadero. Se encontraron diferencias significativas en la susceptibilidad de acuerdo con la edad de la hoja inoculada, las hojas más cercanas al suelo o hojas del tercio inferior son más susceptibles estadísticamente con heridas y sin heridas (figura 19, figura 21 y tabla 31 y tabla 33 del anexo), en las inferiores la tasa de incremento del área necrosada fue mayor que las otras hojas (tabla 10).

En las hojas inferiores la tasa de incremento del área necrosada por el patógeno es mayor que las otras hojas.

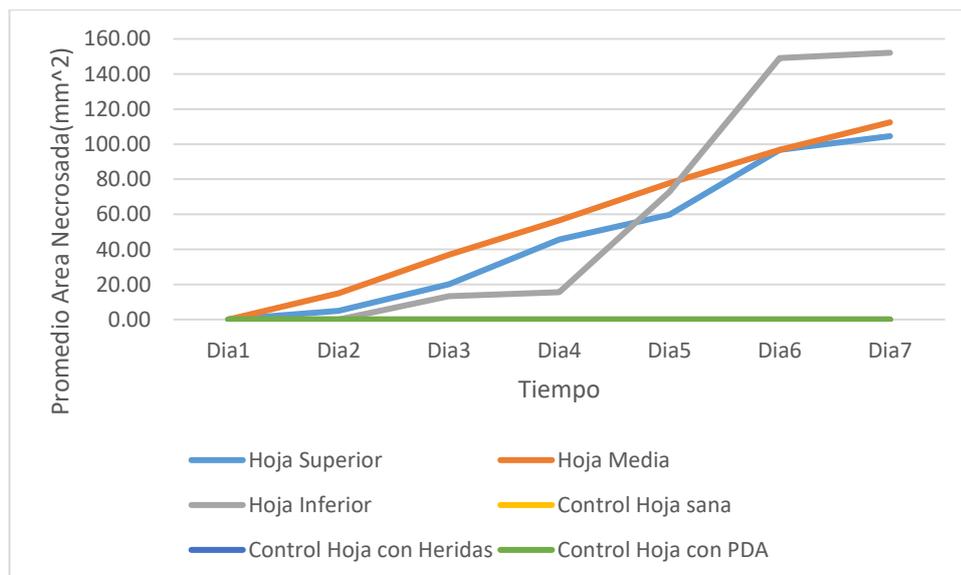


Figura 18. Promedio de área necrosada en el tiempo en hojas sin heridas

Tabla 9. Tendencia del incremento del área necrosada, tratamiento sin heridas

Hoja	Tasa de incremento	Ecuación	R ²
Hoja superior	19.17	$Y=19.172X-29.333$	0.9664
Hoja media	19.33	$Y=19.339X-20.898$	0.998
Hoja inferior	29.07	$Y=29.07X-58.739$	0.8482

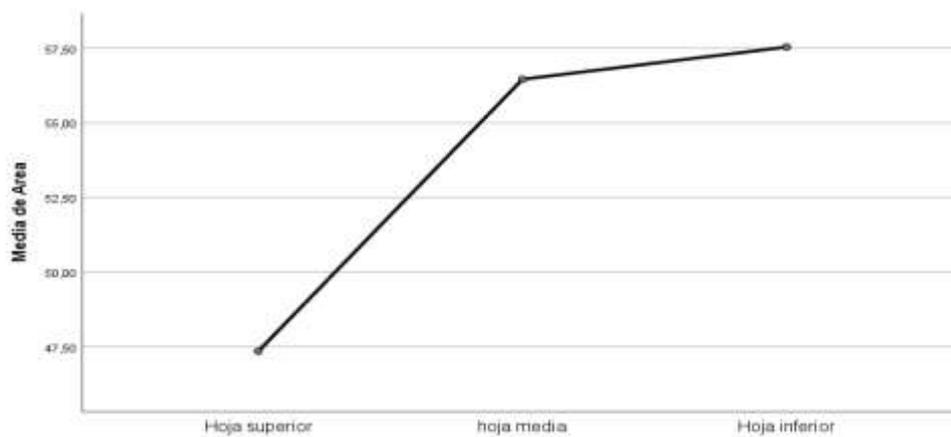


Figura 19. Medias del área necrosada en las hojas de acuerdo a su ubicación tratamiento sin heridas

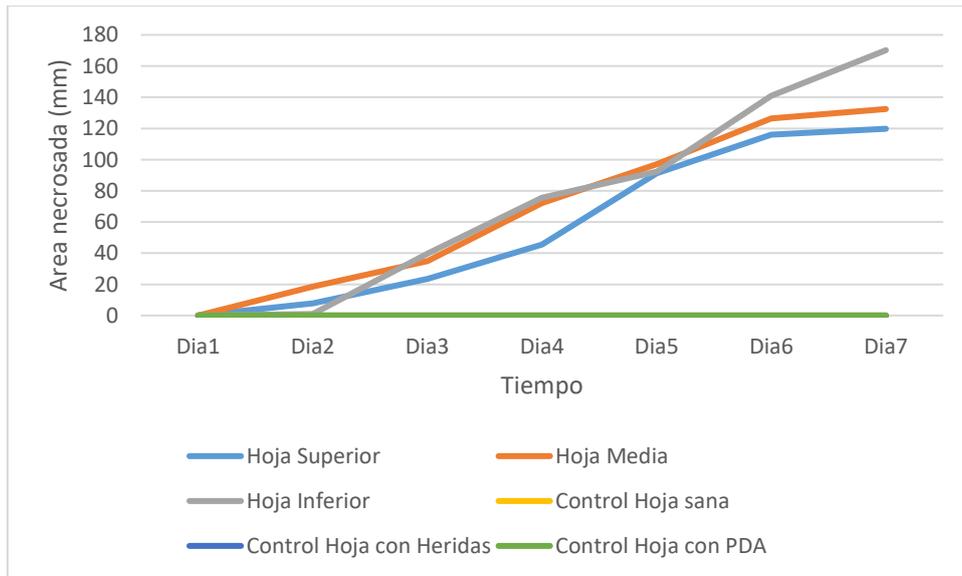


Figura 20. Promedio de área necrosada en el tiempo en hojas con heridas.

Tabla 10. Tendencia del incremento del área necrosada, tratamiento con heridas

Hoja	Tasa de incremento	Ecuación	R ²
Hoja superior	22.97	$Y=22.976x-43.202$	0.9531
Hoja media	24.12	$Y=24.125X-27.708$	0.9816
Hoja inferior	30.1	$Y=30.103X-46.163$	0.9744

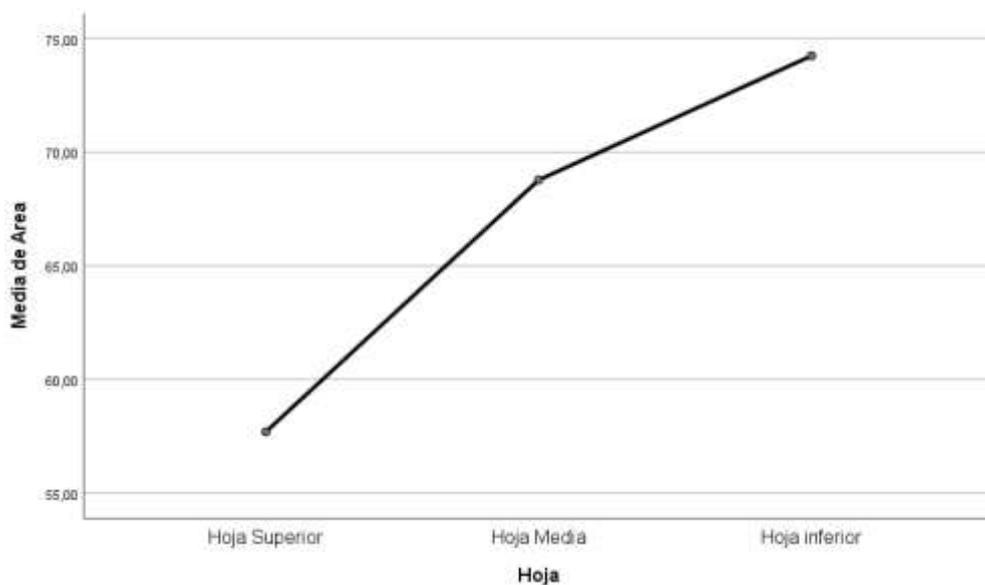


Figura 21. Medias del área necrosada en las hojas de acuerdo a su ubicación tratamiento con heridas

En el ensayo de virulencia del patógeno por ubicación de la hoja, en plantas inoculadas in vitro, de 5 meses de edad, separando en 3 partes, inferior, media, superior, realizando la prueba ANOVA, se determinó que existe diferencia significativa entre los grupos (hojas inferiores, hojas parte media, hojas parte superior), las hojas inferiores son más susceptibles.

