

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Atizonamiento del rosal: determinación de los agentes
causales y control biológico de *Botrytis cinerea***

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas**

Autor: Ing. Agr. Eduardo Roberto Wright
Director de Tesis: Dr. Daniel Cabral

Lugar de trabajo: FAUBA-FCEN-UBA

Buenos Aires, 3 de mayo de 2007

Página de Jurados y Calificaciones

Atizonamiento del rosal: determinación de los agentes causales y control biológico de *Botrytis cinerea*

Resumen

La rosa es una de las especies más cultivadas en la floricultura de corte del cinturón verde del Gran Buenos Aires. Observaciones realizadas en zonas productoras para flor de corte de los alrededores de Buenos Aires y La Plata y en viveros de producción de ejemplares para jardines localizados en San Pedro permitieron determinar un aumento de la incidencia de atizonamientos de ramas en los últimos años. Se plantearon como objetivos de este trabajo: identificar los agentes etiológicos del atizonamiento del rosal, cuantificar su incidencia en producciones comerciales, seleccionar antagonistas de *Botrytis cinerea* entre la microflora fúngica asociada al filoplano del rosal, evaluar su comportamiento frente a fungicidas de uso común en los cultivos y determinar la eficiencia antagónica de los aislamientos de mejor comportamiento a través de inoculaciones sobre tallos. Como resultado de los aislamientos a partir de materiales enfermos y sus pruebas de patogenicidad, se identificaron como agentes causales de tizón: *B. cinerea*, *Trichothecium roseum*, *Alternaria alternata*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Fusarium verticillioides* y *Phomopsis* sp. Los patógenos de mayor incidencia fueron *B. cinerea* en cultivos para flor de corte y *A. alternata* en viveros para producción de rosales para ornamentación de jardines. Se determinó que en el filoplano del rosal desarrolla una microflora fúngica compuesta por hongos de los géneros *Trichoderma* y *Penicillium*, con actividad antifúngica diferencial frente a *B. cinerea*. Un alto número de aislamientos de buen comportamiento fueron obtenidos de un cultivo de Zelaya, sin aplicación de agroquímicos por al menos durante un año. La mayoría de los antagonistas presentaron una eficiencia antagónica al ser evaluados según la técnica de los discos de hoja o la técnica del cultivo dual. Los microorganismos seleccionados como antagonistas de *B. cinerea* presentaron un comportamiento diferencial frente a diferentes dosis de fungicidas. El atizonamiento de los rosales ocasionado por *B. cinerea* fue controlado biológicamente a través de la pulverización con esporas de una cepa de *Trichoderma atroviride*, de *Penicillium minioluteum* o la mezcla de ambos con *P. purpurogenum*.

Palabras Claves: rosal, tizón, *Botrytis cinerea*, antagonistas, filoplano

Rose stem blight: identification of causal agents and biological control of *Botrytis cinerea*

Summary

Roses are one of the most important cut flower crops in the surroundings of Buenos Aires. In recent years, the incidence of rose stem die-back increased in cut-flower crops located in the outskirts of Buenos Aires and La Plata and in potted-plant crops in San Pedro. The aims of this work were to identify the causal agents of rose die-back, to quantify disease incidence in commercial productions, to select antagonists of *Botrytis cinerea* among the fungal microflora associated to rose phylloplane, to evaluate their response to fungicides frequently used in rose crops, and to determine the antagonistic efficiency of the isolates with best response by stem inoculations. As a result of isolations from diseased tissues and pathogenicity tests, *B. cinerea*, *Trichothecium roseum*, *Alternaria alternata*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Fusarium verticillioides* and *Phomopsis* sp. were identified as rose die-back pathogens. The major incidence was observed for *B. cinerea* (in cut flower crops) and *A. alternata* (in potted plant crops). Rose phylloplane microflora was composed by species of the genus *Trichoderma* y *Penicillium*, which showed differential activity against *B. cinerea*. A great number of isolates with good performance were obtained from a crop located in Zelaya, which had been grown without fungicide sprays for at least one year. The majority of the antagonists showed a similar biocontrol activity when evaluated by leaf-disk or dual-culture techniques. The microorganisms that were selected as antagonists of *B. cinerea* had a different behaviour in the presence of different fungicide doses. Rose die-back caused by *B. cinerea* was efficiently controlled by spraying spore suspensions of an isolate of *Trichoderma atroviride*, an isolate of *Penicillium minioluteum* or both plus an isolate of *P. purpurogenum*.

Key Words: rose, dieback, *Botrytis cinerea*, antagonists, phylloplane

Agradecimientos

A Daniel Cabral, con quién fue un placer trabajar.

A la Universidad de Buenos Aires y la Facultad de Agronomía.

A Clotilde Jauch y Leonor Calot, con quienes dí mis primeros pasos en la
Fitopatología.

A María Virginia López y María del Carmen Fabrizio por el apoyo en el diseño de
experimentos y análisis de los resultados.

Al Dr. John Sutton, por su experiencia y calidez.

A Daniel Morisigue, por facilitar el contacto con productores e interesarme por el
estudio de las enfermedades en cultivos de rosal.

A Gladys Lori, por la colaboración en la determinación de la especie de
Fusarium.

A los productores visitados.

A Paola Pizzingrilli, Juan Agostinelli, Mónica Caligaris, Guillermo Pérez, Marcelo
Siccardi, José Campos Haedo, Mario Mizuno, Alejandro Adamonis, Pablo
Vasquez, Alina Crelier, Estela Petrone y Martín Benva por la colaboración
brindada.

A mi hermosa familia

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
OBJETIVO GENERAL.....	14
HIPÓTESIS.	14
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES CAUSALES DEL ATIZONAMIENTO DEL ROSAL.....	15
2.1. Introducción.....	16
2.2. Objetivos.....	18
2.3. Hipótesis.....	18
2.4. Materiales y Métodos.....	19
2.5. Resultados	27
Síntomas observados.....	27
Aislamientos obtenidos.....	30
Identificación por caracteres morfológicos.....	30
Incidencia y patogenicidad.....	34
<i>Botrytis cinerea</i> (aislamiento 1).....	41
<i>Trichothecium roseum</i> (aislamiento 2).....	45
<i>Alternaria alternata</i> (aislamiento 3).....	47
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> (aislamiento 4).....	49
<i>Fusarium verticillioides</i> (aislamiento 5).....	53
<i>Phomopsis</i> sp. (aislamiento 6).....	55
2.6. Discusión.....	57
2.7. Conclusiones.....	66
3. CONTROL BIOLÓGICO DE <i>Botrytis cinerea</i>	68
3.1. Introducción.....	69
3.2. Aislamiento y selección de antagonistas	88
Objetivos.	88
Hipótesis.....	88
Materiales y Métodos	
3.2.1 Aislamiento de cepas del filoplano.....	88

3.2.2	Preselección <i>in vivo</i>	99
3.2.3	Preselección <i>in vitro</i>	92
	Resultados	
3.2.1	Aislamiento de cepas del filoplano.....	94
3.2.2	Preselección <i>in vivo</i>	96
3.2.3	Preselección <i>in Vitro</i>	102
3.3.	Evaluación del desarrollo de microorganismos antagonistas de <i>B. cinerea</i> en presencia de distintas concentraciones de fungicidas.	
3.3.1	Objetivos.....	109
3.3.2	Hipótesis	109
3.3.3	Materiales y Métodos.....	109
3.3.4	Resultados.....	113
3.4.	Evaluación de la eficiencia de antagonistas sobre tallos de rosal.	
3.4.1	Objetivos.....	116
3.4.2	Hipótesis	116
3.4.3	Materiales y Métodos.....	116
3.4.4	Resultados.....	119
3.5.	Identificación de las cepas seleccionadas	
3.5.1	Materiales y Métodos.....	123
3.5.2	Resultados.....	123
3.6.	Discusión.....	125
3.7.	Conclusiones.....	134
4..	CONCLUSIONES GENERALES.....	135
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	137

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género **Rosa** pertenece a la familia de las Rosáceas e incluye más de 100 especies de arbustos con flores grandes, vistosas, comúnmente perfumadas, solitarias, agrupadas o en inflorescencias terminales (Dimitri, 1972). Las rosas existían en China, África y Estados Unidos hace 30 millones de años. Se llevaron variedades de China a Europa en los barcos que transportaban té, de ahí su nombre “híbridos de té”. Éstas se cruzaron con las nativas europeas, especialmente del sur de Europa y dieron origen a una gran variedad de rosas. A principios de 1900, se comenzaron a producir en forma comercial en Estados Unidos y Europa (Fainstein, 1997). Actualmente, las variedades comerciales son híbridos de especies de rosa desaparecidas.

Los cultivares de rosal se pueden dividir en cuatro grandes grupos: a) Híbridas de té, con pimpollos largos que nacen generalmente de un solo tallo; b) Floribundas, de menor tamaño que las anteriores y con gran cantidad de flores por tallo; c) Miniaturas, de tamaño pequeño, ideal para borduras y macetas y d) Trepadoras, por su hábito de crecimiento indeterminado (Fernández, 2000).

La rosa es una de las especies más cultivadas en la floricultura de corte del cinturón verde del Gran Buenos Aires. Su importancia sigue en aumento, en un mercado cada vez más competitivo. Actualmente el número de variedades dentro de cada grupo es muy elevado, consecuencia de las distintas hibridaciones de destacados obtentores (Meilland, Kordes, Desbard, Tentau y Gerard, entre otros) que permanentemente buscan superar distintos aspectos relacionados con el rendimiento, conservación poscosecha, resistencia a plagas y enfermedades, compatibilidad con portainjertos, fortaleza del tallo, facilidad de propagación, corto período entre pinzamiento y cosecha, tamaño, color y forma de las flores (Fernández, 2000).

Por lo general las plantas cultivadas para el corte de rosas se obtienen injertando la variedad deseada sobre un patrón o portainjerto, el cual le otorga mayor duración al cultivo, más producción y mejor calidad. Actualmente se dispone de rosales para distintos usos según el tipo de crecimiento, desde miniaturas en maceta para balcones, hasta arbustos de grandes dimensiones como ejemplares únicos o trepadores para cubrir una pérgola.

Los principales productores de rosas a nivel mundial se dividen en dos grandes grupos: países desarrollados (Holanda, Francia, Japón) con grandes inversiones en infraestructura y mano de obra, es decir grandes costos de producción; y países del Hemisferio Sur (Colombia, Ecuador, Zaire, Kenya, etc.) con condiciones ambientales más favorables, que permiten el cultivo con una infraestructura más sencilla y costos de mano de obra más bajos, generando en consecuencia costos de producción mucho menores (Wright et al., 2001).

En Argentina el cultivo de la rosa comenzó en la década del 30 en el norte de la provincia de Buenos Aires, expandiéndose hasta formar, con el clavel y el crisantemo, el grupo de flores más cultivado y comercializado en el país. En el resto del mundo la situación es similar, ya que las tres especies abarcan más del 50% de la producción total de flores de corte. En la última década, el rosal constituye la especie para flor de corte con mayor superficie bajo invernáculo en Argentina, extendiéndose su cultivo desde el norte de la provincia de Buenos Aires hacia el resto de la misma. Su producción está en la actualidad concentrada en la zona de La Plata (Colonia Urquiza y alrededores). A partir de los años 90 surgen otras zonas de cultivo, de mejores condiciones ecológicas y menores costos de mano de obra como las provincias de Córdoba, Mendoza, Corrientes, y más recientemente Misiones, Chubut, los alrededores de Rosario y Tucumán, (Wright et al., 2001). Un relevamiento realizado en el Gran Buenos Aires determinó que la superficie florícola cultivada bajo cubierta es de 235 ha, con un 33% de los productores dedicados al cultivo de rosas (Morisigue et al., 2002).

En la década del 70 se realizaron intentos de exportación, con una buena aceptación en los mercados europeos. En la década del 90 el cultivo presentó un gran salto tecnológico, acompañando al resto de las especies del sector florícola. Se produjo una total renovación de las variedades cultivadas, para poder competir con las producidas en el exterior, junto con grandes cambios en el manejo del cultivo: densidad de plantación, fertirriego, forma de poda y tratamiento de poscosecha. Últimamente también están surgiendo grados de calidad comercial según el largo del tallo. En la actualidad, una variedad no se cultiva más de 4 ó 5

años, a diferencia de lo que sucedía a principios de los 90 donde era común que se cultivara por 7 ó 10 años (Wright et al., 2001).

La arquitectura de la planta de rosa posee una influencia fundamental sobre la producción de flores, tanto sobre su cantidad como su calidad (Kool, 1996). Se utilizan distintas técnicas de conducción, desde el manejo tradicional hasta la técnica de agobio, que implica la realización de un doblado continuo de tallos, en ángulo superior a los 90° (Kool et al., 1997). Esta práctica elimina el cambio brusco de la relación tallo/raíz que ocasiona la poda tradicional, con su secuela de muerte de raíces y retraso en el crecimiento y desarrollo (Fuchs, 1996). Se destaca por la continua producción de carbohidratos y por la remoción de la dominancia apical de los tallos (Blom y Sutjita, 1996). Las plantas agobiadas producen un mayor crecimiento en el diámetro de las varas y un mayor número de flores de mejor calidad, pero pueden sufrir un *stress* ambiental que a largo plazo podría afectar la productividad del cultivo (Mascarini et al., 2003).

Se diferencian dos modalidades de producción. La estacional responde al ciclo natural de la planta (producción primavera-verano-otoño, período de reposo durante el invierno). En la no estacional se altera el ciclo natural de la planta, trasladando el período de reposo al verano, así después de una poda leve se busca la entrada en producción forzada en otoño-invierno, cuando generalmente se obtienen mayores precios. Con cualquiera de las modalidades descritas se puede producir en forma continua o de corte agrupado (Fernández, 2000).

Se han citado numerosos patógenos sobre rosal en Argentina. En los últimos años hemos observado una alta incidencia de atizonamientos, que parecen ser no atribuibles a *Botrytis cinerea* o *Coniothyrium fuckelii*, los dos patógenos citados hasta el momento como responsables (Wright et al. 2001).

Botrytis está entre las especies fitopatógenas y saprófitas más ubicuas, afectando numerosos cultivos (Jarvis, 1977). Los cultivos florales bajo cubierta están constantemente amenazados por *B. cinerea*. Numerosas razones hacen que el control de este hongo sea dificultoso (Hausbeck y Moorman, 1996). Su control debe enmarcarse entonces en un esquema de un manejo integrado, que

combine todas las estrategias disponibles. Entre ellas se encuentra el control biológico, que puede definirse como “la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad de un patógeno para causar una enfermedad, llevada a cabo a través de uno o más organismos diferentes del hombre” (Baker y Cook, 1983). Una manera comúnmente utilizada para controlar biológicamente un patógeno del filoplano es a través de la introducción de un antagonista (Bettiol, 1991b).

El control biológico debe ser considerado como una alternativa dentro de un programa general de control (Ghini, 1991). Ha despertado la atención de muchos investigadores la posibilidad de reducir la utilización de productos químicos a través de prácticas alternativas, como la integración de microorganismos antagónicos y dosis reducidas de fungicidas. (Soares de Melo, 1991). Según Papavizas (1973, citado por Ghini, 1991) una integración del control químico y biológico es un abordaje en el cual todos los métodos de control biológico pueden ser utilizados para reducir la actividad del patógeno a niveles tolerables, siendo los productos químicos aplicados cuando son absolutamente necesarios.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar el/los agentes causal/les del atizonamiento del rosal y sus posibles antagonistas en el filoplano, con el objeto de seleccionar aquellos con mayores posibilidades de comportarse como biocontroladores en las condiciones climáticas, ecológicas y de manejo de la región de cultivo bajo estudio.

HIPÓTESIS

- El atizonamiento no es una enfermedad del rosal que pueda atribuirse a un solo agente patógeno. Diferentes microhongos son capaces, en forma individual o colectiva, de producir síntomas similares.
- La filósfera, y particularmente el filoplano de los rosales de corte y ornamentales, albergan microhongos que se comportan como antagonistas naturales de los agentes del atizonamiento, y que pueden ser seleccionados para actuar como biocontroladores.

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS **AGENTES CAUSALES DEL** **ATIZONAMIENTO DEL ROSAL**

2.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha agravado la manifestación de ciertas patologías en los cultivos de rosa para corte y macetas para jardín, debido al mal uso ó mala aplicación de distintas tecnologías, por ejemplo: mal manejo de la fertilización (especialmente nitrogenada), o de la ventilación en invernáculos, entre otros (Wright et al, 2001).