3.3.3. Ensayo de virulencia del microorganismo en plantas mantenidas en cámara húmeda

El ensayo de inoculación en plantas en cámara húmeda con temperatura promedio de 17.2°C y humedad relativa de 81.6 % promedio dio como resultado, que las plantas que fueron heridas e inoculadas por el envés fuesen más susceptibles pero la desviación estándar es más grande que del grupo de las plantas que fueron heridas e inoculadas por el haz, esto quiere decir que la diferencia entre el rango de los números es mayor en el porcentaje mínimo y máximo de severidad por ende se tiene como resultado que no existe diferencia significativa en la inoculación con heridas entre el haz y envés como se muestra en el análisis de varianza (Anexo Tabla 25). Mientras que en el ensayo de inoculación por el haz sin heridas no se infectó ninguna planta pero las plantas que fueron inoculadas con disco de micelio sin realizar heridas en el envés 1 de 5 plantas inoculadas sin heridas se infectó. sin embargo la tasa de mayor crecimiento del patógeno fue cuando se inoculo por el envés y con heridas (Tabla 12).

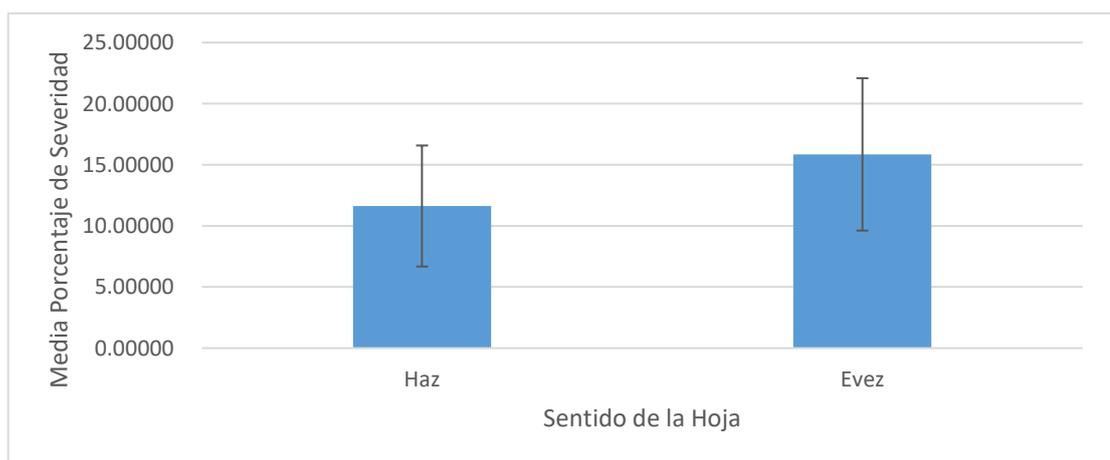


Figura 22. Medias y desviación estándar de la severidad de plantas heridas e inoculadas

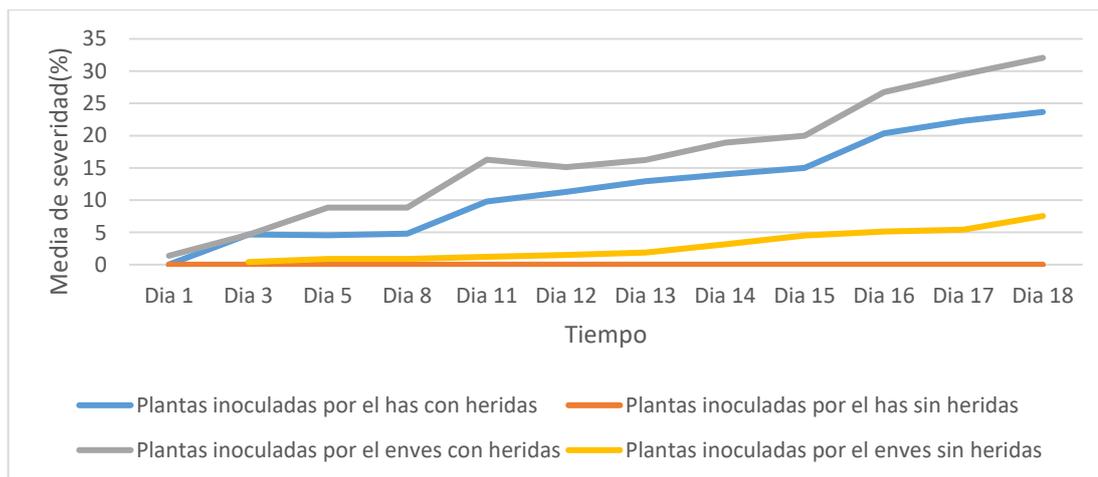


Figura 23. Desarrollo de la incidencia de la enfermedad en plantas inoculadas y puestas en cámara húmeda con parámetros atmosféricos controlados.

Tabla 11. Tendencia del incremento del área necrosada en las hojas de plantas en cámara húmeda

Hoja	Tasa de incremento	Ecuación	R ²
Plantas inoculadas por el has con heridas	2.07	$Y=2.0779X-1.5563$	0.9724
Plantas inoculadas por el has sin heridas	0	0	0
Plantas inoculadas por el envés con heridas	2.62	$Y=2.6276X-0.266$	0.9665
Plantas inoculadas por el envés sin heridas	0.67	$Y=0.7694X-1.7955$	0.9133



Figura 24. Plantas en edad de floración inoculadas en el haz y el envés con discos de PDA con micelio.

La tasa de crecimiento de la infección por el organismo fue en hojas de plantas inoculadas por el envés con heridas.

3.3.4. Ensayo de virulencia del microorganismo aislado en hojas in vitro

Plantas de azucena en etapa de floración fueron inoculadas con discos de PDA de 5 mm de diámetro conteniendo micelio del hongo. Al noveno día, la severidad encontrada fue de 23.7 y 11.63% (figura 25) cuando las hojas fueron inoculadas previa realización de heridas y sin ellas, con diferencias significativas de acuerdo con la prueba F (Anexo Tabla 36), la tasa de colonización fue mayor en las hojas con heridas, inoculadas con el patógeno (Tabla 13).

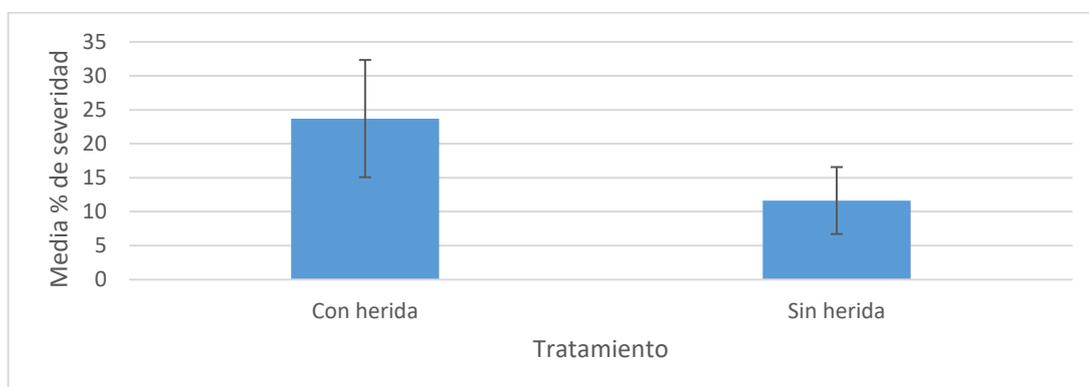


Figura 25. Promedio de la severidad 9 días después de la inoculación de hojas con y sin heridas.

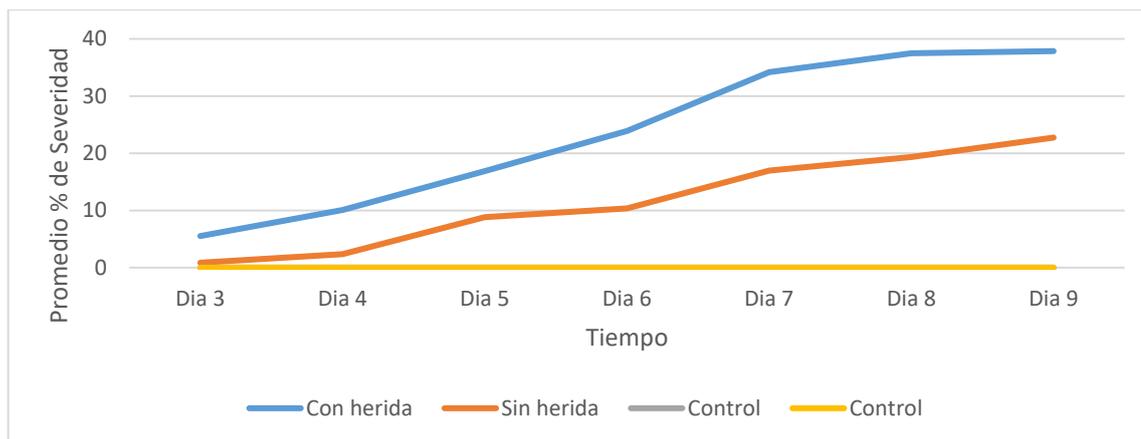


Figura 26. Promedio de la severidad en el tiempo de plantas inoculadas previa realización de heridas.

Tabla 12. Tendencia del área necrosada en hojas de azucena inoculadas in vitro

Tratamiento	Tasa de Crecimiento	Ecuación	R ²
Con herida	6.03	$Y=6.03398X-0.4561$	0.9613
Sin Herida	3.84	$Y=3.8467X-3.7476$	0.9808

El crecimiento del patógeno es más virulento cuando la hoja tiene heridas, la tasa de crecimiento es de 6.03.

3.3.5. Ensayo de rango de hospederos del microorganismo aislado

Discos de PDA de 4mm de diámetro conteniendo micelio fueron depositados en las hojas en plantas de tres meses de edad de frejol (*Phaseolus vulgaris*), pepinillo (*Cucumis sativus*), cebolla china (*Allium fistulosum*), col (*Brassica oleracea var. capitata*), lechuga (*Lactuca sativa*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) figura 28 A, (figura 27), en condiciones de campo, con 16 °C y humedad relativa de 60%. Ninguna de estas plantas inoculadas en duplicado presentó síntomas. Sin embargo, plantas de rosa (*Rosa sp.*) Figura 27, inoculadas y mantenidas en cámara húmeda, con temperatura promedio de 18 °C y 90% de humedad relativa sí presentaron síntomas de infección.



Figura 27. Inoculación en hojas de rosa (*Rosa* spp.), colocadas en cámara húmeda.



Figura 28. Inoculación en varias plantas con *Botrytis* sp. aislado de azucenas; A) Tomate (*Solanum lycopersicum*), B) lechuga (*Lactuca sativa*), C) Col (*Brassica oleracea* var. *Capitata*), D) cebolla china (*Allium fistulosum*), E) Frejol (*Phaseolus vulgaris*), F) Pepinillo (*Cucumis sativus*).

3.3.6. Ensayo de virulencia de *Botrytis cinerea* aislado de fresa

Un aislamiento de *Botrytis cinerea* fue obtenido de frutos de fresa (*Fragaria*) por el método directo de aislamiento. Las lesiones en los frutos presentaban micelio de color gris (figura 29). La colonia pura obtenida in vitro presentó características similares a las presentadas por el aislado de azucena: micelio blanco que con el pasar de los días se torna marrón claro, de aspecto compacto polvoriento con abundante esporulación a los 7 días, pero sin microconidios. Las esporas fueron medidas (Tabla 14), y los valores se ubican dentro del rango reportado para *Botrytis cinerea* (Tabla 4). El ensayo de virulencia se realizó inoculando hojas de azucenas de 4 meses con discos 5 mm conteniendo micelio. A los siete días, la severidad llegó al 25% y 5%, en las inoculaciones con y sin heridas, respectivamente (Figura 30). La tasa de crecimiento fue mayor en inoculaciones en hojas con herida (Tabla 15).



Figura 29. Sintoma y colonia de *Botrytis cinerea* aislado de fresa.; **A)** Planta de fresa, con necrosis del fruto y evidencias de crecimiento de estructuras aéreas de un microorganismo fúngico, **B)** Crecimiento del microorganismo 15 días después a 20°C, en placa de Petri con medio PDA.

Tabla 13. Medidas de macroconidios de *Botrytis cinerea* aislado de fresa.

Medida Longitudinal			Medida Transversal		
Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo
10.90	9.26	12.49	7.03	5.65	9.13

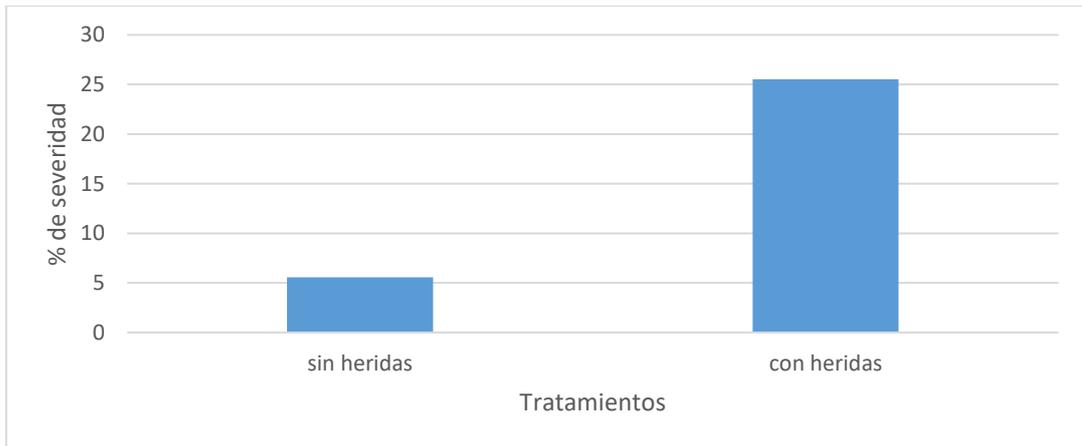


Figura 30. Porcentaje de severidad de *Botrytis cinerea* en 7 días, en hojas de azucenas.



Figura 31. Hojas de azucenas inoculadas con *Botrytis cinerea*, trascurrido 3 días, **A)** Inoculación sin heridas. **B)** Inoculación con heridas.

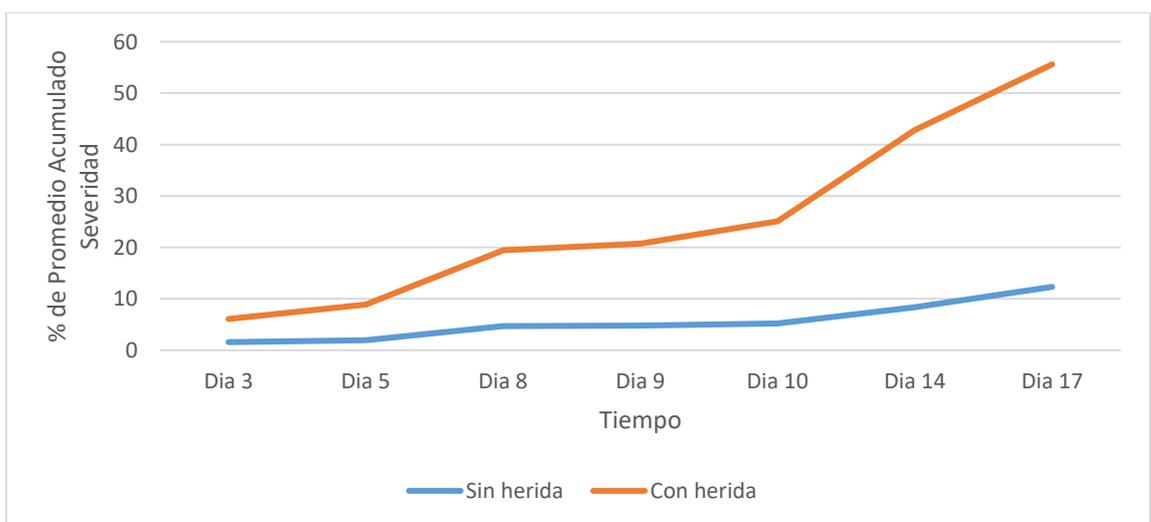


Figura 32. Porcentaje promedio de severidad de *Botrytis cinerea* en azucenas hasta 17 días, con dos tratamientos con heridas y sin heridas.

Tabla 14. Tendencia del área necrosada en hojas de azucena inoculadas con *Botrytis cinerea* aislado de fresa

Tratamiento	Tasa de Crecimiento	Ecuación	R ²
Sin heridas	1.63	Y=1.6311X-0.9642	0.88.48
Con heridas	7.92	Y=7.9294X-6.1992	0.918

Botrytis cinerea aislado de fresa tiene mayor tasa de colonización con heridas

3.3.7. Ensayo de enfrentamiento entre *Botrytis cinerea* aislado de fresa y *Botrytis sp.* aislado de azucena

Los aislados se enfrentaron en ocho ocasiones sembrando un disco de cada aislado en extremos opuestos de la placa de Petri. La zona de intersección presentó una coloración gris (figura 33).



Figura 33. Enfrentamiento entre *Botrytis cinerea* (izquierda) y *Botrytis sp.* (derecha), transcurridos 10 días a 20 ° C.