Las enfermedades citadas en Argentina hasta el momento son las siguientes: oídio (*Podosphaera pannosa* (Wallr.Fr) de Bary = *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. Fr.) Lév.) (Hauman y Parodi, 1921; Marchionatto, 1942; Fernández Valiela, 1978b; Wolcan et al, 2001); tizón o cancro del tallo del rosal (*Coniothyrium fuckellii* Sacc.) (Marchionatto, 1942, 1944); podredumbre de pimpollos y atizonamiento de tallos, o moho gris (*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.) (Marchionatto, 1942, 1944; Fernández Valiela, 1978a); mancha negra (*Diplocarpon rosae* Wolf.) (Marchionatto, 1942, 1944); antracnosis (*Elsinoe rosarum* Jenkins & Bitank) (Marchionatto, 1942, 1944); roya (*Phragmidium mucronatum* (Pers.) Schlecht) (Marchionato, 1942; Lindquist, 1982); mildiu o “downy mildew” (*Peronospora sparsa* Berk) (Jauch, 1959); marchitamiento (*Fusarium oxysporum* Schlectht) (Gamboa, 1982); agalla de corona (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsed) Conn.) (Babbitt et al., 1997) y fumagina (Wright et al 2001). También se han observado síntomas atribuibles a virosis, cuyos agentes no han sido determinados (Wright et al., 2001). Actualmente, las enfermedades con mayor incidencia en cultivos bajo cubierta son la podredumbre de los pimpollos y atizonamiento de tallos, el oídio y el mildiu. Las de mayor incidencia en cultivos no protegidos son la mancha negra y la roya (Wright, 2006). Las Figuras 1 a 9 ilustran la sintomatología de las enfermedades citadas.

Las observaciones realizadas en zonas productoras para flor de corte de los alrededores de Buenos Aires y La Plata y en viveros de venta de ejemplares para jardines localizados en San Pedro y Río Negro, así como el análisis de muestras recibidas en el LASAVE (Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la U.B.A.), permitieron determinar en los últimos años una alta incidencia de atizonamientos de tallos. Ellos no pudieron ser atribuibles a ***Botrytis cinerea*** o a ***Coniothyrium fuckelii***, patógenos citados previamente como agentes causales de dicha sintomatología en Argentina, dado que en estudios preliminares se obtuvieron aislamientos correspondientes a otros microorganismos.

La enfermedad comienza a partir de heridas de la poda o cortes de flores. Al principio se observa una mancha de color amarillento a rojizo, que circunda el tallo y avanza hacia abajo “dieback” (Figura 10), produciendo en algunos casos canchales (Figura 11). Finalmente puede producirse la muerte de las ramas afectadas y en muchos casos de la planta (Figura 12). Prospecciones realizadas a partir de 1998 permitieron observar importantes pérdidas en cultivos para flor de corte en el oeste del Gran Buenos Aires y alrededores de La Plata. Durante la campaña 2002-2003 se observó en San Pedro la pérdida de cultivos completos debido al atizonamiento de tallos. Los estudios preliminares permiten postular que la enfermedad es ocasionada por un complejo fúngico.

2.2. OBJETIVOS

- Aislar e Identificar los agentes etiológicos del atizonamiento del rosal.
- Cuantificar la incidencia del atizonamiento y de cada posible agente en producciones comerciales de flores de corte y ornamentación de jardines.

2.3. HIPÓTESIS

- El atizonamiento de los rosales es ocasionado por un grupo de hongos que pueden actuar aisladamente o en forma conjunta .
- ***Botrytis cinerea*** es uno de los integrantes más importantes del grupo.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Entre 1998 y 2003 se realizaron prospecciones en cultivos destinados a la producción de rosas (flores de corte) y viveros de producción de plantas de rosal para jardines, en las principales zonas productoras de la provincia de Buenos Aires. Las recorridas se realizaron teniendo en cuenta la demanda del medio productivo, a través de consultas a los productores acerca de la problemática sanitaria de sus cultivos.

Síntomas, muestreo e incidencia en flores de corte.

Entre 1998 y 2002 se visitó, en varias oportunidades, el cultivo Shigenaga, localizado en Libertad, Merlo. En 2002, los viveros Dechima e Hisaki, en la localidad de Escobar. En 2003 se relevaron los cultivos Hakanata e Imanishi, ubicados en Colonia Urquiza (La Plata), Shigenaga, en Libertad (Merlo) y Barreiros, en Villa Rosa (Pilar). En la Tabla 1 se indican los cultivares de los que se obtuvieron muestras en cada cultivo. En la Tabla 2 se mencionan algunas de las características de los cultivos. Para los cultivos Hatanaka, Shigenaga y Barreiros se realizó una diferenciación de síntomas a efectos de intentar relacionar avance de atizonamiento y el tipo de síntomas observados con los patógenos involucrados

Síntomas, muestreo e incidencia en plantas para jardines.

Se visitaron los viveros productores de plantas de rosal para jardines Alés y Viloch, ubicados en la localidad de San Pedro. Se recibieron además muestras del Vivero Villoch, tomadas por el productor. En la Tabla 3 se indican los cultivares muestrados en cada vivero, que fueron variables según la fecha de muestreo, dependiendo de los cultivares presentes y de la posibilidad de tomar muestras. En la Tabla 4 se mencionan algunas de las características de los cultivos.

En todos los casos se observaron y describieron los síntomas y se midió el avance del atizonamiento en centímetros. Se estimó la incidencia de la enfermedad y se tomaron muestras con síntomas de atizonamiento, con muerte de ramas y en algunos casos de la planta. Para estimar la incidencia del atizonamiento en cada cultivo, se la define como porcentaje de plantas enfermas sobre el total de plantas (Bergamin Filho y Amorin, 1996). La medición se realizó para cada cultivar sobre las plantas de los 50 metros centrales de las 2 líneas centrales del cultivo (aproximadamente 900 plantas). En el caso de las plantas cultivadas en maceta en los viveros de producción de plantas para jardines, se estimó el porcentaje de plantas afectadas sobre un mínimo de 100 plantas. Se tomaron muestras de ramas y tallos de 30 plantas afectadas de cada cultivar (en caso de que el número de plantas afectadas de un cultivar fuera menor a ese valor, se tomaron todas las muestras). Cuando se observaron síntomas sobre otros órganos de la planta, se tomó una cantidad de muestras similar.

Tabla 1. Cultivares de los que se tomaron muestras y se evaluó la incidencia en cultivos para flor de corte en cada uno de los cultivos.

Cultivo	Cultivares evaluados.
Shigenaga (Libertad, Merlo)	Virginia, Confeti, Tineke, Samantha, Caramia.
Dechima (Escobar)	Feria, Merlise, Exótica, Confeti, Ana, Rafaela, Gran Gala, First Red.
Hisaki (Escobar)	Mini Rosal.
Hakanata (Colonia Urquiza, La Plata)	Top secret, Rojito 1, Rojito 2, Salvaje, Virginia, Macarena, Exótica, First Red.
Imanishi (Colonia Urquiza, La Plata)	Virginia, Papillón, Bell Rouge.
Barreiros (Villa Rosa, Pilar)	Peckouvo, Red Velvet, Challenger, Macarena, Exótica, Virginia, Polo.

Tabla 2. Principales características de los cultivos para flor de corte visitados.

Cultivo	Características principales
Shigenaga (Libertad)	<p>Producción de tipo familiar.</p> <p>Invernaderos con techos de vidrio con serios problemas de infraestructura y conservación. Falta de personal en cantidad y capacitación.</p> <p>Podas de limpieza inadecuadas. Acumulación de restos vegetales dentro y fuera del invernáculo. Problemas con el control de plagas.</p> <p>Algunas líneas con técnica del agobio.</p> <p>Dentro de los mismos invernaderos cultiva otras especies para flor de corte, como San Vicente, margarita y fresia.</p>
Imanishi (Colonia Urquiza)	<p>Producción de tipo familiar. Pocos empleados.</p> <p>Invernáculos con algunos problemas de infraestructura.</p> <p>Podas de limpieza inadecuadas y falta de eliminación de algunos restos vegetales. Algunas líneas con técnica del agobio.</p> <p>Produce otras especies, como clavel, San Vicente y margarita.</p>
Hatanaka (Colonia Urquiza)	<p>Cultivo de tipo empresarial, gran cantidad de empleados que trabajan en forma de mediería donde a cada empleado se le asignan determinadas líneas del cultivo. Muy buena estructura de invernáculos.</p> <p>Algunas líneas con técnica del agobio.</p> <p>Marcadas diferencias en el manejo entre invernáculos y aún entre líneas.</p> <p>Produce exclusivamente rosas para corte.</p>
Barreiros (Villa Rosa)	<p>Manejo empresarial. Cultivo de reciente implantación.</p> <p>Muy buena estructura de invernáculos. Algunas líneas con técnica del agobio.</p> <p>Asesorado técnicamente. Buen manejo de podas y eliminación de residuos.</p> <p>Produce exclusivamente rosas para corte.</p>
Dechima (Escobar)	<p>Estructura de invernáculos con problemas de ventilación.</p> <p>Problemas de manejo (falta de podas de limpieza, eliminación de residuos).</p> <p>No utiliza la técnica del agobio.</p> <p>Se realizan mejoras en el manejo por capacitación del dueño.</p> <p>Produce exclusivamente rosas para corte.</p>
Hisaki (Escobar)	<p>Estructura de invernáculos adecuada.</p> <p>Manejo de cultivo adecuado, con mejoras en los últimos tiempos por capacitación del dueño. No utiliza la técnica del agobio.</p> <p>Produce otras especies como tulipán.</p>

Tabla 3. Cultivares de los que se tomaron muestras y se evaluó la incidencia en viveros de plantas para jardines.

Vivero	Cultivares
Alés (San Pedro)	rosales comunes de San Pedro (no identificados), Brasilia, Papillón, Moctezuma, Navidad.
Villoch (San Pedro)	Super Star, Carolina de Mónaco, King Rawson, Bagazo común, Norita, Papillón, Navidad, Brasilia, Medallón, Gloria Dei, Super Star, México. Prince Margaret.

Tabla 4. Principales características de los viveros de plantas para jardines visitados.

Cultivo	Características principales
Viloch (San Pedro)	Varios años de monocultivo. Ubicación del cultivo en un lote muy bajo, problemas de encharcado. Sustratos pesados, endurecen en la maceta. Restos de residuos de la poda en el entresurco, sin quemar. Entresurcos muy enmalezados. Deficiente control fitosanitario.
Alés (San Pedro)	Buen drenaje del cultivo, mayor parte de plantas en “canchas” de cemento. Sustratos más livianos. Control adecuado de malezas. Restos de la poda eran retirados para su quema posterior.

El diagnóstico de las enfermedades se realizó siguiendo los postulados de Koch, según la siguiente secuencia: Observación e identificación de los síntomas, Aislamiento, Pruebas de patogenicidad, Reaislamiento e Identificación del agente causal (Fernández Valiela, 1978a). Los síntomas fueron observados a simple vista y bajo lupa y se identificaron utilizando bibliografía fitopatológica general (D'Arcy et al., 2001).

Aislamientos

Se cortaron trozos de ramas enfermas que incluían la zona de avance de la enfermedad, se desinfectaron con etanol 70% (1 minuto) e hipoclorito de sodio 0,2% (1 minuto) y se lavaron con agua destilada estéril. Fueron colocados en cámaras húmedas confeccionadas con bandejas plásticas e incubados en una cámara climatizada (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) a 20-22°C, hasta aparición de signos de enfermedad. Los microorganismos desarrollados fueron sembrados en cajas de Petri con agar papa glucosado (APG) al 2%, pH 7. Además, material obtenido en forma similar y desinfectado, se sembró directamente en APG y se incubó a 20-22°C durante 7 días en oscuridad. Los aislamientos de pétalos, pimpollos y pedúnculos florales se realizaron del mismo modo.

Pruebas de patogenicidad

Dado el manejo de las plantas en invernáculos y viveros para producción de plantas de jardín, con cortes de flores y podas, se decidió generar cortes con tijera de podar previo a la inoculación de cada microorganismo. Los testigos recibieron el mismo tratamiento. Los distintos aislamientos obtenidos fueron inoculados en distintos momentos y, dada la dificultad para conseguir plantas sanas, se debió recurrir en cada caso a distintas variedades. El inóculo fue preparado en todos los casos a partir de cultivos puros de 7-10 días de desarrollo en APG bajo luz cercana al ultravioleta (12 horas de fotoperíodo). Las observaciones se efectuaron periódicamente determinando el momento de aparición de los síntomas y signos y la evolución de la enfermedad. La longitud de las necrosis fue medida en centímetros. Los testigos fueron pulverizados con

agua destilada estéril. Dada la dificultad para conseguir plantas sanas y teniendo en cuenta que las inoculaciones se realizaron en distintos momentos, para la inoculación de cada microorganismo de debió recurrir a cultivares diferentes.

El inóculo correspondiente al aislamiento 1 fue preparado a partir de la cepa obtenida del cultivo Shigenawa en 1998. Se inocularon 2 plantas de los cultivares para flor de corte Feria, Exótica y Confeti y 2 plantas de los cultivares para jardín Electrón y King Rawson con una suspensión de 2×10^7 conidios por mililitro de agua destilada estéril. Se inocularon también con la misma suspensión 10 pimpollos y 10 flores de una mezcla de cultivares comerciales, colocados en recipientes con agua. Como testigos se utilizaron 2 plantas de cada variedad, 10 pimpollos y 10 flores. Se midió el avance del atizonamiento de los tallos cada cuatro días, a partir del sexto día de la inoculación.

Para el aislamiento 2 se inocularon 10 plantas de Mini Rosal y 10 de Rafaela con una suspensión de $2,4 \times 10^5$ esporas ml^{-1} de agua destilada estéril. El inóculo se obtuvo de un aislamiento del cultivar Rafaela. Como testigos se utilizaron 5 plantas de cada una de los mismos cultivares.

Para el aislamiento 3 se inocularon 10 plantas de la variedad King Rawson con una suspensión de 3×10^6 esporas ml^{-1} de agua destilada estéril. El inóculo se obtuvo a partir de una cepa aislada del cultivar First Red, cultivo Hatanaka. Como testigos se utilizaron 10 plantas del mismo cultivar.

Para el aislamiento 4 se seleccionaron plantas sanas envasadas en contenedores plásticos de 4 litros, provenientes del Vivero Villoch (San Pedro, Bs. As.). Se utilizaron suspensiones de $1,6 \times 10^6$ esporas. ml^{-1} para pulverizar la cepa obtenida del cultivar para jardín Papillón sobre plantas para jardín y $2,3 \times 10^6$ esporas. ml^{-1} para pulverizar la cepa aislada a partir del cultivar Ana sobre plantas para flor de corte. Cada aislamiento fue inoculado en forma independiente sobre los cultivares Black Bacará (Meilland, flor blanca), Fire King (Meilland, rosado fuerte), Travemonde (Común de San Pedro, rojo), King Rawson (Común de San Pedro, amarillo) y Electrón (Común de San Pedro, rosado brillante). Se inoculó

una planta de cada cultivar, excepto en el caso de Travemonte que se inocularon dos plantas con cada uno de las cepas mencionadas. Se realizaron mediciones del avance del atizonamiento en todas las ramas de cada planta (entre 2 y 4). Las observaciones se efectuaron periódicamente para determinar el momento de aparición de los síntomas y signos y su evolución. Se cuantificó el diámetro de las ramas y la longitud de la necrosis.

Para el aislamiento 5 se seleccionaron seis plantas sanas de rosal, envasadas en contenedores plásticos de 4 litros, provenientes del Vivero Villoch (San Pedro, Bs. As.). Se las pulverizó con una suspensión de esporas en agua destilada estéril. Una concentración de inóculo de 1×10^7 esporas/ml del aislamiento obtenido del cultivar Ana fue asperjada sobre los siguientes cultivares para jardines: Black Bacará (1, 3 y 4), King Rawson (2 y 6) y Fire King (5). Fueron pulverizados con agua destilada estéril los siguientes cultivares: Black Bacará (1), Fire King (2), Garden Party (3), Oklahoma (4), Electrón (5) y King Rawson (6). Entre paréntesis se indica el número utilizado para identificar las plantas en las pruebas de patogenicidad. Los aislamientos fueron cultivados a partir de una colonia monospórica en agar papa sucrosado (APS).