IV. DISCUSIÓN

Durante las visitas de campo se observó el tizón característicamente causado por *Botrytis spp.*, consistente en manchas marrones claras, con borde marrón oscuro, resultados similares encontrados por los autores Daughtrey et al, (2012), Bastiaansen et al, (1996), Elad et al, (2004), Cabrera, (2005), Dhyani et al, (2012), Grant et al, (2004). Así mismo, Qiong (2006) encontró que un 82.5% de sus aislamientos de síntomas, fueron identificados *Botrytis elliptica*. Los aislados obtenidos en el presente trabajo presentaron color blanco, esponjoso y aéreo. Sin embargo, el micelio no se tornó de color marrón o gris, que es característico de *Botrytis sp.* En su lugar, la colonia presentó con el pasar de los días un color crema, parecido a lo encontrado por Zhang et al. (2010) con *Botrytis scamosa* obtenido de plantas del género *Allium*. En ese caso, otras características biológicas eran parecidas a las de *B. cinerea* y sólo pudo verificarse su identidad mediante técnicas de genética molecular. En el presente trabajo fue posible observar microconidios a partir de los cuatro días de incubación a 20 °C. A los 30 días de edad, no se encontró evidencia de la existencia de macroconidios en la colonia. Sin embargo, al realizar micro cultivos sí se observaron macroconidios a los 6 días de edad. Las dimensiones de estos fueron de 24.6 - 63.9 × 16.2 - 34.8 µm. Las esporas que fueron recolectadas directamente del campo fueron de 16.4 -23.9 × 15.7 - 24.1 µm.

Los microconidios obtenidos invitro, fueron inoculadas en hojas con heridas y sin heridas, no mostraron síntomas por lo que talvez no infectaron o colonizaron. Jarvis (1977) también comprobó que los conidios no infectan. Por otra parte, Liu et al (2013) encontró que *Botrytis scamosa* forma microconidios de 3 - 4 µm y macroconidios de 11.2 - 18.7 × 11.3 - 16 µm. Estos últimos se formaron a los 60 días y a 0 °C. Doss (1984) encontró formación de microconidios de 2 × 3.4 µm a los 3 días cuando *Botrytis elliptica* fue cultivado a 20 °C y con exposición a luz ultravioleta. A los 12 días aparecieron macroconidios de 18 - 32 × 13 - 24 µm. Sin embargo, Grigaliūnaitė (2001) obtuvo microconidios de 2µm y macroconidios de 9.8 × 7.2 µm, mientras que Ellis (1971) obtuvo macroconidios de 20 - 30 × 13-18 y Chang et al (2001) macroconidios de 21 – 31 × 12 - 23 µm, en la misma especie. Las esporas *B. elliptica* son las más grandes de todas las especies (Ellis ,1974, como se citó en Chang et al ,2001). Agrios (1995) indica que algunos microorganismos necesitan luz ultravioleta o condiciones adversas para esporular. Furukawa et al, (2005), obtuvo conidios del tamaño de 21.5 a 20 micrómetros.

B. elliptica y *B. scamosa* comparten muchas características parecidas como tamaño de macroconidios y el color de la colonia. Staats (2005) mostró que ambos son filogenéticamente próximos y *B. cinerea* más distante.

Mirzaei et al (2007) reportó macroconidios de *B. cinerea* de $6 - 13 \times 4 - 8 \mu\text{m}$. Es notoria la diferencia de tamaño con las otras especies antes mencionadas. Además, la colonia al inicio fue de color blanco y posteriormente se tornó gris y con aspecto compacto, polvoriento. Jarvis (1977) reportó dimensiones de macroconidios de $11.7 \times 9.3 \mu\text{m}$ y $6.15 \times 1 - 12 \mu\text{m}$, Song et al. (2017) dimensiones de $10.4 \pm 2.2 \times 6.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ y Plesken et al (2015) $12-2 \times 8 -1 \mu\text{m}$ para *B. cinerea*. Walker et al, (2011) encontró que sus colonias presentaron color marrón a los 10 días de edad y las esporas presentaron dimensiones de 10 y 15 μm , indicando que esto es característico de *B. cinerea* y *B. pseudocinerea*.

Kim (2007) encontró diferencias morfológicas entre *B. cinerea* y *B. elliptica*. *B. elliptica* presentó esporas de $18.1 \times 28.8 \mu\text{m}$ y *B. cinerea* $8.5 \times 12.9 \mu\text{m}$. *B. elliptica* mostro patogenicidad en la hojas y flores, mientras que *B. cinerea* fue patogénico sólo en las flores. Varios autores indican que *B. elliptica* está restringido al género *Lilium* (Hennebert, 1973, Van et al (2007), mientras que *B. cinerea* y *Botrytis tulipae* no, Van et al (2004). Van et al, (1931) encontró que *B. elliptica* es más devastador y forma esclerocios en las hojas. Vinay (2008), indica que *Botrytis elliptica* está cambiando y teniendo más hospederos pudiendo infectar a gladiolo, tulipán, guisantes y espinaca, pero llega a ser tan virulento como en el género *Lilium*. En el experimento de agresividad que realizados en varias plantas de varios géneros diferentes no se pudo evidenciar síntomas, talvez no infecto o colonizo, talvez no hubo esta infección o colonización debido a la baja humedad relativa que se presentó en campo abierto ya que para que germine *Botrytis sp.* necesita de alta humedad relativa.

En la presente investigación se encontró que la germinación de macroconidios fue del 100% a las 6 horas de incubación. Hsieh et al. (2001) encontró 70% de germinación de conidios de *B. elliptica* a las 3 hora. Doss et al. (1988) reportó germinación de 90% a las 5 horas y Hou et al (2003) 80.4% a las 6 horas, mientras que *B. cinerea* presentó solo el 5%. Además, fue más virulento, con 63.5% de necrosis foliar en 12 horas mientras que

B. cinerea solo causó muy pequeñas manchas. resultados similares encontrados en el postulado.

Las especies de *Botrytis spp.* raramente presentan la fase sexual. *B. elliptica* sí presenta fase sexual Staats et al (2007). Produciendo microconidios en gran cantidad.

Hsieh et al, (2001), tuvo resultados que al tercer día de inoculación in vitro porciones de hojas colocadas en placa de Petri, obtuvo 80% de severidad, mientras que en nuestra investigación se trabajó con un área más grande obteniendo un área mayor de síntoma a los tres días.

Los resultados del presente trabajo mostraron que la temperatura de 20 °C fue la que permitió mayor rapidez en el crecimiento, tal como reportado por Furukawa et al,(2005). *B. elliptica* crece más rápido a 15.6 °C (Sheng et al. (1984), Tang et al (1998)). El comportamiento de *B. cinerea* (Martinez et al, 2003; Samuel et al., 2012; Hsinga et al ,1991), y de *B. scamosa* es semejante (Liu et al (2013)).

En nuestro trabajo se realizó previamente un experimento de pH de 4, 6, 8, 10, 12, mostrando que en pH extremos el pH4 y pH 12 crece *Botrytis sp.* aislado de azucenas , pero el crecimiento era mejor en pH ácido entre 4 a 6 ,se propuso acortar el rango ,para encontrar más acertadamente el pH que mejor crecimiento tiene la colonia de *Botrytis sp.* ,por lo que se muestra los resultados desde pH 4,4.5,5,5.5,6 entonces en el ensayo del efecto del pH en el crecimiento, se encontró que a pH 4 y 5.5 el aislado obtenido de *Lilium* creció más, lo que coincide con los resultados de Liu et al (2013) para *B. elliptica*.

En el ensayo de resistencia de variedades se encontró que la variedad Hyde Park fue la menos afectada, con 30% a 40 % de severidad. Los demás híbridos orientales presentaron severidad superior al 50%. La variedad que ya lleva varios años siendo cultivada en la localidad de Taquia y que es la que más predomina, comúnmente llamada azucena (*Lilium candidum*), fue la que mayor resistencia presentó, con 10% de severidad a los 7 días. Daughtrey et al, (2012) trabajo con algunas variedades que coinciden con las del presente trabajo y encontró diferencias significativas en la resistencia cuando son expuestas a *B. elliptica*. Algunas de ellas presentaron hasta el 70% de severidad. Liu et al, (2019), también encontró híbridos asiáticos resistentes a *B. elliptica*.

En el ensayo de evaluación de la virulencia del patógeno en plantas bajo condiciones de cámara húmeda la inoculación fue realizada con micelio porque no se logró conseguir esporulación in vitro. Los síntomas empezaron a aparecer al segundo día de la inoculación realizada en el envés de las hojas, mientras que cuando la inoculación se realizó en el haz, los síntomas aparecieron a partir del tercer día, tal como reportado por Furukawa et al ,(2005) con solo en 25% de las plantas. En el primer caso, el patógeno es más virulento cuando la hoja presenta heridas. En el segundo caso, es decir, por el envés, no hay diferencia y la patógena causa tanto daño en hojas intactas como en hojas con injurias mecánicas. Doss (1984,) encontró resultados semejantes. Sin embargo, cuando la inoculación fue realizada por el haz, sólo hubo infección si el tejido estaba previamente damnificado.

El aislado de *Botrytis cinerea* obtenido de fresa mostró diferencia significativa en la virulencia, comparado con el aislado de Liliun. Este aislado de fresa presentó características más típicas de *B. cinerea* y la virulencia fue mayor cuando la inoculación se realizó en tejido con heridas. *Botrytis cinerea* necesita heridas para poder ingresar a las hojas (Zou et al ,2014), *B. elliptica* infecta sin necesidad de heridas (Kessel, 2001). Como ya se mencionó anteriormente en la mayoría de aislamientos realizados en reportes de diagnóstico se encuentra más frecuente *Botrytis elliptica* que *Botrytis cinerea* para conocer más de cerca de *Botrytis cinerea* se aisló *Botrytis cinerea* de una planta de fresa específicamente del fruto y pedúnculo ,necrosado con síntomas y signo de *Botrytis spp* .*Botrytis cinerea* aislado de fresa presento invitro la colonia color gris a partir del tercer día, con aspecto compacto y abundante esporulación de macroconidios indicios claros de que se trata de *Botrytis cinerea* .

En el ensayo de enfrentamiento del aislado de *Botrytis cinerea* aislado de fresa y azucena, que en el presente trabajo son considerados como *B. cinerea* y *B. elliptica*, respectivamente en función a las dimensiones de sus conidios, fue encontrada una zona de color grisáceo, tal como reportado por Beever et al, (1993) con aislados principalmente de *B. cinerea* de diferentes cultivos.

V. CONCLUSIONES

El microorganismo aislado de hojas de azucena (*Lilium candidum*) es patogénico y es el agente causal de la racha o tizón de la azucena, el tamaño de las esporas, momento de esporulación, las características de la colonia y rango de hospederos indican que el aislado se trata de *B. elliptica*.

Las condiciones que permitieron el mayor crecimiento del aislado de *Botrytis sp.* fueron temperaturas en el rango de 15 a 20 °C, y pH entre 4 y 5.5 y los medios de cultivo V8 y medio Lilium-agar, y se encontró diferencia en el crecimiento con respecto al tipo de fuente de carbono creciendo más rápido con sacarosa.

La virulencia del aislado presenta diferencias notables de acuerdo con la edad del tejido siendo las hojas del tercio inferior las más susceptibles. Ninguna de las variedades híbridas asiáticas importadas que fueron evaluadas en el presente trabajo fueron más resistentes al aislado de la región que la variedad local, pero se destacó la variedad Hyde Park con resistencia moderada.

El aislado de fresa presentó incompatibilidad con el aislado de azucena, que se evidenció por la formación de una zona oscura en el punto de encuentro de micelio, zona que no se presenta cuando el aislado es el mismo. El aislado de azucena presentó mayor virulencia que el aislado de fresa en azucena, mostrando una especificidad del hospedero.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. (1995). *Fitopatología*. (2da Ed.). D. F., México: Limusa.
- Alfenas, A.C & Mafia, R.G. (2016). *Métodos em Fitopatologia* (2da Ed.). Viçosa (MG), Brazil: UFV.
- Balode, A. (2009, August). Breeding for resistance against *Botrytis* in lily. In XXIII International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals: Colourful Breeding and Genetics 836 (pp. 143-148).
- Bastiaansen, C., Koster, A. T. J., Van der Meer, L. J., Van den Ende, D. J. E., Pennock, I., & Buurman, F. P. M. (1996). A disease-forecasting system of botrytis blight ('fire') in lily. In VII International Symposium on Flowerbulbs 430 (pp. 657-660).
- Beever, R. E., & Parkes, S. L. (1993). Mating behaviour and genetics of fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 21(4), 303-310.
- Chang, S., Kim, S., & Hwang, B. (2001). Gray mold of day lily (*Hemerocallis fulva* L.) caused by *Botrytis elliptica* in Korea. *Plant Pathology Journal*, 17(5), 305-307.
- Chastagner, G. A., Riley, K. L., & Doss, R. P. (1992, May). An attempt to produce an apothecial state of *Botrytis elliptica* in vitro. In VI International Symposium on Flower Bulbs 325 (pp. 689-694).
- Cotton, A. D. (1933). The detection and control of Lily diseases. The detection and control of Lily diseases.
- Daughtrey, M. L., & Bridgen, M. P. (2012, March). Evaluating resistance to *Botrytis elliptica* in field-grown lilies. In XI International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials 1002 (pp. 313-318).
- Dhyani, A., Nautiyal, B. P., Nautiyal, M. C., Rivera, M. C., Prasad, D., & Singh, K. P. (2012). First report of *Botrytis cinerea* on *Lilium polyphyllum*, a critically endangered herb in Uttarakhand, India. *Phyton*, 81, 157.

- Doss, R. P., Christian, J. K., & Chastagner, G. A. (1988). Infection of Easter lily leaves from conidia of *Botrytis elliptica*. *Canadian journal of botany*, 66(6), 1204-1208.
- Doss, R. P., Chastagner, G. A., & Riley, K. L. (1984). Techniques for inoculum production and inoculation of lily leaves with *Botrytis elliptica*. *Plant Disease*, 68(10), 854-856.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. (Eds.). (2004). *Botrytis: biology, pathology and control*. Springer Science & Business Media.
- Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, pp 178-184
- Fukumori, Y., Nakajima, M., & Akutsu, K. (2004). Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 70(5), 256-260.
- Furukawa, T., Ushiyama, K., & Kishi, K. (2005). *Botrytis* blight of Taiwanese toad lily caused by *Botrytis elliptica* (Berkeley) Cooke. *Journal of General Plant Pathology*, 71(1), 95-97.
- Grant-Downton RT, Terhem RB, Kapralov MV, Mehdi S, Rodriguez-Enriquez MJ, et al. (2014) A Novel *Botrytis* Species Is Associated with a Newly Emergent Foliar Disease in Cultivated *Hemerocallis*. *PLoS ONE* 9(6): e89272.
- Grigaliūnaitė, B. (2001). Fungi of the genus *Botrytis* P. Micheli: Pers. plants in Lithuania. *Biologija*, 3, 14-17.
- Goñas, M. G., Rivera, L. G. B., Rascón, J., & Obando, N. Y. V. (2017). Efecto in vitro de controladores biológicos sobre *Colletotrichum* spp. y *Botrytis* spp. *Revista de Investigación en Agroproducción Sustentable*, 1(2), 25-31.
- Hennebert, G. L. (1973). *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia*, 7(2), 183-204.
- Hou, P. F., & Chen, C. Y. (2003). Early stages of infection of lily leaves by *Botrytis elliptica* and *B. cinerea*. *Plant Pathology Bulletin*, 12(2), 103-108.

- Hsiang, T. y Chastagner, GA (1991). Crecimiento y virulencia de aislamientos resistentes a fungicidas de tres especies de *Botrytis*. *Revista canadiense de patología vegetal*, 13 (3), 226-231.
- Hsiang, T., Hsieh, T. F., & Chastagner, G. A. (2001). Relative sensitivity to the fungicides benomyl and iprodione of *Botrytis elliptica* from Taiwan and the Northwestern USA. *Plant Pathology Bulletin*, 10, 93-95.
- Hsieh, T. F., Huang, J. W., & Hsiang, T. (2001). Light and scanning electron microscopy studies on the infection of oriental lily leaves by *Botrytis elliptica*. *European journal of plant pathology*, 107(6), 571-581.
- Hsieh, T. F., & Huang, J. W. (2001). Leaf-disk method for assessment of disease severity of lily leaf blight caused by *Botrytis elliptica*. *Plant Pathol. Bull*, 10, 37-44.
- Jarvis, W. R. (1977). *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity-A guide to the literature*.
- Kessel, G. J. T., De Haas, B. H., Lombaers-Van der Plas, C. H., Van den Ende, J. E., Pennock-Vos, M. G., Van der Werf, W., & Köhl, J. (2001). Comparative analysis of the role of substrate specificity in biological control of *Botrytis*
- Kim, W. K., Park, M. S., Hahm, S. S., & Yu, S. H. (2007). Morphological, molecular and pathogenic characteristics of *Botrytis elliptica* and *Botrytis cinerea* associated with leaf blight of lily. *The Korean Journal of Mycology*, 35(2), 68-75.
- Leyva-Mir, S. G., López-Hernández, Y., Tlapal-Bolaños, B., & Flores-Martínez, R. (2009). Etiología del tizón descendente de las ramas de azucena híbrida (*Lilium* spp.) en Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(1), 5-8
- Liu, L., Zhu, P., Wang, Y., Wu, L., Zhang, C., Xu, L., ... & Toyoda, H. (2013). *Botrytis squamosa*: The Pathogen of Market Disease of Garlic Sprouts. *Annual Report of The Kansai Plant Protection Society*, 55, 31-35
- Liu, G., Su, X., Guan, L., & Hu, F. (2019). Comparison of Defensive Enzyme Activities in the Leaves of Seven Oriental Lily Hybrids after Inoculation with *Botrytis*