Para el aislamiento 6 se eligieron plantas sanas de rosal, envasadas en contenedores plásticos de 4 litros provenientes de viveros de San Pedro. El inóculo se obtuvo a partir del aislamiento obtenido del cultivar Papillón. Las inoculaciones se realizaron sobre los siguientes cultivares: Dinastie (2 plantas), Crimson (2 plantas) y Fuschia (una planta). Se utilizó una suspensión de $1,6 \times 10^6$ esporas.ml⁻¹. Como testigos se utilizaron los mismos cultivares y en igual cantidad.

Tanto las plantas, pimpollos y flores inoculados como los testigos se cubrieron con bolsas de polietileno humedecidas, las que fueron retiradas a los seis días. Los materiales fueron mantenidos en cámara bioclimática ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ y alternancia de 12 horas de luz fluorescente y 12 horas de oscuridad).

Reaislamientos

Se realizaron según los procedimientos utilizados en los aislamientos iniciales.

Identificación de los Aislamientos

La identificación se realizó sobre aquellos aislamientos que dieron resultados positivos en las pruebas de patogenicidad. En todos los casos los aislamientos obtenidos se repicaron a cajas de Petri conteniendo APG. Para el caso del aislamiento 3, todas las cepas se sembraron en placas con APG y EM (extracto de malta). Para el estudio de la ontogenia conidial el aislamiento 5 se sembró en agar agua con el agregado de 0,5% de KCl (Fischer et al. 1983).

Para inducir o aumentar la esporulación, la mitad de las placas fueron irradiadas con luz UV (12 hs de luz / 12 hs de oscuridad) a 25°C, durante 10 días. La identificación de los aislamientos se basó en el análisis bajo microscopio de los caracteres morfológicos, biométricos y culturales.

2.5. RESULTADOS

Síntomas observados

En todos los casos se observó que, tanto en plantas para flor de corte como en aquellas para ornamentación, de jardines los síntomas en tallos desarrollaron a partir de heridas causadas por la poda y/o cosecha de flores. El avance de las clorosis y necrosis se manifestó en forma de *dieback*, es decir que se observó una muerte progresiva de los tallos y ramas comenzando por su extremo superior (D'Arcy et al., 2001). La clorosis puede definirse como la disminución en la producción de clorofila, con pérdida de color (pasando a verde claro, amarillo o blanco) y la necrosis como la muerte de células o tejidos, generalmente acompañada por oscurecimiento de coloración parda o negra (D'Arcy et al., 2001). En general los síntomas avanzaban, produciendo el atizonamiento de los tallos (Figura 12) y de las flores (cuando estas eran afectadas). Se entiende por tizón o atizonamiento al manchado, decoloración, marchitamiento o destrucción repentina de hojas, flores, tallos o de toda la planta (D'Arcy et al., 2001).

En la Tabla 5 se describen los síntomas observados en cultivos para flor de corte al momento de la toma de muestras. En algunos casos se observó clorosis y en otros necrosis con distinto grado de avance, pero se puede considerar que ello era una situación momentánea ya que en muchos casos podía evolucionar con el tiempo y la clorosis se transformaba en necrosis y la longitud del área necrótica aumentaba. Ello fue observado a través de la realización de visitas periódicas a los cultivos. En la mencionada Tabla puede observarse que cuando se utilizaba la técnica del agobio sólo se observaron síntomas de necrosis de 0,5-5 cm., mientras que sin agobio la longitud de los atizonamientos fue variable.

La Tabla 6 muestra los síntomas observados sobre tallos de plantas para ornamentación de jardines. Los síntomas fueron en muchos casos similares a los anteriores, pero en algunos casos se presentaban manchas rojizas o pardas en

los tallos (que a veces no comenzaban en la zona de poda) o canchros, con distinta longitud de avance.

Tabla 5: Síntomas observados a partir del corte para la cosecha de flores sobre cultivos de rosal con y sin agobio.

Técnica de cultivo	Síntomas sobre ramas	Denominación*
Sin agobio	Clorosis de 6-16 cm	A
	Necrosis de 3-6 cm	B
	Necrosis de 15-25 cm	C
Con agobio	Necrosis de 0,5-5 cm	D

*Las letras con que se designan los síntomas son utilizadas en las descripciones que se realizan más adelante.

Tabla 6: Síntomas observados sobre plantas de vivero para la ornamentación de jardines.

Síntomas sobre ramas	*
Necrosis en parches de color rojizo, que a medida que la enfermedad avanza se tornan de color pardo oscuro.	I
Pequeñas zonas necróticas pardas en ramas y tallos que avanzan transformándose en canchros.	II
Zonas necróticas pardas que avanzaban en forma de <i>dieback</i>	III
Necrosis de ramas completas.	IV

*Las letras con que se designan los síntomas son utilizadas en las descripciones que se realizan más adelante.

En cultivos para flor de corte, se observaron también síntomas de atizomamientos sobre toda la parte aérea de las plantas, particularmente bajo condiciones ambientales de alta humedad relativa en forma continua y temperaturas frescas, registradas en otoños húmedos, en invernáculos con problemas de ventilación. Sobre las flores se observaron pequeñas manchas circulares, que podían llegar a cubrir la mayor parte de los pétalos (Figura 13). La coloración inicial de las mismas dependía del color del pétalo (castaño rojizo,

castaño, rosado oscuro y púrpura sobre pétalos blancos, amarillos, rosados y rojos, respectivamente) (Figura 14). Finalmente las lesiones se tornaban de color castaño en todos los casos (Figura 15) y aspecto húmedo cuando se mantenía la alta humedad relativa ambiente. Con frecuencia se observaron botones florales momificados, cuyo pedúnculo se contraía ligeramente y tomaba un color parduzco (Figura 16), tornándose péndulo en muchos casos (Figura 17). Los extremos de las ramas laterales, aún no lignificados, se necrosaban y también quedaban péndulos (Figura 18).

En cultivos con problemas de manejo se registró también un avance del atizonamiento de los tallos, que culminó con la muerte del tallo infectado y posteriormente de la planta (Figura 19). Sobre las lesiones descritas podían observarse canchales (Figura 20). Se puede definir al canchale como una lesión necrótica en general deprimida, rodeada de tejido sano, ubicada en la corteza y el floema (Jauch, 1985). Sobre todos los órganos afectados se observó un denso moho gris constituido por micelio y gran cantidad de conidióforos con conidios (Figura 21).

Aislamientos obtenidos

Identificación por caracteres morfológicos

Aislamiento 1.

A las 48 hs de colocadas las muestras con síntomas de atizonamiento en ramas, pimpollos y flores en cámara húmeda y en APG en oscuridad, desarrolló un abundante moho gris, constituido por micelio, conidióforos y conidios sobre los tejidos atizonados. A las 48 hs de la siembra de trozos de tejidos de pimpollos, pétalos, pedúnculos florales y tallos en APG se observaron colonias blanquecinas que se tornaban grisáceas con la edad. En ambos casos desarrollaron conidióforos oscuros que portaban conidios hialinos, elipsoides, unicelulares, de 7,2-10,2 μm x 6,3-7,2 μm (8,6 x 6,8). La Figura 22 muestra conidióforos con conidios del patógeno. A las 72 horas comenzaron a desarrollar en APG pequeños esclerocios negros, de forma irregular.

Las características de todos los aislamientos obtenidos corresponden a ***Botrytis cinerea*** Pers., según la descripción de Ellis y Waller (1974). No se observó el teleomorfo.

Aislamiento 2.

A partir de los 3 días de colocados los tallos y ramas en cámara húmeda comenzaron a observarse estructuras fúngicas de color salmón. En los subcultivos desarrollaron a partir de los tres días de la siembra colonias fúngicas color salmón con conidióforos erectos, largos y septados portando en su ápice conidios en cadenas, hialinos, agrupados, bicelulares (la célula superior algo más grande), ovoides a elípticos con bases truncadas de 12,4-19,8 μm x 6,4-10,1 μm (16,5 x 8), largo de la célula basal 5,4-10,4 μm (8,6).

Las mencionadas características permiten identificar al microorganismo como *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray (Domsch et al., 1980).

Aislamiento 3.

No se observaron signos a partir de los tejidos atizonados ubicados en cámara húmeda. A partir de los 3-4 días de la siembra de los tejidos en APG desarrollaron colonias de color oliváceo a casi negro, con micelio septado. A los 10 días, tanto los cultivos, en oscuridad como en alternancia de luz cercana al ultravioleta/oscuridad, se observaron colonias algodonoso apretado sobre el sustrato a afieltradas, de color gris verdoso oscuro con zonas más oscuras, ocupando toda la placa. Las que desarrollaban en EM eran levemente más oscuras que las de APG. El hongo presenta conidióforos simples o ramificados, muchas veces geniculados, olivaceos a castaño claro, lisos, con cicatrices. Los conidios son poroides, ovoides, obpiriformes, obclavados o elipsoidales, con hasta 5 septos transversales y varios longitudinales u oblicuos, con paredes lisas o verrucosos, con 25-30 μm (27,5) de largo y 9-10,4 μm (9,7) el ancho mayor, con un cuello aproximadamente cilíndrico.

Las características observadas coinciden con la descripción de Ellis (1971) para *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler.

Aislamiento 4.

A partir de los seis días se observaron puntuaciones negras sobre los trozos de tallos ubicados en cámaras húmedas. A partir de los tres días de siembra en APG de trozos de tallos afectados desarrolló un micelio blanco cremoso, tabicado, con formación a partir de los 6 días de conidiomas acervulares que contenían conidios con cuatro tabiques, las 3 células mediales coloreadas y las 2 apicales hialinas, de una longitud de 22-26 μ (24,5) y un ancho de 6-6,8 μ (6,25). Los conidios presentaron 3 apéndices apicales.

Las mencionadas características permiten identificar al microorganismo como *Pestalotiopsis guepini* (Desm.) Stey. (Sutton, 1980).

Aislamiento 5.

A partir de los seis días comenzó a observarse el desarrollo de micelio blanco sobre los trozos de tallos ubicados en cámaras húmedas, que se hacía abundante a los diez días. En las siembras de tejido de tallos atizonados en APG se observaron colonias con abundante micelio aéreo, que a los cuatro días presentaban un crecimiento de 4 cm de diámetro. La pigmentación de la colonia es blanco rosada (White, Rosy-buff-flesh). Se distinguen sectores más oscuros Blue Violet Dark-Violet (Rayner, 1970) que corresponden a pústulas estromáticas. La colonia luego de 7 a 10 días de cultivo toma una apariencia de colonia con micelio seco y pulverulento.

Los macroconidios son levemente curvados a rectos, fusiformes, delgados, las paredes ventral y dorsal están dispuestas casi en forma paralela. Se distingue claramente la célula apical de la basal. Se observan en su mayoría tri y pentatabicados. Sus medidas son: 3 tabiques: 20,1-31,0 μm x 2,0-3,0 μm (25,1 μm x 2,7 μm); 5 tabiques: 30,0-48,0 μm x 2,5-5 μm (36,0 μm x 3,2 μm).

Los microconidios se presentan en forma abundante en el micelio, son unicelulares pero los hay bicelulares, ovales a clavados. Estos microconidios

emergen de fiálides cortas simples, implantadas sobre las hifas, terminando con largas cadenas de sucesión basípeta (característica diferencial de la especie). También pueden observarse, además de las cadenas de microconidios, la presencia de falsas cabezas constituídas por 4 a 5 microconidios. Sus medidas son: 0 tabiques: 5,0 a 7,2 μm x 2,0-3,0 μm (Promedio: 5,9 μm x 2,2 μm); 1 tabique: 7,5-9,0 μm x 2,0-2,7 μm (Promedio: 8,4 μm x 2,4 μm). Las fiálides miden 20,0-29,0 μm - 2,7-3,5 μm Las clamidosporas están ausentes.

Las características del aislamiento corresponden a ***Fusarium verticillioides*** (Sacc.) Nirenberg (= ***F. moniliforme***) (Booth, 1971 y 1977; Nelson et al 1983).

Aislamiento 6.

No se observaron signos a partir de los tejidos atizonados ubicados en cámara húmeda. A partir de los 7 días de la siembra de los tejidos en APG se observó la formación de micelio oscuro y a los 15 días picnidios negros que portaban dos tipos de conidios, unos fusoidales, hialinos, con los extremos agudos, y otros filiformes, curvados en forma de gancho.

Las características observadas corresponden a ***Phomopsis*** sp. (Sutton, 1980).

Incidencia y Patogenicidad

Se consideró a un determinado microorganismo como el agente causante del atizonamiento de una muestra, sí es aislado repetidamente de la misma.

El porcentaje de atizonamiento de tallos promedio para todos los cultivos para flor de corte fue del 70%, mientras que para ornamentación de jardines fue del 55%. Las Tablas 7 a 11 muestran la incidencia del atizonamiento de tallos observado en los cultivos para flor de corte en los respectivos cultivares analizados. Las Tablas 8 a 11 también muestran el tipo de síntomas observados, según lo especificado en la Tabla 5.

La Tabla 7 muestra la incidencia del atizonamiento de los tallos observado en los cultivos Dechima e Hisaki (Escobar) y Shigenaga en las dos primeras visitas (Pontevedra) para flor de corte, con valores que van del 5 al 90%. La tabla 6 corresponde al cultivo Imanishi de Colonia Urquiza (La Plata), con valores del 92 al 98% de incidencia. La Tabla 9 corresponde a la evaluación realizada sobre materiales del productor Hatanaka (Colonia Urquiza) con valores del 50 al 100%. La Tabla 10 muestra la incidencia del atizonamiento del cultivo Shigenaga (Pontevedra) en la tercera recorrida, con valores del 70 al 100%. Por último, la Tabla 11 indica los valores de incidencia para el cultivo Barreiros (Villa Rosa), con un 100% de plantas afectadas.

La Tabla 12 muestra la incidencia del atizonamiento de tallos observado en los cultivos para ornamentación de jardines, la incidencia evaluada por establecimiento y los cultivares. Muestra además el tipo de síntomas según lo especificado en la Tabla 6.

Tabla 7: Incidencia del atizonamiento total en diferentes cultivares en los cultivos Dechima e Hisaki (Escobar) y Shigenaga (Pontevedra) en las recorridas de 1998 y 2001 para flor de corte.

Cultivo	Cultivar	Incidencia total (%)
Dechima	Feria	8
	Merlise	16
	Exotica	5
	Confetti	3,5
	Ana	16
	Gran Gala	3,5
	First Red	26
	Rafaela	18
Hisaki	Mini Rosal	18,2
Shigenaga (2001)	Virginia	50
	Confeti	50
	Tineke	50
	Samantha	50
	Caramia	50
Shigenaga (1998)	Virginia	90
	Confeti	90
	Tineke	90
	Samantha	90
	Caramia	90

Tabla 8: Incidencia del atizonamiento total, longitud de la lesión, y manejo en el cultivo Imanishi (Colonia Urquiza) para flor de corte.

Cultivar	Incidencia de tizón (%)	Longitud promedio de la lesión a campo (cm)	Aislamientos obtenidos			
			Cultivo sin Agobio			Cultivo con agobio (D)
			(A)	(B)	(C)	
Virginia	95	15	+	+	+	+
Bell Rouge	98	15	+	+	+	+
Papillón	92	18	+	+	+	+

Referencias: + se observaron síntomas de atizonamiento

Tabla 9: Incidencia del atizonamiento total en el cultivo Hatanaka (Colonia Urquiza) para flor de corte.

Cultivar	Incidencia de tizón (%)	Longitud promedio de la lesión a campo (cm)	Aislamientos obtenidos			
			Cultivo sin Agobio			Cultivo con agobio (D)
			(A)	(B)	(C)	
Rojito 1	50	10	+	+	+	+
Rojito 2	75	10	+	++	+	+
Top Secret	55	15	+	+	+	+
Salvaje	60	8	+	+	++	+
Virginia	98	15	+	+	+	+
Exótica	100	30-45	+	++	+	+
Top Secret	100	25-50	++	+	+	++
Macarena	100	30-50	+	+	+	+
First Red	100	10-25	+	+	++	+

Referencias: + se observaron síntomas de atizonamiento.

++ no se observaron síntomas de atizonamiento.

Tabla 10: Incidencia del atizonamiento total en el cultivo Shigenaga (Pontevedra) para flor de corte , tercera recorrida.