- elliptica. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 144(1), 55-62.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., & Fermaud, M. (2003). Phenotypic differences between *vacua* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(5), 479-488.
- Migheli, Q., Aloï, C., & Gullino, M. L. (1989, July). Resistance of *Botrytis elliptica* to fungicides. In V International Symposium on Flower Bulbs 266 (pp. 429-436).
- Mirzaei, S., Goltapeh, EM y Shams-Bakhsh, M. (2007). Estudios taxonómicos sobre el género *Botrytis* en Irán. *Revista de Tecnología Agrícola* , 3 (1), 65-76.
- Plesken, C., Westrich, L. D., & Hahn, M. (2015). Genetic and phenotypic characterization of *Botrytis calthae*. *Plant Pathology*, 64(1), 128-136.
- Qiong, X., Bingliang, X., & Fang, W. (2006). Symptom types and identification of lily blight. *Plant Protection*, 32(5), 61-64.
- Samuel, S., Veloukas, T., Papavasileiou, A., & Karaoglanidis, G. S. (2012). Differences in frequency of transposable elements presence in *Botrytis cinerea* populations from several hosts in Greece. *Plant disease*, 96(9), 1286-1290.
- Song, J. W., Shi, Y. X., Xie, X. W., Chai, A. L., & Li, B. J. (2017). First report of grey mould on water dropwort (*Oenanthe javanica* DC.) caused by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 39(2), 235-240.
- Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. A. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular biology and Evolution*, 22(2), 333-346
- Staats, M., Van Baarlen, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). AFLP analysis of genetic diversity in populations of *Botrytis elliptica* and *Botrytis tulipae* from the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 117(3), 219-235.

- Tang, X., Xiao, A., You, C., Liu, W., Wang, J., Li, Z., & Yang, Z. (1998). A study on the biological properties of *Botrytis elliptica* causing Lily gray mould. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 20, 485-489.
- Taylor, M. R. (1934). The origin of *Botrytis* disease outbreaks on *Lilium candidum*. The origin of *Botrytis* disease outbreaks on *Lilium candidum*. 82-39 pp.
- van Baarlen, P., Woltering, E. J., Staats, M., & van Kan, J. A. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology*, 8(1), 41-54.
- Van Baarlen, P., Staats, M., & Van Kan, J. A. (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular plant pathology*, 5(6), 559-574.
- Van Beyma thoe Kingma, F. H., & Van Hell, W. F. (1931). Ueber die *Botrytis*krankheiten der Lilien. *Journal of Phytopathology*, 3, 619-632.
- Vinay, S., & Dhancholia, S. (2008). A note on increasing hosts of *Botrytis elliptica* (Berk.) Cooke causing lily disease of *Lilium* sp. *Annals of Agri Bio Research*, 13(1), 49-51.
- Walker, A. S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., ... & Fournier, E. (2011). *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 101(12), 1433-1445.
- Zhang, J., Zhang, L., Li, G. Q., Yang, L., Jiang, D. H., Zhuang, W. Y., & Huang, H. C. (2010). *Botrytis sinoallii*: a new species of the grey mould pathogen on *Allium* crops in China. *Mycoscience*, 51(6), 421-431.
- Zheng, Y. L. C. (1984). Studies on the biological characteristic of *botryis elliptica* (berk) cooke causing gray mold of fritillary (*fritillaria verticillata* willd var. *thunbergii* bak.) in zhejiang province [j]. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 3.

Zhou, Y. J., Zhang, J., Wang, X. D., Yang, L., Jiang, D. H., Li, G. Q., ... & Zhuang, W. Y. (2014). Morphological and phylogenetic identification of *Botrytis sinoviticola*, a novel cryptic species causing gray mold disease of table grapes (*Vitis vinifera*) in China. *Mycologia*, 106(1), 43-56.

ANEXOS

Anexos 1. Panel Fotográfico



Figura 34. Parcelas tomadas para muestreo situadas en la localidad de taquia.



Figura 35. Recolección de hojas con síntomas, con marcas de tizón (A y B), C) Bolsas de papel conteniendo las muestras, llevadas al laboratorio.

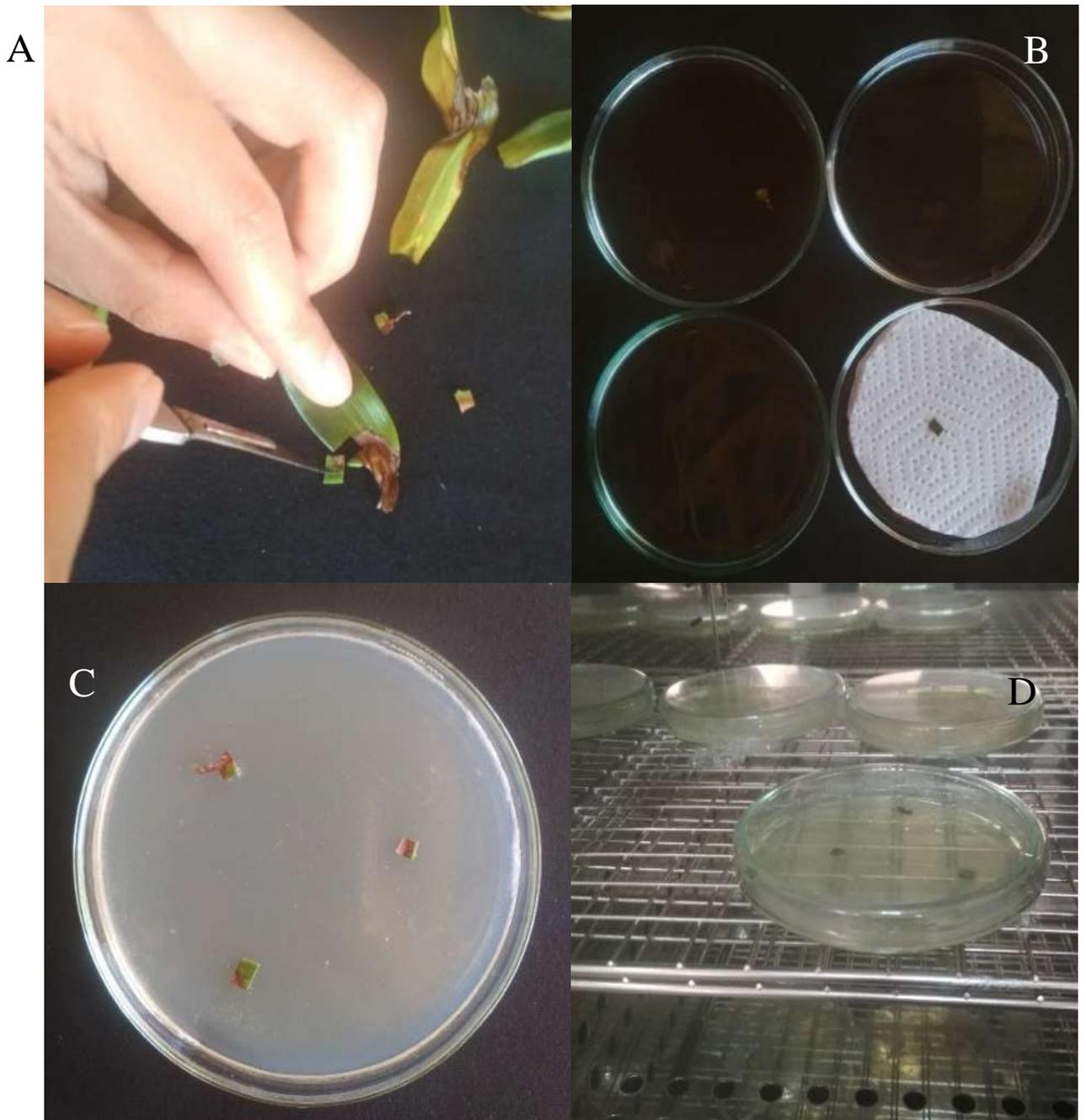


Figura 36. Aislamiento indirecto (porción de tejido sintomático; **A**) Corte de porción de tejido mitad con tejido necrosado y mitad aparentemente sano, de 5x5 mm aproximado, **B**) Desinfección de las porciones de tejido con: alcohol (70°), Hipoclorito de sodio 10 veces diluido (4%), agua estéril, y secado en papel estéril, **C**) Colocados en medio de cultivo (PDA), 3 porciones de tejido en forma triangular, **D**) Colocando a Incubadora, para incubar por 3 días.



Figura 37. Test de patogenicidad; **A)** Hoja traída de campo con síntomas de tizón, **B)** hoja cultivada en el vivero UNTRM e inoculado con el microorganismo aislado de la primera hoja. Síntomas similares de tizón.



Figura 38. Ensayo de virulencia por ubicación de la hoja en la planta. **A)** Selección de hojas, superior, media, inferior, **B)** lavado de las hojas con agua corriente potable, **C)** desinfección de hojas en alcohol (70°), hipoclorito de sodio (0.01%), y enjuagado en agua estéril, **D)** Inoculando las hojas con discos de agar conteniendo micelio y colocadas en la cámara húmeda.