Cultivar (edad de la planta en años)	Incidencia de tizón (%)	Longitud promedio de la lesión a campo (cm)	Aislamientos obtenidos			
			Cultivo sin Agobio			Cultivo con agobio (D)
			(A)	(B)	(C)	
First Red	100	20-30	+	+	+	+
Dallas	95	20-30	+	+	+	+
Virginia	95	15-20	+	+	+	++
Ana	100	15-20	+	+	+	++
Confetti	100	15	+	+	+	+
Rafaella	95	15	+	+	+	++
Vivaldi	100	30-40	+	+	+	++
Tennessee	70	25-30	+	+	+	++
Gran Gala	95	20	+	+	+	+

Referencias: + se observaron síntomas de atizonamiento.

++ no se observaron síntomas de atizonamiento.

Tabla 11: Incidencia del atizonamiento total en el cultivo Barreiros (Villa Rosa) para flor de corte.

Cultivar (edad de la planta en años)	Incidencia de tizón (%)	Longitud promedio de la lesión a campo (cm)	Aislamientos obtenidos			
			Cultivo sin Agobio			Cultivo con agobio (D)
			(A)	(B)	(C)	
Peckuovo	100	10	+	+	+	++
Red Velvet	100	10	+	++	+	++
Challenger	100	15	+	++	+	++
Macarena	100	10	+	++	+	++
Exótica	100	10	+	++	+	++
Virginia	100	15	+	++	++	++
Polo	100	20	+	++	++	++

Referencias: + se observaron síntomas de atizonamiento.

++ no se observaron síntomas de atizonamiento.

Tabla 12: Viveros y cultivares destinados a la producción de plantas en macetas con síntomas de atizamiento.

Vivero	Fecha de muestreo E Incidencia	Cultivar	Síntomas sobre ramas
Alés	17-03-03 I= 15%	<ul style="list-style-type: none"> • 2 cultivares de flor amarilla • 1 de flor blanca (rosales comunes de San Pedro, injertados sobre pies libres de virus) • Rojo • Rojo Fuerte • Matizado 	III
	28-05-03 I= 20%	<ul style="list-style-type: none"> • Brasilia • Navidad 	I – IV
		<ul style="list-style-type: none"> • Papillón • Moctezuma 	I – II - IV
Villoch	17-03-03 I= 85%	<ul style="list-style-type: none"> • Carolina de Mónaco • Super Star 	III
		<ul style="list-style-type: none"> • King Rawson • Bagazo común 	IV
	28-05-03 I= 100%	<ul style="list-style-type: none"> • Norita • Medallón 	I
		<ul style="list-style-type: none"> • Papillón • Navidad • Gloria Dei 	III
		<ul style="list-style-type: none"> • Brasilia 	III
		<ul style="list-style-type: none"> • King Rawson 	II – IV
		<ul style="list-style-type: none"> • Super Star • México 	IV
		<ul style="list-style-type: none"> • King Rawson 	II
	18-07-03	<ul style="list-style-type: none"> • Norita • Prince Margaret 	IV

***Botrytis cinerea* (aislamiento 1)**

La Tabla 13 muestra la incidencia de atizonamiento producido por todos los patógenos y el ocasionado por ***B. cinerea***, en los cultivos para flor de corte Dechima, Hisaki y Shigenaga. La incidencia en el cultivo Dechima varió entre el 0 y el 26% según el cultivar considerado, siendo First Red el más afectado. En una posterior visita al cultivo Dechima no se observaron variaciones en la incidencia del atizonamiento, mientras que a los 10 meses se detectó un aumento de la incidencia sobre la variedad First Red, que alcanzó al 30%. En las siguientes visitas no hubo variaciones en los registros. Posteriormente el productor realizó podas de saneamiento en el cultivo, lo que impidió continuar con la evaluación.

En la visita realizada al cultivo Hisaki se observó un 18,2% de plantas de Mini Rosal afectadas por distintos patógenos, el análisis de las muestras determinó un 7,15% atribuible a ***B. cinerea***. En el cultivo Shigenaga se observó una incidencia del atizonamiento ocasionado por ***B. cinerea*** de entre aproximadamente el 50% (2001-2002) y el 90% (1998-2000), en otoño. En este cultivo en particular, se observaron grandes deficiencias en el manejo general, ya que presenta una pobre infraestructura de invernáculos, sumada al abandono parcial de las plantas en los meses en los que no se registran precios de venta favorables para las rosas.

Tabla 13: Incidencia del atizonamiento total y por *Botrytis cinerea* en los cultivos para flor de corte Dechima e Hisaki (Escobar) y Shigenaga en las dos primeras recorridas (Pontevedra).

Cultivo	Cultivar	Incidencia total (%)	<i>Botrytis cinerea</i> (%)
Dechima	Feria	8	5
	Merlise	16	0
	Exotica	5	3
	Confetti	3,5	2
	Ana	16	0
	Gran Gala	3,5	0
	First Red	26	26
	Rafaella	18	0
Hisaki	Mini Rosal	18,2	7,15
Shigenaga (2001)	Virginia	50	50
	Confeti	50	50
	Tineke	50	50
	Samantha	50	50
	Caramia	50	50
Shigenaga (1998)	Virginia	90	90
	Confeti	90	90
	Tineke	90	90
	Samantha	90	90
	Caramia	90	90

De las muestras del vivero Hatanaka (Tabla 9) se obtuvieron aislamientos de ***B. cinerea*** a partir de muestras del cultivar Top Secret con el síntoma B. En las muestras del vivero Shigenaga, visitado en la tercer oportunidad (Tabla 10), se obtuvieron aislamientos de ***B. cinerea*** provenientes de muestras de los cultivares Virginia y Confetti (síntoma A). Como resultado de la prospección en el cultivo Barreiros (Tabla 11), se obtuvieron aislamientos del mismo patógeno sobre Challenger (síntomas A y C) y Polo (síntoma A). No desarrolló ***B. cinerea*** sobre el resto de los materiales con síntomas de atizonamiento (Tablas 9 a 11).

Se observó atizonamiento de tallos en los dos viveros de rosal para planta para ornamentación de jardines, pero en ningún caso se obtuvieron aislamientos de ***B. cinerea*** de dichas muestras.

Pruebas de patogenicidad

En las plantas inoculadas, los síntomas de atizonamiento sobre los tallos se observaron a partir de los cuatro días de la inoculación. Los resultados de las pruebas de patogenicidad en tallos se detallan en la Tabla 13. Entre los 26 y 30 días de la inoculación murieron todas las ramas inoculadas. Los síntomas sobre pimpollos y flores se observaron a partir de los dos días, consistentes en pequeñas manchas circulares sobre los pétalos que avanzaban cubriendo la mayor parte de ellos, de colores variados según su coloración. En todos los casos desarrolló un abundante moho gris sobre los órganos atacados, al día siguiente de la aparición de los síntomas. Tanto los síntomas en tallos como en flores repitieron los originales observados en cultivo.

Tabla 14: Longitud de las lesiones (cm) en tallos de rosal de diferentes cultivares inoculados con *B. cinerea*

Días desde Inoculación	Cultivar									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
10	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2
14	1,4	1,2	1,6	1,1	1,1	0,8	0,6	0,8	0,8	0,7
18	3,9	3,0	3,8	3,0	3,4	2,5	2,6	2,4	2,0	2,3
22	6,9	6,2	7,4	6,8	6,8	5,7	5,9	5,7	5,0	5,5

Cultivares= 1 y 2: Feria; 3 y 4: Exótica; 5 y 6: Confeti; 7 y 8: Electrón; 9 y 10: King Rawson

Los reaislamientos obtenidos mantuvieron las características del aislamiento original, lo que permite confirmar a *B. cinerea* como agente causal de la sintomatología estudiada.

***Trichothecium roseum* (aislamiento 2)**

La Tabla 15 muestra la incidencia de atizonamiento, total y el ocasionado por *T. roseum*, en diferentes cultivares de los cultivos Dechima e Hisaki de Escobar. La incidencia de los atizonamientos producida por *T. roseum* en el cultivo Dechima, varió entre el 0 y el 18% según el material considerado. No se encontró presencia de este patógeno sobre los cultivares Feria, Exótica, Ana, Gran Gala y First Red. En la estimación realizada en el cultivo Hisaki se observó un 5,2% de plantas de Mini Rosal afectadas por *T. roseum* (Tabla 13).

Tabla 15: Incidencia del atizonamiento total y por *Trichothecium roseum* en los cultivos para flor de corte Dechima e Hisaki (Escobar).

Cultivo	Cultivar	Incidencia total (%)	<i>Trichothecium roseum</i> (%)
Dechima	Feria	8	0
	Merlise	16	12
	Exotica	5	0
	Confetti	3,5	1,5
	Ana	16	0
	Gran Gala	3,5	0
	First Red	26	0
	Rafaella	18	18
Hisaki	Mini Rosal	18,2	5,2

Durante las recorridas realizadas en la localidad de Villa Rosa (producción de Barreiros), se obtuvieron aislamientos de *T. roseum* a partir de plantas cultivadas para flor de corte pertenecientes a los cultivares Exótica, Macarena y Peckowo, con atizonamiento de ramas de 12 a 25 cm de longitud. No se obtuvieron aislamientos de *T. roseum* a partir de los materiales recolectados en las producciones de Hatanaka, Imanishi y Shigenaga.

No se obtuvieron aislamientos de *T. roseum* a partir de los materiales con síntomas de atizonamiento provenientes de los dos cultivos para producción de arbustos de San Pedro.

Pruebas de patogenicidad

A los 7 días de la inoculación se observó un inicio de atizonamiento sobre ambos cultivares inoculados. Desarrollaron canchales a partir de los 14 días.

El cultivar Rafaela, a los 7 días presentaba tallos con atizonamiento de un promedio de 1,7 cm (Figura 23a) llegando a medir 4,4 cm a los 14 días (Figura 23 b), con signo muy evidente a los 25 días (Figura 24). A los 60 días de la inoculación, la mayoría de las ramas se encontraban totalmente atizonadas y sin hojas.

El cultivar Mini Rosal manifestó signo de enfermedad a los 30 días, constituido por abundante moho al comienzo blanquecino y finalmente de color salmón, que en poco tiempo cubrió totalmente los tallos afectados. En ese momento, el tizón afectaba un 90% de las plantas, con defoliación total. Los ejemplares murieron a los 40 días.

La sintomatología observada fue coincidente con la original. Los testigos permanecieron sanos y el reaislamiento mantuvo las características del aislamiento original.

***Alternaria alternata* (aislamiento 3)**

Se obtuvieron aislamientos de *A. alternata* a partir de plantas cultivadas para jardín, en dos viveros. Del vivero Alés se obtuvieron a partir de los cultivares Brasilia y Navidad (síntomas I y IV), Papillón y Moctezuma (síntomas I y IV) y de 2 cultivares de flor amarilla y uno de flor blanca (ambos rosales comunes de San Pedro) con síntoma III. Del vivero Viloch se obtuvieron de los cultivares Norita y Medallón (síntoma I), King Rawson (síntoma II), Carolina de Mónaco (síntoma III), Super Star (síntoma IV) y King Rawson (II y IV). La denominación de los síntomas corresponde a los mencionados en la Tabla 6. No se obtuvieron aislamientos del resto de cultivares y/o síntomas de la Tabla 12. Fue el microorganismo más comunmente aislado en plantas para jardín, ya que el 60% de los atizonamientos observados parecen estar producidos por este patógeno, con lo cual la incidencia fue de aproximadamente de 10% en el vivero Alés y 60% en el vivero Viloch.

En cuanto a cultivos para flor de corte se obtuvieron aislamientos de materiales procedentes del vivero Hatanaka de los cultivares Virginia y Macarena (síntoma A), Rojito 1, Top Secret, Virginia y First Red (B) y Rojito 2 (D), del cultivo Shigenaga de los cultivares Ana, Tennessee y Gran Gala (A), Virginia (C) y First Red y Dallas (D), mientras que del cultivo Barreiros solo de los cultivares Red Velvet y Virginia (A). Los síntomas a que se hace referencia son los indicados en la Tabla 3. En la visita al cultivo Hisaki se observó un 2,1% de plantas de Mini rosal afectadas por este patógeno. No se obtuvieron aislamientos de materiales del cultivo Imanishi, del cultivo Dechima ni del resto de los cultivares y/o síntomas indicados en las Tablas 9 a 11. En el caso de rosales para flor de corte la incidencia de los atizonamientos de tallos ocasionados por *A. alternata* llegó al 10%.

Pruebas de patogenicidad

Los síntomas de atizonamiento de tallos se observaron en todas las plantas inoculadas a partir de los 15 días (Figura 25 a y b). Entre los 45 y 60 días se produjo la muerte de todos los ejemplares inoculados (Figura 25 c y d). No se observaron signos evidentes. La sintomatología fue similar a la original. Los testigos permanecieron sanos. A partir de las plantas sintomáticas se reaisló el patógeno, que presentó las mismas características macro y micromorfológicas del aislamiento original.

Pestalotiopsis guepini (aislamiento 4)

La incidencia de los atizonamientos observada para ***P. guepini*** en el cultivo Dechima el 01/04/02, varió entre el 0 y el 3% según el cultivar considerado. No se encontró presencia del patógeno sobre los cultivares Merlise, Exótica, Confeti, Ana, Rafaela y First Red. Sobre Feria, la incidencia fue del 3% y sobre Gran Gala del 2%. En el cultivo Hisaki se observó un 3,75% de plantas de Mini rosal afectadas por ***P. guepini***. En el vivero Imanishi se obtuvieron aislamientos sobre los cultivares Salvaje (síntoma A) y Exótica (C), mientras que de Barreiros sobre Ana (A) y Vivaldi (B). No se obtuvo ningún aislamiento de los cultivos de Hatanaka y Barreiros. Las letras de los síntomas a que se hace referencia corresponden a los detallados en Tabla 5. No se obtuvieron aislamientos del resto de los cultivares y/o síntomas de los productores indicados en las Tablas 9 a 11. La incidencia promedio alcanzó el 3%.

En cuanto a los cultivos para obtención de plantas en maceta para jardines se obtuvieron aislamientos de este patógeno de materiales procedentes del Vivero Alés de los cultivares Papillón (síntomas I y II) y Moctezuma (II) y del Vivero Viloch de Norita y Prince Margaret (III). A partir de la muestra del cultivar Papillón del vivero Alés de la que se aisló ***P. guepini*** también se obtuvo el aislamiento de ***A. alternata***. Las letras de los síntomas a que se hace referencia corresponden a los detallados en Tabla 6. No se obtuvieron aislamientos del resto de los cultivares y/o síntomas de los productores indicados en la Tabla 12. La incidencia promedio de los atizonamientos de tallos ocasionados por ***P. guepini*** sobre plantas en maceta alcanzó el 3%.

Pruebas de patogenicidad

Sobre las plantas inoculadas con ***P. guepini*** comenzaron a observarse síntomas de atizonamiento de tallos similares a los originales entre los 7 y 8 días de la inoculación (Tablas 16 y 17, Figura 26). Se evidenciaron los signos a los 15 días, observándose puntuaciones negras (Figura 27). No se comprobó una

relación directa entre longitud de la lesión y diámetro de la rama. Todas las plantas manifestaron síntomas pero en ningún ejemplar se verificó la muerte. Tanto rosales comunes de San Pedro como rosales Meilland, manifestaron síntomas de atizonamiento y mostraron similar velocidad de avance de la enfermedad. Los reaslamientos a partir de las plantas inoculadas repitieron las características de los obtenidos inicialmente.