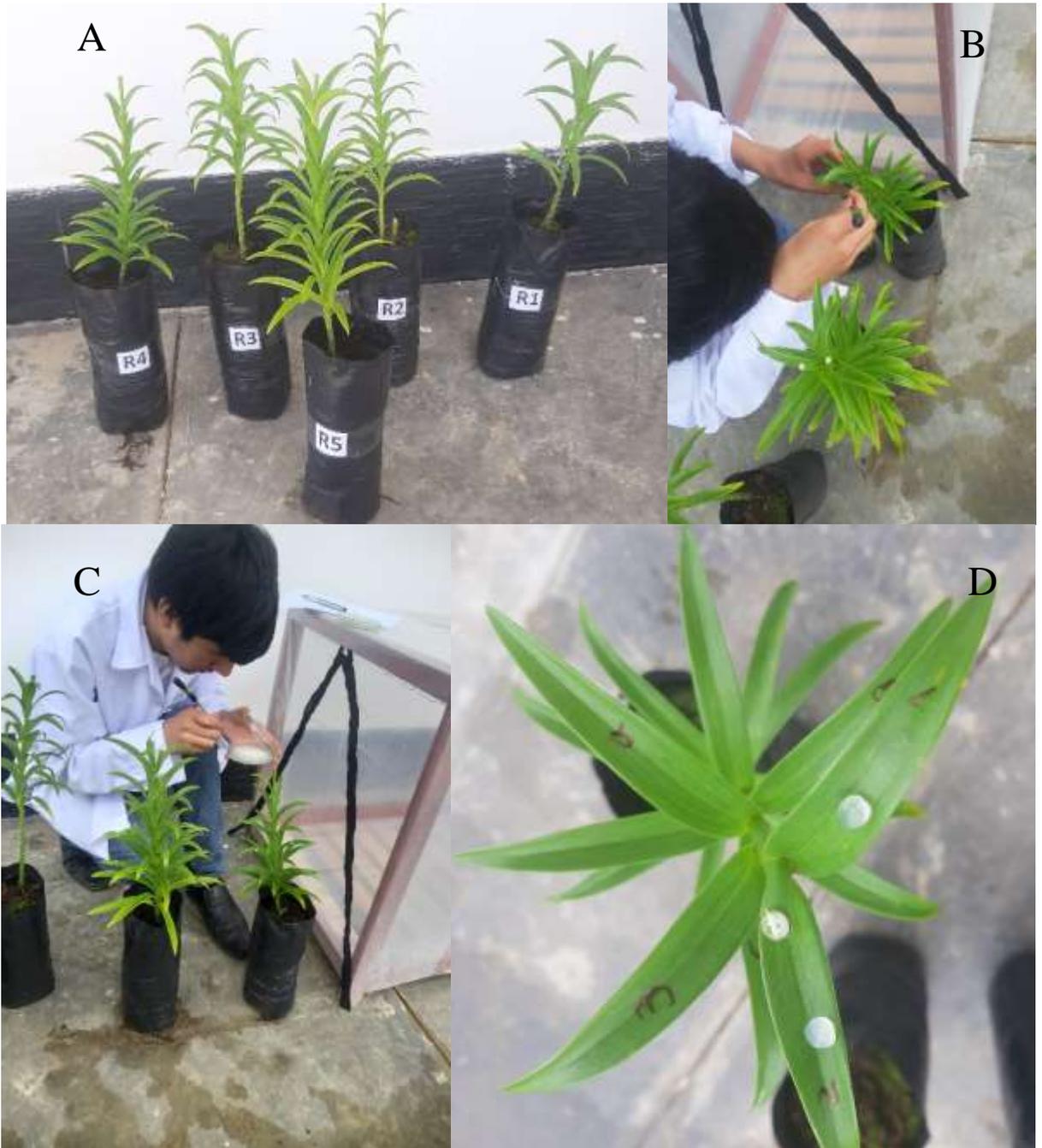


Figura 39. Virulencia del microorganismo aislado en plantas; **A)** Plantas de azucenas cultivadas en el vivero UNTRM, en etapa de floración, **B)** Realizando las heridas con un estilete flameado .**C)** Realizando inoculación, por el haz y en vez, **D)** Hojas inoculadas y rotuladas.

Anexo 2. Resumen de Datos

Tabla 15. Prueba Tukey, ensayo diferentes temperaturas.

	10°C	28°C	25°C	20°C
	7.645	12.97	14.637	20.371
10°C	7.645	-	-	-
28°C	12.97	1.91	-	-
25°C	14.637	2.51	0.6	-
20°C	20.371	4.57	2.66	2.06

critical values for experiment wise error rate:2.63 (0.05) – 3.23(0.01).

Tabla 16. Medias de los datos del ensayo en diferentes temperaturas.

Mean	n	Std. Dev	Tratamiento
7.645	21	4.9456	10°C
20.371	21	13.4755	20°C
14.637	21	8.0679	25°C
12.97	21	7.3534	28°C
13.906	84	9.9606	Total

Tabla 17. ANOVA de los datos del ensayo en diferentes temperaturas

Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	1730.4887	3	576.82957	7.09	0.0003
Error	6504.2648	80	81.30331		
Total	8234.7535	83			

Tabla 18. Medias de los datos del ensayo en diferentes pH.

Mean	n	Std. Dev	
25.304	20	14.2519	pH4
24.208	20	13.4959	pH4.5
23.516	20	10.5004	pH5
26.449	20	14.7637	pH5.5
22.840	20	12.0860	pH6
7.590	20	3.3581	pH12
21.651	120	13.4276	Total

Tabla 19. ANOVA de los datos del ensayo en diferentes pH

Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	4909.9968	5	981.99937	6.77	0.0000147
Error	16545.792	114	145.13853		
Total	21455.789	119			

Tabla 20. Tukey comparación simultanea t-values (d.f. =114), en varios pH

	pH12	pH6	pH5	pH4.5	pH4	pH5.5
	7.59	22.84	23.516	24.208	25.304	26.449
pH12	7.59					
pH6	22.84	4				
pH5	23.516	4.18	0.18			
pH4.5	24.208	4.36	0.36	0.18		
pH4	25.304	4.65	0.65	0.47	0.29	
pH5.5	26.449	4.95	0.95	0.77	0.59	0.3

Tabla 21. Medias de los datos del ensayo resistencia en variedades

Mean	n	Std. Dev	
31.81520	4	5.879124	Fucsia
50.29168	4	14.162534	Crema
55.33091	4	11.778774	Naranja
12.89255	4	7.974858	Control
37.58259	16	19.646845	Total

Tabla 22. ANOVA de los datos del ensayo de resistencia en variedades introducidas, tratamiento con herida.

Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	4477.5396	3	1492.5132	13.65	0.0004
Error	1312.438	12	109.36983		
Total	5789.9776	15			

Análisis Tukey de los datos del ensayo de resistencia en variedades introducidas tratamiento con heridas.

Tabla 23. Tukey simultaneous comparison t-values (d.f. = 12), ensayo de Resistencia

		Control	Fucsia	Crema	Naranja
		12.89255	31.8152	50.29168	55.33091
Control	12.89255				
Fucsia	31.8152	2.56			
Crema	50.29168	5.06	2.5		
Naranja	55.33091	5.74	3.18	0.68	

Critical values for experiment wise error rate:2.97(0.05)-3.89(0.01).

Tabla 24. Media y desviación estándar del crecimiento micelial en diferentes medios

Mean	n	Std. Dev	
22.855	21	12.9043	NUTRITIVO
24.012	21	12.7082	V8+C
14.380	21	8.9367	A. A
25.903	21	14.7052	CZAPER
24.472	21	13.0916	ZANAHORIA
27.710	21	15.7614	PDA
17.934	21	11.4992	MEA
26.810	21	14.6446	MAL
20.640	21	12.0531	DIFCO
28.202	21	14.0261	V8
22.767	21	12.8848	MALTA
21.257	21	12.7670	PSA
23.078	252	13.4040	Total

Tabla 25. Resumen de datos del experimento de fuentes de carbono

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Glucosa	7	132.51	18.93	116.204767
Sacarosa	7	136.11	19.44428571	130.086429

Tabla 26. Análisis de varianza de dos fuentes de carbono

Origen de las variaciones	SC	gl	PC	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.9257	1	0.92571	0.0075	0.93	4.74
Dentro de los grupos	1477.7	12	123.145			
Total	1478.6	13				

Tabla 27. Descriptiva del ensayo de severidad sin heridas por la ubicación de las hojas en la planta

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
Hoja superior	7	473529	4212767	1592276	83913	863144	,00	104,53
Hoja media	7	564571	4181740	1580549	177825	951318	,00	112,42
Hoja inferior	7	575386	6818731	2577238	-55242	1206013	,00	152,10
Total	21	537829	4973725	1085356	311427	764230	,00	152,10

Tabla 28. ANOVA de severidad por la ubicación de la hoja en la planta.