Tabla 16: Resultados de la prueba de patogenicidad de *P. guepini* sobre plantas de vivero para jardines.

a) a 12 días de la inoculación

Rama	Cultivar											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	0,2	0,7	2	0,3	0,5	0,5	0,5	0,6	5	0,9	0,2	0,3
2	0,1	0,15	0,9	0,8	1	0,9	0,5	1,1	2	0,9	0,3	0,3
3	0	0,6	1,2	1,8	-	-	-	-	0,3	0,3	1,5	1,3+

b) a 18 días de la inoculación

Rama	Cultivar											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	0,28	0,7	2,2	0,3	0,5	0,5	0,5	0,6	6	0,9	0,4	0,3
2	1,3	0,15	1	0,8	1,2	0,9	1,1	1,1	2,9	0,9	0,8	0,3
3	0	0,6	1,5	1,8	-	-	-	-	0,6	0,3	1,8	1,3

c) a 25 días de la inoculación

Rama	Cultivar											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	0,32	0,7	2,5	0,3	0,5	0,5	0,6	0,6	7,4	0,9	0,6	0,3
2	1,5	0,15	1	0,8	1,2	0,9	1,2	1,1	3,7	0,9	1	0,3
3	1,3	0,6	1	1,8	-	-	-	-	0,7	0,3	2,1	1,3

d) a 28 días de la inoculación

RAMA	CULTIVAR											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	0,35	0,7	2,8	0,3	0,5	0,5	0,6	0,6	8,4	0,9	0,9	0,3
2	1,8	0,15	1,1	0,8	1,3	0,9	1,3	1,1	3,9	0,9	1,4	0,3
3	1,5	0,6	1,1	1,8	-	-	-	-	0,7	0,3	2,1	1,3

L: longitud de lesión (cm); D: diámetro de la rama (cm)

Cultivares= 1: Black Bacará; 2: Fire King; 3 y 4: Travemonde; 5: King Rawson; 6: Electrón

Tabla 17: Resultados de la prueba de patogenicidad de *P. guelpini* sobre plantas para flor de corte

a) a 10 días de la inoculación

Rama	Cultivar											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	1,2	1,1	0,2	0,8	0,2	0,7	0,3	0,5	0,3	0,3	0,2	0,3
2	0,3	1	0,2	0,4	0	0,4	0,7	0,4	0,2	0,4	3,6	0,3
3	0,1	0,4	0,6	0,3	-	-	-	-	0,6	0,3	0	0,9
4	-	-	0	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-

b) a 20 días de la inoculación

Rama	Cultivar											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	3,4	1,1	0,6	0,8	0,6	0,7	0,7	0,5	0,8	0,3	0,4	0,3
2	0,8	1	0,5	0,4	0	0,4	1,6	0,4	0,6	0,4	7,1	0,3
3	0,3	0,4	2	0,3	-	-	-	-	1,4	0,3	0	0,9
4	-	-	0	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-

L: longitud de lesión (cm); D: diámetro de la rama (cm)

Cultivares= 1: Black Bacará; 2: Fire King; 3 y 4: Travemonde; 5: King Rawson; 6: Electrón

***Fusarium verticillioides* (aislamiento 5)**

Fusarium verticillioides fue aislado solamente del cultivar Ana del cultivo Dechima con una incidencia del 16%, de los cultivares Virginia (síntoma B) y Papillón (A y B) con una incidencia del 2% y del cultivar Dallas de la producción de Shigenaga con 2% de incidencia. Las letras de los síntomas a que se hace referencia corresponden a los detallados en Tabla 5. No se detectó sobre los otros cultivos, cultivares y/o síntomas indicados en las Tablas 7 a 11. En ningún caso se obtuvieron aislamientos de ***Fusarium verticillioides*** a partir de los materiales con síntomas de atizonamiento provenientes de los dos cultivos para producción de flores de San Pedro.

Pruebas de patogenicidad

Sobre las plantas inoculadas comenzaron a observarse síntomas similares a los iniciales en cultivo entre los 7 y 8 días de la inoculación (Fig. 28). El avance de los atizonamientos se muestra la Tabla 17. Se evidenciaron los signos a los 15 días, apreciándose un moho blanquecino con presencia de esporoquios (Fig 29). No se comprobó una relación directa entre longitud de la lesión y diámetro de la rama. Todas las plantas inoculadas manifestaron síntomas, pero en ningún ejemplar se verificó la muerte de ramas, mientras que los testigos permanecieron sanos. Los reaislamientos obtenidos a partir de las plantas inoculadas repitieron las características de los aislamientos iniciales.

Tabla 17: Resultados de la prueba de patogenicidad de *Fusarium verticilloides*. aislado del cultivar Ana.

a) a los 12 días de la inoculación (3/01/04)

Rama	Planta											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	2	0,5	0,2	0,8	0,2	0,4	0	0,3	1	0,4	3,8	0,3
2	0,5	0,8	2	0,6	0,4	0,4	0,2	0,6	0,9	0,4	—	—
3	0	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	2,8	0,4

L: longitud de lesión (cm); D: diámetro de la rama (cm)

b) A los 18 días de la inoculación (9/01/04)

Rama	Planta											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	3	0,5	0,3	0,8	0,3	0,4	0,2	0,3	1,2	0,4	3	0,3
2	0,5	0,8	3,8	0,6	0,5	0,4	0,3	0,6	1	0,4	—	—
3	0,4	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	4,1	0,4

L: longitud de lesión (cm); D: diámetro de la rama (cm)

c) A los 25 días de la inoculación (16/01/04)

Rama	Planta											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	4	0,5	0,6	0,8	0,4	0,4	0,4	0,3	1,4	0,4	4,4	0,3
2	0,6	0,8	4	0,6	0,6	0,4	0,4	0,6	1,2	0,4	—	—
3	0,6	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	4,5	0,4

L: longitud de lesión (cm); D: diámetro de la rama (cm)

d) a los 28 días de la inoculación (19/01/04)

Rama	Planta											
	1		2		3		4		5		6	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1	4,5	0,5	0,7	0,8	0,5	0,4	0,4	0,3	1,4	0,4	4,5	0,3
2	0,8	0,8	4,5	0,6	0,6	0,4	0,4	0,6	1,2	0,4	—	—
3	0,8	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	4,5	0,4

L longitud de lesión (cm); D diámetro de la rama (cm)

Phomopsis sp. (aislamiento 6)

En cuanto a los cultivos para flor de corte se obtuvieron aislamientos de **Phomopsis** sp. en el cultivo Dechima sobre el cultivar Merlise (incidencia del 4%), sobre Exótica (2%) y sobre Gran Gala (1,5%). No se detectó **Phomopsis** sp. sobre plantas de Mini rosal del cultivo Hisaki. Se obtuvieron aislamientos de este patógeno a partir de los materiales de la plantación de Hakanata de los cultivares Bell Rouge (síntoma D), Papillón (C), de Imanishi de los cultivares Rojito 1 (B), Virginia y Macarena (C) y First Red (D) y de Barreiros cultivares Virginia y Rafaella (B). Las letras de los síntomas a que se hace referencia corresponden a los detallados en Tabla 5. No se obtuvieron aislamientos del resto de los cultivares y/o síntomas de los productores indicados en las Tablas 9 a 11.

En cuanto a los rosales para jardines se obtuvieron aislamientos a partir de los cultivares Rojo, Rojo fuerte y Matizado (síntoma III) del vivero Alés y de Super Star (III) y King Rawson y Bagazo común (IV) del vivero Viloch con una incidencia del 3%. A partir de la muestra del cultivar King Rawson del vivero Viloch de la que se aisló **Phomopsis** sp. también se obtuvo el aislamiento de **A. alternata**. No se obtuvieron aislamientos de del resto de los cultivares y/o síntomas de los productores indicados en la Tabla 12.

Pruebas de patogenicidad

Los síntomas de atizonamiento de tallos sobre las plantas inoculadas con **Phomopsis** sp. comenzaron a observarse a los 15 días de la inoculación (Fig. 30). La Tabla 18 resume el avance del atizonamiento a partir de los 23 días. La planta 2 se atizonó totalmente a los 52 días y a los 70 días todas las plantas habían muerto. Los aislamientos a partir de las plantas inoculadas repitieron las características de los obtenidos inicialmente.

Tabla 18: Resultados de la prueba de patogenicidad de *Phomopsis*. sp. sobre plantas de jardín

a) a 23 días de la inoculación

Rama	Cultivar				
	1	2	3	4	5
1	0.9	0.5	5.0	4.5	3.5
2	2.9	7.0	0.5	7.5	3.5
3	3.5	4.0	0.0	7.0	1.0
4	2.7	-	-	6.0	-

b) a 30 días de la inoculación

Rama	Cultivar				
	1	2	3	4	5
1	1.2	0.5	5.5	4.5	4.0
2	3.0	10+	0.5	10.5+	6.0+
3	4.0	4.0	0.2	12.0	1.3
4	4.0	-	-	7.5	-

c) a 38 días de la inoculación

Rama	Cultivar				
	1	2	3	4	5
1	1.5	0.5	6.5	8.0	13.0
2	3.0	10+	0.5	10.5+	6.0+
3	5.0	4.0	0.5	15.5+	2.0
4	5.3	-	-	10+	-

d) a 44 días de la inoculación

Rama	Cultivar				
	1	2	3	4	5
1	2.5	2.0	6.5	8.5	13.0
2	3.5	10.0+	0.5	10.5+	6.0+
3	5.0	7.0+	1.2	10.5+	2.0
4	6.0	-	-	10.0+	-

+: toda la rama

Cultivares 1 y 2: Dinastie; 3 y 4: Crimson; 5: Fuschia

2.6. DISCUSIÓN

El atizonamiento de los tallos del rosal en Argentina es ocasionado por diversos hongos, que pueden actuar solos o eventualmente, acompañados. Se determinó como agentes causales a *Botrytis cinerea*, *Trichothecium roseum*, *Alternaria alternata*, *Pestalotiopsis guepini*, *Fusarium verticillioides* y *Phomopsis* sp. En la mayoría de los casos se aisló solo un microorganismo por lesión, pero en dos casos, en un cultivo para producción de plantas para ornamentación de jardines, se detectó la presencia conjunta de más de un patógeno, *A. alternata* asociado a *P. guepini* o a *Phomopsis* sp. De los patógenos citados previamente en bibliografía Argentina se detectó la presencia de *B. cinerea*, mientras que nunca se aisló *Coniothyrium fuckellii*. Los otros patógenos no fueron citados previamente en nuestro país.

La incidencia del atizonamiento fue muy elevada en la mayoría de los cultivos analizados, con un promedio del 70% en cultivos para flor de corte y del 55% en plantas para ornamentación de jardines. Las diferencias encontradas en cuanto a incidencia total, especie del patógeno e incidencia en los dos grupos muestrados podría deberse a las siguientes causas: a) diferente material genético, b) diferentes condiciones ambientales y c) diferentes prácticas de manejo. Se observó una relación directa entre la incidencia de la enfermedad y el manejo del cultivo.

En las plantaciones para la producción de flores, los atizonamientos pueden conducir esporádicamente a la muerte de la planta. La mayor incidencia se registró para *Botrytis cinerea* y, en segundo lugar, para *Trichothecium roseum* y *A. alternata*. También participan en el grupo de patógenos *P. guepini* y *Phomopsis* sp. con incidencias más bajas. Plantas sobre las que se utilizaba la técnica del agobio presentaban una menor incidencia y el desarrollo de un corto atizonamiento, el que nunca avanza más allá de los 5 cm. (Tabla 4). De las mismas se obtuvieron únicamente aislamientos de *A. alternata* y *Phomopsis* sp. En cambio, en plantas sin agobio, el tizón podía llegar a matar la rama (Tabla 4) y se obtuvieron aislamientos de todos los patógenos involucrados.

Cuando la incidencia en las producciones para flor de corte fue muy alta, coincidió con estructura de invernáculos con problemas de ventilación y/o manejo del cultivo inadecuado (podas, la no eliminación de los restos de poda dentro y fuera de los invernáculos, la presencia de malezas e insectos, etc.), como es el caso del productor Shigenaga de Libertad (Tabla 3), con una incidencia de hasta el 90% y del Sr. Imanishi de Colonia Urquiza, con 92 al 98% de incidencia. En cambio, el productor Hatanaka de Colonia Urquiza que posee un cultivo de tipo empresarial con una gran cantidad de empleados presentó valores de incidencia de entre el 50 y el 100%, dependiendo del manejo que realizaba el encargado. Además, los invernáculos con menor incidencia presentaban una longitud menor de atizonamiento. En la producción de Barreiros de Villa Rosa, si bien la incidencia del atizonamiento inicialmente fue del 90%, recorridas posteriores permitieron observar una marcada disminución del mismo a partir de las medidas de manejo (poda de tallos afectados, quema de los restos de la poda, aplicación de fungicidas). Las producciones de Escobar (Dechima e Hisaki) presentaban algunos problemas de infraestructura, pero lograron disminuir la incidencia de la enfermedad aplicando las recomendaciones realizadas.

En las muestras de producciones comerciales de rosales para su utilización como arbusto ornamental se observaron atizonamientos en tallos que podían conducir a la muerte de la planta, en un porcentaje del 40%, mayor que para el caso de flor de corte. Del grupo de hongos que provoca la enfermedad se destaca *Alternaria alternata* como el patógeno con la mayor incidencia, afectando a todos los cultivares denominados vulgarmente “rosal común de San Pedro”. En esta producción de rosales los otros patógenos involucrados son *Pestalotiopsis guepini* y *Phomopsis* sp. La sintomatología asociada a estos patógenos es muy variable, dependiendo del grado de avance de la enfermedad, época del año, cultivar y, en algunos casos, la presencia conjunta de más de un patógeno, como *A. alternata* asociado a *P. guepini* o *Phomopsis* sp. No se detectó la presencia de *Botrytis cinerea*, *Trichothecium roseum* ni *Fusarium* spp. , que son los agentes más importantes del atizonamiento en flor de corte.

A pesar de no haber sido aislado de ejemplares para jardines, cultivares de rosal comúnmente utilizados con ese propósito son susceptibles a ***B. cinerea***. Por ejemplo, los cultivares para jardín Electrón y King Rawson manifestaron los síntomas de atizonamiento cuando fueron inoculados artificialmente durante las pruebas de patogenicidad. Las observaciones discrepan con Horst (1983), quien considera que los daños en cultivos en invernáculo pueden ser similares a los presentes en cultivos al exterior. Yohalem y Kristensen (2004) mencionan el ataque de ***B. cinerea*** en rosales enmacetados en la etapa de plantación de los esquejes en turba, cuando las condiciones son de 100% de humedad relativa durante 2 semanas, pudiendo producir su necrosis.

Las condiciones ambientales de los cultivos, como los lotes bajos y encharcados, sustratos pesados y la falta de podas y manejos sanitarios adecuados podrían influir en la manifestación de la enfermedad en las plantas para ornamentación de jardines. En los viveros Alés y Viloch se observaron síntomas similares, pero la incidencia de la enfermedad fue muy diferente, correspondiendo al primero valores entre 15 y 20% y al segundo entre 85 y 100%. En el vivero Viloch se observaron condiciones que pueden predisponer a un mayor ataque de los patógenos (Tabla 4). En cambio, en el vivero Alés, con una menor incidencia, se observaron mejores estructuras y manejo.

B. cinerea es un patógeno polífago. Ha sido citado en nuestro país como patógeno en las siguientes especies ornamentales: ***Dahlia*** spp., ***Dianthus caryophyllus***, ***Rosa*** sp. y ***Tulipa*** sp. (Fernandez Valiela, 1978a), ***Eustoma grandiflorum*** (Wolcan et al., 1996) ***Aechmea fasciata***, ***Begonia tuberhybrida***, ***Cyclamen persicum***, ***Saintpaulia ionantha*** (Palmucci et al., 1997), ***Anemone coronaria***, ***Chrysantemum*** sp., ***Gerbera jamesonii***, ***Gladiolus*** sp., ***Godetia*** sp., ***Limonium*** sp., ***Strelitzia reginae***, ***Tagetes*** sp. (Wright, et al., 1996), ***Primula obconica***, ***P. malacoides***, ***P. polyantha*** (Rivera et al., 1999), ***Hibiscus rosa-sinensis*** (Rivera y Wright, 2002), ***Viola x wittrockinana*** (Rivera y Lopez, 2004), ***Hydrangea macrophylla*** (Rivera et al., 2004), ***Euphorbia pulcherrima*** (Palmucci y Grijalba, 2005), ***Zantedeschia aethiopica*** (Rivera y Lopez, 2006), ***Pelargonium inquinans*** y ***P. peltatum*** (Palmucci y Wright, 2006).

Requiere alta humedad relativa (mayor al 93%) y agua libre en el sitio de infección para invadir los tejidos vegetales. Estas condiciones son comunes en la mayoría de los invernáculos (Hausebeck y Moorman, 1996). Ello podría explicar la alta incidencia registrada para la enfermedad en cultivos destinados a la obtención de flores, en todos los casos conducidos bajo invernáculo.

La sintomatología observada en las ramas coincide con la descrita por Horst (1983), las plantas llegan a morir por el atizonamiento de los tallos como se registró en el presente trabajo. Otros autores (Hammer et al., 1990; Hammer et al., 1993; Hammer y Evensen, 1994; Williamson et al., 1995; Meir et al., 1998) mencionan sólo los daños en flores, pre y poscosecha. En Israel en invierno se pierde al menos el 20% de las flores de rosal antes de la exportación por ataques de *B. cinerea* (Grinstein et al., 1997). La infección induce pequeñas lesiones sobre los pétalos (Pie y DeLeeuw, 1991) y ocurren infecciones latentes que no son visibles a la cosecha pero desarrollan cuando las flores maduran o cuando prevalece una alta humedad (Elad et al., 1993) No se encontró ninguna referencia acerca de la coloración de las manchas en los pétalos.

En Estados Unidos *Trichothecium roseum* fue mencionado sobre rosal por Sweets et al. (1982) al realizar ensayos de control de atizonamientos. Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas por dichos autores sobre los cultivares Belinda y Golden Fantasy, que manifestaron respectivamente un atizonamiento que no alcanza el tallo principal y uno más extendido que en algunos casos ocasiona la muerte de la planta. *T. roseum* es generalmente encontrado como saprófito sobre tejido vegetal senescente, como parásito secundario sobre frutos de manzano y también ha sido aislado del suelo (Rifai y Cooke, 1966). Es un hongo ubicuo, saprófito, común en semillas, que puede actuar como patógeno débil, frecuentemente causando pudriciones en manzanas en almacenamiento y algunas veces produciendo pudriciones en semillas de especies forestales y de *Zinnia elegans* (Neergard, 1979). Fue aislado de semillas de lenteja (*Lens culinaris*) almacenadas durante 9 años, sobre las cuales produjo retardo y disminución en el porcentaje de germinación (Simay,

1991). *Trichothecium* sp. (probablemente *T. roseum*) puede aparecer como contaminante sobre lesiones en seres humanos (Neergard, 1979). *T. roseum* se probó como biocontrolador de la podredumbre morena del duraznero ocasionada por *Monilinia fructicola*, brindando un eficiente control de la enfermedad en floración (Moreira, 2005).

Constituye ésta la primera referencia acerca de *T. roseum* como patógeno de rosal en la Argentina (Wright et al., 2002a; 2007).

Alternaria alternata es el principal agente causal del atizonamiento observado en cultivos para jardines. *A. alternata* ha sido mencionado en la India como causante de un “dieback” que produjo severos daños sobre un cultivar de *Rosa damascena*, con una incidencia de entre 5 al 30% (Bhatnagar y Mathur, 1987). *A. alternata* produce pudrición de esquejes de rosal en enraizamiento (Ypema et al., 1987). Horst (1983) cita a *A. alternata* y *Alternaria* spp. como patógenos que causan manchas foliares durante períodos lluviosos y, si las condiciones húmedas persisten, puede infectar botones florales y flores. *A. alternata* ha sido mencionado como agente causal de atizonamiento de hojas de rosal (Bedi y Singh, 1972; Sahni, 1973; Sezgin et al., 1973). *Alternaria* sp. ha sido citado en distintas localidades de Venezuela y bajo distintas condiciones climáticas produciendo síntomas en hojas, tallos y flores (Vargas et al., 1989). *A. circinans* (*A. brassicicola*) fue citado en Colombia produciendo manchas foliares (Lopez y Granada, 1998). Sweets et al. (1992) obtuvieron aislamientos de *A. alternata* a partir de plantas atizonadas en cultivos comerciales bajo cubierta. Sin embargo, al realizar las pruebas de patogenicidad observaron un atizonamiento de sólo 2 mm de longitud, a partir del cual no pudieron aislar el microorganismo.

A. alternata es la especie del género *Alternaria* más frecuentemente citada en la literatura. Incluye saprófitos, parásitos de las plantas y, ocasionalmente, de animales y seres humanos. En la mayoría de los casos aparece como un patógeno oportunista atacando tejidos senescentes o plantas muy estresadas. En otros casos puede ser patógeno de plantas creciendo en

forma vigorosa. El hospedante más común es el tabaco, seguido de un grupo entre los que se encuentran banana, cebada, clavel, zanahoria, cebolla, maní, rosal, soja y girasol. Es además el patógeno más frecuente en frutos almacenados. Se mencionan infecciones latentes sobre cártamo, tabaco y frutos de tomate y mango entre otros (Rotem, 1994).

La penetración se produjo por heridas en coincidencia con Rotem (1994) que afirma que la penetración de *A. alternata* en distintos hospedantes se produce a través de heridas o por las flores (Rotem, 1994). En el presente estudio se observaron infecciones latentes por *Alternaria alternata* sobre tallos de rosal, ya que pruebas de patogenicidad para dos de los patógenos debieron ser repetidas por haberse atizonado los testigos supuestamente sanos y sobre ellos se detectó la presencia de este hongo.

Constituye ésta la primera referencia acerca de *Alternaria alternata* afectando cultivos de rosal en la Argentina (Pizzigrilli et al., 2003).

Pestalotiopsis guepinii se presentó con baja incidencia, tanto en rosales para flor de corte como para ornamentación de jardines. No se observó la muerte de ramas en cultivo ni como consecuencia de las pruebas de patogenicidad.

Pestalotia sp. ha sido citado en distintas localidades de Venezuela y bajo distintas condiciones climáticas produciendo síntomas en hojas y flores de rosal (Vargas et al., 1989). *Pestalotiopsis versicolor* ha sido mencionado produciendo manchas foliares sobre *Rosa alba*, que comenzaban desde el borde de las hojas (Jamaluddin y Tandom, 1996). *P. adusta* fue citado en la India como productor de manchas foliares (Rai, 1985), *P. populi-nigrae* ha sido mencionado produciendo atizonamientos de tallos en rosal (Kimishina et al., 1996) y *Pestalotia longisetula* sobre tallos (Matta et al., 1976).

Pestalotiopsis guepini no ha sido citado hasta el momento como patógeno del rosal en nuestro país, por lo cual se trataría de la primera cita.

Fusarium oxysporum fue aislado exclusivamente de cultivos para flor de corte, con una baja incidencia, excepto sobre un cultivar (llegando al 16%). No se observó la muerte de ramas en cultivo ni como consecuencia de las pruebas de patogenicidad.

Farr et al. (1989) mencionan la presencia de ***F. oxysporum*** y ***Fusarium*** sp. como agentes de pudriciones de raíces y tallos, mientras que en Argentina Gamboa (1982) determinó a ***F. oxysporum*** como agente causal de un marchitamiento en rosal. ***Fusarium redolens*** (***F. oxysporum*** var. ***redolens***) y ***F. solani*** fueron citados como agentes causales de marchitamiento sobre rosal en Colombia (Lopez y Granada, 1998) y en India (Shukla y Chowdhry., 1988). ***F. oxysporum***, ***F. redolens*** y ***F. solani*** producen pudrición de esquejes de rosal en enraizamiento (Ypema et al., 1987). ***F. oxysporum*** produjo en Venezuela una pudrición seca de tallos (Vargas et al., 1989).

No se encontraron referencias acerca de ***Fusarium verticillioides*** parasitando ejemplares de ***Rosa*** sp. en bibliografía nacional ni internacional, por lo que se trataría de la primera cita de este organismo en rosal.

Phomopsis sp. se presentó con baja incidencia, tanto en cultivos para producción de flores como para ornamentación de jardines. No se observó muerte de ramas en cultivos para flores: En cultivos para ornamentación de jardines produjo muerte de ramas y aún de la planta. Las plantas inoculadas artificialmente a través de las pruebas de patogenicidad murieron en su totalidad.

Garibaldi y Gullino (1973) y Cristinzio et al. (1973) mencionan a ***Phomopsis*** sp. como agente causal de canchros en tallos en Italia. Pitta y Teranishi (1973) encuentran en Brasil asociación entre la desecación de tallos de rosal y la presencia de ***Phomopsis*** sp. y ***Botryodiplodia*** sp. A partir de síntomas de atizonamiento de tallos de rosal que comenzaban a partir de heridas de la poda y que afectaban gran parte de los mismos, Grasso y La Rosa (1982) aislan ***Phomopsis incarcerata*** y ***Cytospora rosarum***, pero sólo el primero de ellos reprodujo los síntomas. ***Phomopsis mali*** es citado como un patógeno importante

en el Reino Unido (Rowell, 1990). *P. gulabia* causa una severa defoliación en rosal en la India (Lal y Arya, 1981). *Phomopsis* sp. fue aislado de hojas y flores de rosal en Venezuela (Vargas et al., 1989).

Constituye esta la primera referencia acerca de la presencia de *Phomopsis* sp. como patógeno de cultivos de rosal en la Argentina (Wright et al., 2006).

Entre las prácticas de cultivo y las condiciones ambientales que podrían haber favorecido la alta incidencia de atizonamientos observados en las producciones de rosas se encuentran a) alta humedad relativa ambiente en algunos invernáculos, b) falta de experiencia y capacitación de encargados, c) permanencia de tallos atizonados sin realizar podas de limpieza, d) residuos de corte que no se eliminan de los invernáculos, e) falta de desinfección de herramientas, f) uso inadecuado de fungicidas, reiterando aplicaciones de productos (que en algunos casos ni siquiera son los adecuados) que podrían generar fenómenos de resistencia, g) uso de materiales vegetales de origen incierto. La edad de las plantas no parecería tener influencia en la manifestación de los síntomas, ya que plantas de un mismo cultivar de menos de un año y de 2 a 3 años presentaron valores de incidencia similares.

Como resultado de las pruebas de patogenicidad se observó que *P. guepini* y *F. verticillioides* no produjeron la muerte de la planta, la que sí fue producida por *B. cinerea*, *T. roseum*, *A. alternata* y *Phomopsis* sp.

No existe una sintomatología específica que pueda asociarse en forma directa a cada microorganismo aislado. Sólo puede determinarse la etiología a simple vista cuando los signos son bien visibles y fáciles de identificar, como ocurre en general con *B. cinerea* y *T. roseum*. En otros casos se deben realizar estudios de laboratorio, como confección de cámaras húmedas o aislamiento de los organismos involucrados. Si bien las pérdidas ocasionadas son importantes, en general los productores de rosales para flor de corte no le dan la importancia que tiene la enfermedad en relación a otras más tradicionales como el oídio, el

mildiu, la roya o la mancha negra. En cambio, en las producciones para su uso como arbusto ornamental, los productores mostraron una más clara conciencia del problema.

2.7. CONCLUSIONES

- La enfermedad aparece a partir de las ramas heridas por la poda o por el corte para la cosecha de flores.
- La incidencia del atizonamiento fue muy elevada en la mayoría de los cultivos analizados, con un promedio del 70% en cultivos para flor de corte y del 55% en plantas para ornamentación de jardines
- En las plantaciones para la producción de flores, los atizonamientos pueden conducir esporádicamente a la muerte de la planta, mientras que en rosales para su utilización como arbusto ornamental se produjo un 40% de muerte de plantas.
- El atizonamiento de los tallos del rosal es ocasionado por un complejo de hongos que incluye a *Botrytis cinerea*, *Trichothecium roseum*, *Alternaria alternata*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Fusarium verticillioides*. y *Phomopsis* sp. Constituye esta la primera referencia acerca de la presencia de *Trichothecium roseum*, *Alternaria alternata*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Fusarium verticillioides*. y *Phomopsis* sp. como agentes causales de enfermedades del rosal en la Argentina.
- Los muestreos realizados permiten afirmar que *B. cinerea* es el patógeno que presenta una mayor incidencia en rosales para flor de corte , seguido por *T. roseum*.
- *B. cinerea* es el único patógeno que afecta otros órganos de la planta, produciendo síntomas de atizonamientos sobre flores, pimpollos y pedúnculos florales.
- *A. alternata* es el patógeno que presenta una mayor incidencia en cultivos para jardines, en tanto que *T. roseum* fue aislado solamente de cultivos para producción de flores. Constituye esta la primera cita de *Fusarium verticillioides* como patógeno de rosal..
- No existe una sintomatología específica asociada a cada patógeno.
- En casos aislados se encontró a *A. alternata* asociado a *P. guepini* o *Phomopsis* sp.

- Bajo la técnica del agobio la incidencia del atizonamiento fue menor y su avance restringido a 5 cm, obteniéndose solo aislamientos de ***A. alternata*** y ***Phomopsis*** sp. En cambio, sin agobio se obtuvieron aislamientos de todos los patógenos estudiados y el atizonamiento avanzaba llegando a matar la planta en casos aislados.
- La incidencia de la enfermedad está estrechamente relacionada el manejo del cultivo.

3. CONTROL BIOLÓGICO DE

Botrytis cinerea

3.1. INTRODUCCIÓN

Botryotinia y **Botrytis** están entre los géneros fitopatógenos y saprófitos más ubicuos, afectando principalmente vides, frutas finas, hortícolas, bulbosas, plántulas y cultivos bajo cubierta (Jarvis, 1977). En general, cuanto más intensivo es un cultivo, más expuesto está a la infección por **B. cinerea** cuando las condiciones ambientales son favorables para la enfermedad (Rosslénbroich y Stuebler, 2000)

La mayoría de las especies de **Botrytis** secretan toxinas y enzimas, particularmente pécticas, que degradan la pared celular. La célula hospedante muere y la hifa avanza por los tejidos moribundos y muertos. Los extremos hifales están a cierta distancia de sus enzimas y toxinas. De esta manera el hongo sigue construyendo un ambiente saprofito para la colonización y esporulación. En el caso de **B. cinerea** el proceso de degradación continúa sobre los tejidos muertos (Jarvis, 1977). Es un hongo polífago, necrotrófico. En general se comporta como parásito oportunista, limitándose a colonizar órganos debilitados, aunque adquiere importancia cuando las condiciones ambientales son favorables (Alpi y Tognoni, 1991). El estado nutricional de la planta, deficiencias de nitrógeno, fósforo, potasio o magnesio y excesos de nitrógeno, aumentan la incidencia de **Botrytis** spp. El calcio en cantidades adecuadas confiere resistencia, probablemente por su efecto sobre la estructura de las paredes celulares (Jarvis, 1977).

Se ha observado penetración por estomas en hojas de haba (Louis, 1963, citado por Jarvis 1977), hojas de gladiolo (Bald, 1952) y ciruelas y pelones (Fourie y Holz, 1995). Se ha verificado la penetración directa de **B. cinerea** en hojas y flores de cyclamen (Palmucci et al., 1997), en hojas de liliom (Ikata y Hitomi, 1933, citados por Jarvis, 1977), pétalos de almendro (Ogawa y English, 1969), frutos de tomate (Verhoeff, 1970), hojas de haba (Mc Keen, 1974), flores de pepino (Elad, 1988b), rosas (Pie y De Leeuw, 1991) y uvas (Coertze y Holz, 2001). Rivera (2005) sugiere una tendencia a la penetración por heridas sobre discos de hojas de cyclamen.

En muchas enfermedades causadas por ***B. cinerea*** los conidios sirven como inóculo inicial, en invernáculos pueden originarse en fuentes del interior y exterior de los mismos (Kerssies, 1993, citado por Hausbeck y Moorman, 1996). La prevalencia y sobrevivencia de los esclerocios en el invernáculo son desconocidos (Hausbeck y Moorman, 1996), y por lo tanto la importancia de estas estructuras como inóculo.

Estrategias para el control de de *Botrytis cinerea*

Los cultivos florales bajo cubierta están constantemente amenazados por esta especie. Si bien existe un amplio conocimiento acerca de la biología general del hongo, el moho gris continúa causando pérdidas significativas en todas las etapas de la producción florícola (Hausbeck y Moorman, 1996).

Algunas de las razones que explican la dificultad para el control de ***B. cinerea*** son: a) es un patógeno sumamente polífago, b) tiene una alta capacidad saprofítica, c) es común la aparición de fenómenos de resistencia a los fungicidas, d) el ambiente con alta humedad relativa y agua libre del invernáculo favorece el rápido desarrollo y la esporulación prolífica, e) esporula rápidamente sobre tejidos enfermos y senescentes y f) algunos cultivos y partes de plantas son altamente susceptibles. La acción mecánica asociada con la cosecha y transporte de las flores y las gotas de agua provenientes del riego o de la aplicación de pesticidas, liberan y dispersan conidios en el ambiente del invernáculo (Hausbeck y Moorman, 1996). Es una especie altamente heterogénea y variable genéticamente (Alfonso et al., 2000, Calpas et al., 2006), capaz de adaptarse a muchas condiciones ambientales y que produce infecciones asintomáticas (Hausebeck y Moorman. 1996).

El control debe enmarcarse entonces en un esquema de manejo integrado, que combine estrategias culturales, químicas, genéticas y biológicas. Para la FAO (2006), el manejo integrado de plagas (MIP) es la cuidadosa consideración de todas las técnicas disponibles para combatir las plagas y la posterior integración

de medidas apropiadas que disminuyan el desarrollo de las poblaciones de plagas y mantengan el empleo de biocidas a niveles económicamente justificados. Por otra parte reducen al mínimo los riesgos para la salud humana y el ambiente. La FAO (2007) considera plaga a cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales. En el MIP la integración de métodos de lucha contra plagas debe adaptarse a las condiciones agroecológicas y socioeconómicas de cada situación específica (FAO, 2006).