Área	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	438215	2	219107	,080	,923
Dentro de grupos	49037664	18	2724315		
Total	49475879	20			

Tabla 29. Prueba post hoc, Tukey de la severidad por la ubicación de la hoja en la planta

Hoja	N	Subconjunto para alfa = 0.05
Hoja superior	7	473529
hoja media	7	564571
Hoja inferior	7	575386
Sig.		,929

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 7,000.

Tabla 30. Descriptivo descriptiva del ensayo de severidad con heridas por la ubicación de las hojas en la planta

Área	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
Hoja Superior	7	576971	5083836	1921509	106795	1047148	,00	119,78
Hoja Media	7	687814	5259977	1988084	201348	1174281	,00	132,45
Hoja inferior	7	742471	6587802	2489955	133201	1351741	,00	170,16
Total	21	669086	5437951	1186658	421553	916618	,00	170,16

Tabla 31. ANOVA del ensayo de severidad en el tratamiento con heridas por la ubicación de las hojas en la planta.

Área	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	995488	2	497744	,154	,858
Dentro de grupos	58147123	18	3230396		
Total	59142611	20			

Tabla 32. Medias y desviación estándar de la severidad de plantas heridas e inoculadas cámara húmeda.

Mean	n	Std. Dev	
11.62787	48	9.903960	Haz
15.85317	48	12.468411	Envez
13.74052	96	11.399590	Total

Tabla 33. Análisis de varianza de la severidad de plantas heridas e inoculadas por haz y envés

	sin heridas	con heridas
Media	5.560091692	25.51847281
Varianza	182.2060427	337.3011052
Observaciones	35	35
Grados de libertad	34	34
F	0.540188099	
P(F<=f) una cola	0.038478495	
Valor crítico para F (una cola)	0.564312915	

Tabla 34. Prueba F de los datos del ensayo de virulencia en hojas invitro.

	Con herida	Sin herida
Media	23.70295617	11.6391954
Varianza	298.0723575	97.23781631
Observaciones	14	14
Grados de libertad	13	13
F	3.065395427	
P(F<=f) una cola	0.026585134	
Valor crítico para F (una cola)	2.576927084	

Tabla 35. Prueba F de los datos del ensayo de virulencia de Botrytis cinerea (aislado de fresa) en azucena.

<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Treatment	428.477068	1	428.4770683	3.38	.0692
Error	11,916.834904	94	126.7748394		
Total	12,345.311973	95			

Tabla 36. Prueba F para varianzas de dos tratamientos: con herida y sin heridas, Botrytis cinerea aislado de fresa inoculado en azucena.

	sin heridas	con heridas
Media	5.560091692	25.51847281
Varianza	182.2060427	337.3011052
Observaciones	35	35
Grados de libertad	34	34
F	0.540188099	
P(F<=f) una cola	0.038478495	
Valor crítico para F (una cola)	0.564312915	

Anexo 3. Protocolo de preparación de medios

3.1. Equipos y Materiales

Equipos	Materiales
Cabina de flujo	Vaso de precipitación pírrex de 1litro
Autoclave	Vaso de precipitación de 100 ml
Estufa	Espátula de metal inoxidable
Balanza analítica	Papel aluminio
Cocina eléctrica	Matraz Erlenmeyer de 500 ml
	Matraz Erlenmeyer de 250 ml
	Algodón
	Placas de Petri
	Guantes resistentes a calor
	Papel
	Bandejas

3.2. Reactivos, soluciones

- Solución alcohol 70°
- Solución hipoclorito de sodio 0.01%
- Detergente liquido
- Antibiótico

3.3. Composición y Preparación de Medios de Cultivo Solido

3.3.1. Medio agar -agua (A.A)

Para su preparación mesclar 500 ml de agua destilada o tipo II, calentar en microondas o en cocina eléctrica, remover hasta que el agar este completamente diluido, luego afore a 1000 ml (Tabla 1), posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 37. Componentes del medio agar-agua (AA)

Componente	Cantidad
Agar	20 g
Agua destilada o agua tipo II	1000 ml

3.4. Medio papa dextrosa agar (PDA)

La preparación de medio PDA se debe hervir 200 gramos de papa descascarada y picada cuadritos en 500 ml de agua, mínimo 30 minutos, filtre el caldo en gasa, posteriormente al caldo agregue la dextrosa y el agar, después afore a 1000 ml, posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 38. Componentes de Medio Papa Dextrosa Agar (PDA)

Componente	Cantidad
Extracto de papa (200 g/500 ml)	500 ml
Dextrosa (D-Glucosa)	20 g
Agar	17-20 g
Agua destilada o Tipo II	1000ml

3.5. Medio Papa Sacarosa Agar

La preparación de medio PDA se debe hervir 200 gramos de papa descascarada y picada cuadritos en 500 ml de agua, mínimo 30 minutos, filtre el caldo en gasa, posteriormente al caldo agregue la Sacarosa y el agar, después afore a 1000 ml, posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 39. Componentes del Medio Papa Sacarosa Agar (PSA)

Componente	Cantidad
Extracto de papa (200 g/500 ml)	500 ml
Sacarosa	20 g
Agar	20g
Agua destilada o Tipo II	1000 ml

3.6. Medio zanahoria Agar

Para su preparación (Tabla 4), triture 20 gramos de zanahoria, adicione 400 ml de agua, mantenga en poso durante 60 minutos, después hierva por 5 minutos. Filtre el caldo en gasa, adicione el agar, posteriormente aforar a 1000ml con agua destilada, posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 40. Componente del Medio Zanahoria Agar (MZA)

Componente	Cantidad
Extracto de zanahoria triturada (20 g/400 ml)	400 ml
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

3.7. Medio Jugo 8 verduras con Carbonato de Calcio (V8-Agar)

Para su preparación mezclar los componentes en 1000 ml de agua destilada (Tabla 5), posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 41. Componentes del medio Vo-Agar con carbonato de calcio

Componentes	Cantidad
Jugo V8	200 ml
CaCO ₃	3g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

3.8. Medio Jugo 8 verduras (V8-Agar)

Para su preparación mezcle los componentes en 1000 ml de agua destilada (Tabla 6), posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 42. Componentes del medio V8-Agar

Componentes	Cantidad
Jugo V8	200 ml
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

3.9. Medio nutritivo

Para prepara el medio nutritivo, se diluye en 500 ml, luego se afora a 1000 ml, posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 43. Componente del medio nutritivo

Componentes	Cantidad
Agar nutritivo para microbiología	20
Agua destilada o agua tipo II	1000

3.10. Medio Czapek Dox Agar

Disolver 49 .01 gramos en 500 ml, una vez diluida aforar a 1000 ml, posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 44. Componentes del medio Czapek Dox Agar

Componentes	Cantidad
Czapek Dox Agar	49.01 g
Agua destilada o agua Tipo II	1000 ml

Tabla 45. Formula estándar de Czapek Dox Agar

Componentes	Cantidad (gms/L)
Sucrose	30
Sodium nitrate	2
Dipotassium hydrogen phosphate	1
Magnesium sulphate	0.5
Potassium chloride	0.5
Ferrous sulphate	0.01
Agar	15.00

3.11. Medio Corn Meal Agar

Disolver 17 gamos harina de maíz en 500 ml, luego aforar a 1000 ml, posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 46. Componentes del medio Cor Meal Agar

Componentes	Cantidad
Corn meal agar	17g
Agua destilada o agua tipo II	1000 ml

Tabla 47. Formula de Corn Meal Agar

Componentes	Cantidad
Corn meal, infusion from (solids)	2.0g
Agar	15 g

3.12. Medio Agar Lilium (MAL)

Triturar las hojas de azucena en un mortero, posteriormente hervir por 5 minutos en 400 ml de agua, colar el jugo en gaza, postreramente mezclar el jugo con agar, despues aforar a 1000 ml, posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 48. Componentes del medio agar lilium

Componentes	Cantidad
Hojas de azucenas	100 g
Agar	15g
Agua destilada o agua tipo II	1000ml

3.13. .Medio Difco

Mezclar los componentes en 500 ml de agua, aforar a 1000 ml, posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 49. Componentes del medio Difco

Componentes	Cantidad
Difco Agar granulado	15 g
Dextrosa	20 g
Agua destilada o agua tipo II	1000ml

3.14. Medio malta

Disolver el agar en 500 ml de agua destilada, posteriormente mezclar el extracto de malta, luego aforar a 1000 ml, posteriormente colocar en matraz Erlenmeyer la cantidad de 1/3 por matraz, sellar el matraz con algodón y papel aluminio o papel Kraft, posteriormente auto clavar a 121°C/15 min.

Tabla 50. Componentes del medio malta

Componentes	Cantidad
Malt extract	25g
Agar	15g
Agua destilada o agua tipo II	1000g