Medidas culturales:

Saneamiento: Los restos de plantas infectadas deben eliminarse para reducir las fuentes de inóculo. El saneamiento como único método es insuficiente para controlar al hongo, a causa de la dispersión y el rápido aumento de la concentración de inóculo a través de varios ciclos de esporulación (Plaut y Berger, 1981).

Manejo de las condiciones ambientales: Se debe reducir la humedad relativa dentro del invernáculo a través de un buen flujo de aire en el cultivo (Hausbeck y Pennypacker, 1996). En cultivos de frutilla se observó una reducción de la pudrición de los frutos con un mayor espaciamiento entre plantas (Legard et al., 2000).

Medidas químicas:

La aplicación de fungicidas brinda protección pero no compensa el mal manejo del ambiente o pobres prácticas de saneamiento, especialmente si la presión de la enfermedad es alta. Los fungicidas generalmente se aplican solos, aunque las mezclas de dos o más de ellos proveen mayor protección y son más efectivas. Aunque hay numerosas marcas comerciales disponibles para el control de ***Botrytis***, existen actualmente pocos modos de acción. La resistencia de ***B. cinerea*** a los fungicidas limita severamente las opciones de control químico (Hausbeck y Moorman, 1996). Se entiende por modo de acción al modo en que

acruan los fitoterápicos, pudiendo ser de protección superficial o externa, con poder erradicante o acción retroactiva, de acción sistémica o interna, o episistémicos o mesosistémicos (Pérez, 2004). El primer caso documentado de la resistencia de una población del hongo a benomyl fue en cyclamen en un invernáculo (Bollen y Scholten, 1971, citados por Hausbeck y Moorman, 1996).

Al comienzo del control químico de **Botrytis** se utilizaban exclusivamente fungicidas del grupo de los Benzimidazoles, pero debido a su uso repetido y continuo, se desarrollaron fenómenos de resistencia en varias regiones del mundo, lo que llevó a utilizar otro tipo de fungicidas que no presentaran estos problemas, las dicarboximidias, las que posteriormente también presentaron fenómenos de resistencia (Auger y Esterio, 1997). Montealegre y Vásquez (1995) y Raposo et al. (1996) encuentran aislamientos de **B. cinerea** con resistencia múltiple a fungicidas. El nivel de resistencia de **B. cinerea** a benzimidazoles y dicarboximidias se ha incrementado en los últimos años (Montealegre y Vásquez, 1995)

Las estrategias para prevenir o retardar la resistencia a los fungicidas son: a) reducir el número de aplicaciones, para disminuir la presión de selección, recurriendo al control químico solo en los períodos y condiciones ambientales más favorables para el ataque del hongo, b) alternancia de la secuencia de aplicaciones, cuando están disponibles sustancias de igual efectividad y modo de acción, y c) mediante la aplicación de prácticas culturales para reducir la intensidad de la enfermedad, disminuyendo la presión de selección (Auger y Esterio, 1997). Con el descubrimiento de nuevos ingredientes activos, junto con los compuestos más antiguos, se pueden implementar estrategias de manejo efectivas contra la resistencia de **B. cinerea** a fungicidas (Rosslénbroich y Stuebler, 2000).

Medidas genéticas:

La variabilidad genética del patógeno, la producción de infecciones asintomáticas y las interacciones con el ambiente hacen complicada la búsqueda

de resistencia (Hausbeck y Moorman, 1996). No se disponen de cultivares resistentes a *B. cinerea* en ninguna especie (Elad y Shtienberg, 1995). No existe una resistencia efectiva contra ***B. cinerea*** en cultivares de rosal (Pic y Brouwer, 1993). Sin embargo, Hammer y Evensen (1994) encuentran diferencias en susceptibilidad al tizón de flores entre dos cultivares de rosal, detectando una relación entre la respuesta a la infección y el grosor de la cutícula de las flores. Se encontró resistencia a la botrytis del tallo en ***Rubus pileatus***, la que pudo ser transferida a frambueso (Jennings y Brydon, 1989). Lavy-Meir et al. (1989) encontraron supresión de la elongación del tubo germinativo de ***B. cinerea***, prolongación del período de incubación necesario para la infección y reducción de la incidencia de podredumbre en frutos de tomate de mutantes durante el almacenamiento.

Las defensas naturales que protegen a la planta de ***B. cinerea*** son muchas y diversas, las que pueden ser fortalecidas por prácticas culturales y manejo del ambiente de pre y poscosecha. Se ha observado variación genética en la resistencia a ***B. cinerea*** dentro de las especies, pero no se ha identificado resistencia gen a gen. El retraso de la senescencia confiere resistencia. La cutícula y la pared celular del hospedante pueden ser barreras para el desarrollo del patógeno (Elad y Evensen, 1995).

Rivera (2005) encuentra una alta variación en la respuesta a la inoculación del patógeno entre cultivares y órganos de ***Cyclamen persicum***. El cv. Nacional presentó la mayor susceptibilidad, mientras que los tejidos florales presentaron una mayor susceptibilidad a la infección y un menor período de incubación respecto de los foliares.

Control biológico de enfermedades de las plantas

Durante los últimos años y ante una mayor demanda de alimentos, la agricultura moderna intensificó todos los factores productivos en busca de aumentar la producción. Los logros obtenidos fueron excelentes, pero estuvieron

basados en un mayor gasto de energía y en la incorporación de nuevas tierras. (Cook y Baker, 1983). Como alternativa al control tradicional, y como complemento de técnicas de cultivo, se encuentra el control biológico (Mariano y Michereff, 1994; Sutton, 1994). Muchos tratamientos por aplicación de fungicidas son temporarios en su efecto, requiriendo aplicaciones repetidas. El control biológico, cuando es efectivo, generalmente es más duradero (Baker y Cook, 1974). Virtualmente todas las enfermedades están expuestas naturalmente al control biológico por efecto de microorganismos presentes en el ambiente (Gasoni et al., 2004). El control biológico de fitopatógenos es fundamentalmente una cuestión de manejo ecológico de una comunidad de organismos (Van Driesche y Bellows, 1996).

Baker y Cook (1974) definieron al control biológico como la “reducción de la densidad de inóculo, o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o de dormición, por uno o más organismos, conseguido naturalmente o a través de la manipulación de ambiente, hospedante o antagonista, o por la introducción de uno o más antagonistas”. Posteriormente, resumen la definición de control biológico como “la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad de un patógeno, para causar una enfermedad, llevada a cabo a través de uno o más organismos diferentes del hombre” (Baker y Cook, 1983). La Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (1987, citado por Monte Vásquez et al., 2005) lo define como “la utilización de organismos naturales o modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables, y para favorecer organismos útiles para el hombre, tales como cultivos, árboles, animales y microorganismos beneficiosos”.

El control biológico rara vez elimina a un patógeno, pero reduce su número o habilidad para producir enfermedad. Este control puede obtenerse con poca o ninguna reducción en la población del patógeno o tal vez sin prevenir infección (Baker y Cook, 1974). El control biológico presenta las siguientes características: a) No elimina la enfermedad, b) Mantiene al patógeno dentro del equilibrio natural, c) Cada relación planta-patógeno es absolutamente única, por lo cual las posibilidades del control biológico son ilimitadas, d) Si se realiza adecuadamente,

apenas tiene efectos colaterales, e) Los agentes de biocontrol se seleccionan en sistemas autoequilibrados y con alta especificidad respecto al hospedador, f) No proporciona beneficios inmediatos, pero puede ser duradero, g) Es barato e inocuo para la vida en general y se ajusta a diferentes tipos de agricultura, h) Un agente de control biológico (ACB) puede desplegar más de un mecanismo de control cuya importancia relativa dependerá de las condiciones ambientales existentes (Monte Vásquez et al., 2005).

Se pueden enumerar como ventajas del control biológico: a) Los ACB suelen ser compatibles con otras formas de control, b) Es muy barato y puede autoperpetuarse, c) No elimina los organismos que ayudan a mantener al patógeno controlado, d) No tiene efectos dañinos para el hombre, otros cultivos, árboles, animales, vida silvestre y otros organismos beneficiosos, e) No se han descrito resistencias a los ACB, f) Resulta ambientalmente seguro, debido a que no se acumulan en la cadena alimentaria, g) Es efectivo en ambientes naturales y artificiales. Como desventajas se pueden mencionar: a) No existe un ACB universal, b) No tiene éxito si no se tiene en cuenta que la población del patógeno varía en función del hospedante, sus enemigos naturales y el ambiente. c) Las empresas fitoquímicas se resisten a modificar sus sistemas de producción, mientras la opinión pública no se lo demande (Monte Vásquez et al., 2005).

El control biológico puede ser realizado mediante: a) Explotación del control natural, en aquellos casos en que se pueda disponer de un suelo supresivo, b) Introducción masiva de agentes de biocontrol y c) Manipulación del ambiente, en beneficio de aquellos posibles antagonistas presentes en el ecosistema, que pudieran controlar la interacción del patógeno con su hospedador (Monte Vásquez et al., 2005).

Antagonistas como componentes del Control Biológico

Los componentes del control biológico son el patógeno, el hospedante y el antagonista interactuando en un sistema biológico (Bettiol, 1991a). Un antagonista es definido como un oponente o adversario. El término se refiere a un componente capaz de interferir en el proceso de la vida de los patógenos

vegetales; pueden ser hongos, bacterias, nematodos, protozoarios, virus, viroides, semillas, etc. (Baker y Cook, 1974). En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos, es decir que el control biológico funciona naturalmente (Cook y Baker, 1983).

Los mecanismos de interacciones antagónicas entre patógenos y antagonistas con la planta incluyen competencia, antibiosis, parasitismo, predación, hipovirulencia e inducción de defensa del hospedante (Baker y Cook, 1974; Cook y Baker, 1983; Bettiol, 1991a). Un antagonista puede actuar a través de uno o más mecanismos de interacciones antagónicas, incluso una característica adecuada de un antagonista es presentar más de un mecanismo, de manera de aumentar sus posibilidades de éxito (Bettiol, 1991a). Ninguno de los mecanismos es necesariamente exclusivo y frecuentemente un aislamiento posee varios modos de acción. Para algunos antagonistas, diferentes mecanismos o combinaciones de mecanismos pueden estar involucrados en la supresión de diferentes patógenos (Gasoni et al., 2004).

La antibiosis es definida como una interacción entre organismos en la cuál uno o más metabolitos producidos por un organismo tienen efecto dañino sobre otro. Usualmente ocurre inhibición del crecimiento y/o de la germinación, pudiendo ser letal, y el metabolito puede penetrar a la célula e inhibir sus actividades por toxicidad química (Bettiol, 1991a).

Competencia es el esfuerzo de dos o más organismos para obtener la cantidad que cada uno quiere de un sustrato, en la forma específica y bajo las condiciones específicas en las que dicho sustrato está presente, cuando la provisión no es suficiente para ambos. En esencia, la competencia es por nutrientes (particularmente carbohidratos de alta energía, pero también nitrógeno) y posiblemente ciertos factores de crecimiento. La competencia puede ser también por oxígeno o espacio (Baker y Cook, 1974).

El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. El parasitismo de hongos que a su vez son parásitos de plantas se

denomina hiperparasitismo (Gasoni, 1994). Los hiperparásitos atacan hifas y estructuras de resistencia o supervivencia de los patógenos de las plantas, reduciendo la infección y el inóculo del patógeno (Bettiol, 1991a). Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares que lisan las paredes de las hifas, conidios o esclerocios (Melgarejo et al., 1989; Ulhoa, 1996).

En el caso de la predación, el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. Las referencias más conocidas citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las que se alimentan de las hifas de los hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Campbell, 1989; Bettiol, 1991a).

La hipovirulencia es usada introduciendo una cepa de un patógeno menos agresiva o no patogénica (Bettiol, 1991a), que reduce la capacidad del patógeno para producir enfermedad (D'Arcy et al., 2001) a través de la ocupación del habitat y/o la inducción de defensa. La inducción de defensa del hospedante por microorganismos o sus metabolitos tiene acción directa sobre el hospedante y no sobre el patógeno. Numerosos microorganismos o sus metabolitos pueden inducir al hospedante a alterar sus mecanismos bioquímicos de respuesta (Bettiol, 1991a).

Búsqueda y selección de antagonistas de patógenos del filoplano

El aislamiento y la selección de microorganismos antagónicos sustentan todo programa de control biológico, determinando las chances de éxito (Bettiol, 1991c). El control biológico se caracteriza por la introducción de un antagonista del agente causal de una enfermedad. En toda introducción de organismos exógenos se requiere evaluar el potencial patogénico, la capacidad de inducir alergias, etc. Se sugiere entonces, cuando sea posible, que la selección de los antagonistas sea iniciada por la búsqueda de aquellos residentes en el hospedante, de tal manera se minimizarán los problemas (Bettiol, 1991c; 1997). Según Blakeman y Fokkema (1982) los microorganismos residentes, que desarrollan naturalmente en la superficie de las plantas se adaptan para

sobrevivir y crecer en ese habitat. Si esos organismos poseen efectiva acción antagonista, deben ser preferidos a los de otros habitats, que pueden ser igualmente antagonistas del patógeno. Posiblemente los microorganismos de otros habitats estarán menos adaptados a vivir por largos períodos en el filoplano y, consecuentemente deberán ser aplicados más frecuentemente en la superficie foliar (Bettiol, 1997).

Sobre el filoplano se encuentran exudados foliares, residuos orgánicos, granos de polén, secreciones causadas por áfidos y otras sustancias (Bettiol, 1991b). Sobre las superficies foliares viven grandes poblaciones de organismos epífitos que son capaces de influenciar sobre las especies patógenas en el proceso de infección de las hojas y tallos (Fokkema, 1976, citado por Bettiol, 1991b). De acuerdo a su capacidad antagonista, podrán desplazar; reducir, suprimir o inducir resistencia al patógeno. Muchos de los antagonistas más efectivos de los hongos fitopatógenos son razas no patógenas o especies relacionadas con éstos, que están adaptadas ecológicamente al cultivo (Mitdieri,-- --). Este conocimiento ha estimulado el interés por el control biológico de patógenos de la parte aérea de las plantas (Bettiol, 1991b).

La microflora saprofítica natural de la superficie de la planta con actividad antagonista ha reducido la incidencia de enfermedades a campo, produciendo control biológico natural. Los patógenos de las plantas, antes de penetrar al hospedante, comúnmente son transeúntes (pasajeros) del filoplano, estando durante este período expuestos a interacciones con microorganismos epífitos. Las condiciones del ambiente abiótico de la parte aérea son muy diferentes a las del suelo. La temperatura y la humedad fluctúan más rápida y ampliamente, y el microorganismo está expuesto a la luz del sol y a la radiación ultravioleta, hay mayor exposición al clima y riesgo de ser lavado por la lluvia (Baker y Cook, 1974). El equilibrio de la población microbiana del filoplano puede ser fácilmente quebrado por la interferencia del hombre. Las modificaciones en la superficie foliar y su microambiente pueden ocurrir debido a contaminación, aplicación de productos químicos, como fungicidas, insecticidas, acaricidas, hormonas o fertilizantes entre otros. Estas alteraciones pueden interferir en la ocurrencia de las enfermedades (Bettiol, 1991b).

Los microorganismos comunmente encontrados en el filoplano son bacterias, levaduras y hongos filamentosos, provenientes principalmente de semillas, suelo y aire. Después del inicio de la colonización del filoplano los diferentes microorganismos están presentes simultáneamente, siendo esta ocurrencia indispensable para el control biológico natural. Inclusive, una de las maneras de incentivar el control natural es el mantenimiento del equilibrio de la población microbiana del filoplano (Bettiol, 1991b). Con el conocimiento de la existencia de grandes poblaciones de microorganismos epífíticos en las superficies foliares y de que son capaces de interferir sobre las especies patogénicas en el proceso de infección de las hojas, se han desarrollado numerosos estudios sobre el control biológico de enfermedades del filoplano, y muchos alcanzaron resultados promisorios (Bettiol, 1991b).

Según Blakeman y Fokkema (1982), para que un antagonista tenga éxito debe tener capacidad para multiplicarse y colonizar la superficie de la planta. Para cada patosistema existe un lugar más apropiado para realizar la selección de los antagonistas. Las chances de obtener microorganismos efectivamente antagonísticos aumenta, realizando los aislamientos en el ambiente donde serán utilizados. Para Baker y Cook (1974) un antagonista eficiente puede ser encontrado en cualquier lugar, pero las chances de éxito son incrementadas por la investigación sistemática en lugares seleccionados, reduciendo las tentativas inútiles. Sugieren que los antagonistas deben ser buscados en áreas donde la enfermedad ocasionada por un patógeno no ocurre o ha disminuido, o no puede desarrollarse, a pesar de la presencia de hospedantes susceptibles en tasas superiores a aquellas donde la enfermedad ocurre. Las sugerencias de estos autores incluyen lugares donde: 1) el patógeno es incapaz de establecerse; 2) el patógeno está presente pero no causa enfermedad; 3) el potencial de inóculo del patógeno disminuye con el monocultivo; 4) el hospedante y el patógeno son nativos y 5) por diversas razones se sospecha de la presencia de antagonistas en el área.

Según Andrews (1985) muchos investigadores prefieren seleccionar microorganismos con características como: a) ausencia en donde el control será

aplicado, b) crecimiento explosivo, c) estabilidad y esporulación en medio de cultivo, d) miembros de especies o géneros conocidos como antagonistas, e) características morfológicas y fisiológicas diferentes para facilitar el reconocimiento y f) supervivencia bajo distintas condiciones.

Para aislar antagonistas de la superficie foliar, distintos investigadores realizan lavados de órganos de las plantas con agua destilada estéril en agitador por determinado tiempo. Con esta suspensión se realiza una dilución en serie, plaqueando en medio de cultivo. Todas las colonias que desarrollan son purificadas y testadas en su capacidad de inhibir el patógeno (Bettiol, 1991c). Todos los métodos de selección de antagonistas se basan en evidencias de que un organismo candidato interfiere, de algún modo, en el desarrollo del patógeno o reduce la enfermedad.

Un programa de control biológico se basa en la selección de microorganismos antagónicos, que puede ser realizada *in vitro* o *in vivo*. En el primer caso en general se prueban grandes poblaciones, a través de métodos de selección cualitativos ó cuantitativos, tales como agar en placas o cultivo en medio líquido. El cultivo dual es el método más utilizado en estudios de antagonismo *in vitro*. Una de las formas de realizarlo es sembrando el posible antagonista y el fitopatógeno en placas de Petri conteniendo un medio agarizado y midiendo el desarrollo del fitopatógeno (Mariano, 1993). Los ensayos *in vitro* son de fácil ejecución pero son pobres predictores del comportamiento del antagonista *in vivo*. Se recomienda entonces complementar dichos ensayos por otros *in vivo*, primero sobre condiciones controladas y posteriormente sobre las condiciones en las que los antagonistas serán utilizados (Bettiol, 1991c). La principal crítica que se le hace a los métodos *in vitro* se basa en que, la mayoría de las veces, los resultados no coinciden con los de los ensayos realizados *in vivo*, sea bajo invernáculo o a campo. A pesar de ello, la mayoría de los trabajos publicados sobre control biológico de enfermedades de las plantas presentan una selección inicial realizada en laboratorio (Mariano, 1993).

Las pruebas de antagonismo sobre la superficie foliar de plantas creciendo en condiciones controladas son claves para la selección de agentes

para el control biológico (Andrews, 1985). Consisten, básicamente, en la pulverización del antagonista sobre las hojas, la inoculación del patógeno y la posterior evaluación de la enfermedad (Bettiol, 1991c). La prueba más importante e indispensable para seleccionar a un antagonista es la introducción a la comunidad microbiana natural (Andrews, 1985). Muchos antagonistas eficientes *in vitro* y en condiciones controladas no pasan por este test final (Bettiol, 1991c). Comúnmente, los organismos que muestran antagonismo en pruebas en placas no controlan la enfermedad cuando son aplicados a las plantas. Aunque es menos común, ciertos antagonistas efectivos para controlar la enfermedad a campo no muestran propiedades inhibitorias en cultivo (Andrews, 1985). Para seleccionar microorganismos antagonistas, es deseable usar técnicas *in vivo* para evitar eliminar organismos cuyos modos de acción no sea la antibiosis (Nicot et al., 1993).

Integración del control biológico con el control químico

La integración de métodos de control de enfermedades de las plantas permite la solución de problemas fitosanitarios en condiciones económicamente viables, con menores riesgos de fracaso y de contaminación. En este abordaje, el control biológico debe ser considerado como una alternativa dentro de un programa general de control, y su desempeño evaluado en ese contexto (Ghini, 1991). El control integrado es un sistema en el cual se utilizan varios métodos en secuencias o épocas adecuadas, de forma de causar los menores prejuicios para el hombre y el medio ambiente, colaborando con el control natural. Debe existir una mínima interferencia entre los métodos aplicados, siendo interesante un efecto aditivo o sinérgico, en que cada medida de control refuerce a las demás (Ghini, 1991).

El manejo de microorganismos antagonistas, integrado a las prácticas tradicionales, constituye una herramienta potencial para el control de enfermedades (Wright et al., 1988). Según Baker y Cook (1974) el control biológico debería ser considerado como una parte del programa de control de una enfermedad, asumiendo un rol de importancia variable según la patología

considerada. Una objeción importante a muchos de los controles químicos de patógenos en uso es su efecto indiscriminado sobre los restantes microorganismos del sistema. En lugar de matar al patógeno, podría ser solamente necesario debilitarlo y hacerlo más vulnerable al antagonismo de la microflora asociada (Baker, Cook, 1974). Rahe y Utkhede (1985) agregan que agentes biológicos y químicos pueden actuar como protectores directos de las plantas y la integración de ambos requiere mínima interferencia de uno con el otro. De esa manera, los fungicidas podrían ser aplicados en fases críticas para la ocurrencia de la enfermedad, cuando es necesario un control eficiente a corto plazo. En las demás fases, serían utilizados métodos de control biológico, reduciendo problemas de polución ambiental, residuos en los productos, resistencia de hongos a fungicidas y posiblemente, el costo del control. Si las condiciones ambientales fueran temporariamente desfavorables para el antagonista, el fungicida podría servir como alternativa de control.

Ha despertado la atención de muchos investigadores la posibilidad de reducir la utilización de productos químicos a través de prácticas alternativas, como la integración de microorganismos antagónicos y dosis reducidas de fungicidas (Soares de Melo, 1991). Una ventaja de la utilización de un antagonista resistente es su efecto más duradero en el ambiente, comparado con el efecto efímero de un fungicida (Soares de Melo, 1991). Una asociación de métodos de control químico y biológico puede llevarse a cabo cuando la población de antagonistas es menos afectada por el fungicida que la del patógeno, o que los antagonistas sean capaces de colonizar más rápidamente que el patógeno la superficie de la planta o del suelo después del tratamiento químico (Bollen, 1982, citado por Ghini, 1991).

El control biológico debe ser considerado como parte de un programa de control de enfermedades, asumiendo un rol de importancia variable para diferentes enfermedades, dominante en algunos casos, de menor importancia en otros. Según Papavizas (1973, citado por Ghini, 1991) una integración del control químico y biológico es un abordaje en el cual todos los métodos de control biológico pueden ser utilizados para reducir la actividad del patógeno a niveles

tolerables, siendo los productos químicos aplicados cuando son absolutamente necesarios.

La interferencia entre los dos tipos de control puede ser reducida mediante: a) selección de productos químicos que produzcan un mínimo impacto sobre agentes de biocontrol, b) selección de la época y el modo de acción del fungicida y del producto biológico, c) selección de los antagonistas resistentes a los fungicidas (Rahe y Utkhede, 1985). La integración del control químico y del control biológico puede también ser obtenida a través de la aplicación de dosis relativamente bajas de productos químicos, cuya finalidad es estresar al patógeno y tornarlo vulnerable a los microorganismos antagónicos (Baker y Cook, 1974). Como regla general, un antagonista resistente a un fungicida es resistente a los demás fungicidas del grupo químico al que pertenece o a los que presentan el mismo modo de acción, visto que probablemente, estén involucrados los mismos genes (Ghini, 1991).

Shtienberg y Elad (1997) incorporan un método de pronóstico para la integración del control químico y biológico en cultivos hortícolas bajo invernáculos no calefaccionados. Cuando se espera poco o ningún desarrollo de la enfermedad no se realizan aplicaciones, cuando las condiciones son ideales para la enfermedad se aplican fungicidas y en situaciones intermedias aplican el biocontrolador Trichodex (*Trichoderma harzianum* T39). De esta manera se redujo notablemente la cantidad de aplicaciones de fungicidas.

Control biológico de *Botrytis cinerea*.

En los últimos años se intensificó la investigación en relación al control biológico de patógenos de la parte aérea. Los recientes avances en el control biológico de enfermedades de la filósfera, que demuestran su viabilidad, son debidos básicamente a una mayor comprensión de la naturaleza física, química y microbiológica de la superficie foliar. A partir de ello se reconoce que el proceso de infección de las hojas y de los tallos está influenciado por la comunidad microbiana que vive sobre la superficie foliar (Bettiol, 1997).

Los patógenos necrotróficos pueden colonizar y esporular sobre tejidos de plantas muertas naturalmente, pero las aplicaciones de antagonistas pueden resultar en una colonización preventiva de este sustrato por saprófitos evitando la posterior llegada del patógeno (Blakeman, 1991; Köhl y Fokkema, 1997). Los microorganismos que muestran habilidad competitiva por nutrientes son comunes sobre las hojas y son buenos candidatos para el control biológico contra patógenos necrotróficos no especializados (Blakeman, 1991).

Entre los biocontroladores estudiados para el control de *B. cinerea* se encuentran hongos, bacterias y levaduras. Entre los hongos utilizados con buenos resultados se encuentra *Ulocladium atrum* en cyclamen (Köhl et al., 1995a, 1995b, 1998, 2000; Kessel et al., 1999; 2002) y frutilla (Boff et al., 2002) y *U. oudemansii* sobre uvas (Reglinski et al., 2005). Aislamientos de *Trichoderma harzianum* redujeron el porcentaje de infección de *B. cinerea* en frutos de frutilla, tanto en invernáculo como en condiciones de campo (El-Zayat et al., 1993). El aislamiento *Trichoderma harzianum* T39 (marca comercial Trichodex) ha sido efectivo en el control del patógeno en uva, zapallo, tomate, frutilla (Elad y Kirshner, 1993), vid (Esterio y Auger, 1997) y arveja (Zimand et al., 1996). Aislamientos de *T. harzianum* disminuyeron su incidencia en uvas para mesa (Latorre et al., 1997). *T. hamatum* inoculado sobre turba disminuyó la severidad de la enfermedad ocasionada en plantas de begonia (Horst et al., 2005) y también fue efectivo sobre arveja (Nelson y Powelson, 1988). *Gliocladium roseum* suprimió a *Botrytis cinerea* y el avance de epidemias de moho gris sobre plántulas de abeto negro (Zhang et al., 1996a) y redujo los cambios fisiológicos asociados a la infección (Zhang et al., 1996b). *G. roseum* suprimió la esporulación del patógeno sobre semillas de garbanzo tratadas con una suspensión del antagonista (Burgess y Keane, 1997; Burgess et al., 1997) y brindó un buen control del patógeno en frutilla (Chaves y Wang, 2004) y frambueso (Yu y Sutton, 1997, 1998, 1999). *Clonostachys rosea* (= *Gliocladium roseum*) fue efectivo en tomate (Shafia et al., 2001, Sutton et al., 2002). *Cladosporium cladosporioides* y *T. harzianum* brindaron protección a tallos de tomate con heridas (Eden et al., 1996). *Epicoccum nigrum*, *G. roseum* y *T.*

harzianum suprimieron la esporulación de *B. cinerea* sobre hojas de arveja aplicados antes de la infección (Szandala y Backhouse, 2001).

En cuanto a las levaduras, han mostrado ser eficientes *Rhodotorula glutinis* y *Cryptococcus albidus* en arveja y tomate (Elad et al., 1994), *R. glutinis* en discos de geranio (Buck y Jeffers, 2004), *Cryptococcus laurentii* (Roberts, 1990) y *Candida saitoana* (El-Ghaouth et al, 1998, 2003) en frutos de manzana, *C. sake* sobre peras (Nunes et al., 2002) y *Metschnikowia fructicola* en uvas (Karabulut et al., 2003). La combinación del control biológico con una levadura antagonista (*Candida oleophila*), tratamiento de frutos de durazno con agua caliente a 55°C y almacenamiento en atmósfera modificada a 0°C mostró la mayor eficacia en el control de *B. cinerea* poscosecha (Karabulut y Baykal, 2004).

Entre las bacterias se destacan *Bacillus subtilis* sobre frutos de limón (Arras y D'Hallewin, 1994), *Pseudomonas fluorescens* sobre flores de petunia (Gould et al., 1996), *P. fluorescens* y *Serratia plymuthica* sobre discos de hojas de repollo (Leifert et al., 1993), *Candida pulcherrima* sobre discos de hojas de kiwi (Cook, 2002a), *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis* y *B. subtilis* (Leibinger et al., 1997), *R. glutinis* (Zhang et al., 2007) y *A. pululans* sobre frutos de frutilla (Adikaram et al., 2002), *Pseudomonas syringae* (Zhou et al., 2001) sobre frutos de manzano y *B. licheniformis* sobre plantas de tomate (Lee et al., 2006). Guetsky et al. (2001) utilizan una combinación de una levadura (*Pichia guillemontii*) y una bacteria (*Bacillus mycoides*) para el control de *B. cinerea* sobre hojas de frutilla.

Se han realizado en los últimos veinte años algunos estudios sobre el control biológico de *B. cinerea* en rosal. Redmond et al. (1987) y Redmond (1987) evalúan por su potencial antagónico hongos y bacterias aislados de pétalos de rosa. Realizaron evaluaciones preliminares sobre flores cortadas inoculando el antagonista 24 hs antes que el patógeno, presentando capacidad para reducir el número de lesiones *Exophiala jeanselmei*, *Cryptococcus*

albidus, *Erwinia* sp. El antagonista más eficiente fue *E. jeanselmei* que disminuyó un 65% el número de lesiones sobre pétalos.

Hammer et al. (1993) utilizan para el control de *B. cinerea* poscosecha sobre flores de rosal un antibiótico obtenido de *Pseudomonas cepacia*, con una disminución de la incidencia del 90% en relación al testigo no tratado. Aplicaciones semanales en invernáculos del producto comercial Trichodex 25WP (*T. harzianum*) redujeron la infección de las ramas de rosal en un 50%. La incidencia de los síntomas en flores disminuyó a los dos días de la aplicación pero no a los 7 días, siendo entonces insuficiente un esquema de aplicaciones cada 7 días. La dificultad en controlar la infección de las flores por *B. cinerea* se origina en el hecho de que una flor puede estar cerrada durante una aplicación y después, cuando el pimpollo se abre, se infecta antes de la siguiente aplicación (Elad et al., 1993).

Da Silva Tatagiba et al. (1997) encuentran que aislamientos de *Gliocladium roseum* y *Trichoderma inhamatum* reducen en un 90% la esporulación de *B. cinerea* sobre restos de hojas artificialmente infectados. Otros hongos filamentosos fueron efectivos en un 25 a 90%. Sobre pétalos inoculados artificialmente ningún microorganismo redujo la esporulación más del 75%. *T. inhamatum*, *Cladosporium oxysporum* y *G. roseum* fueron los mejores entre los organismos evaluados para el control de *B. cinerea* en tejidos de hojas naturalmente infectados. Diez aislamientos de hongos filamentosos, dos de levaduras y cinco de *Bacillus subtilis* previnieron completamente la producción de lesiones sobre pétalos.

Morandi et al. (2001, 2006) consideran que un aislamiento de *Clonostachys rosea* podría suprimir al patógeno bajo sistemas de producción de rosal, debido a que es capaz de parasitar hifas y conidios de *B. cinerea* sobre residuos de hojas, exhibe flexibilidad en su asociación con hojas de rosal bajo un amplio rango de condiciones microclimáticas y reduce su esporulación sobre hojas y residuos. *C. rosea* redujo notablemente la esporulación del patógeno sobre hojas de rosal, frutilla, tomate y eucalipto (Nobre et al., 2005)

Los únicos estudios sobre control biológico de *B. cinerea* sobre plantas de rosal enmacetadas encontrados en la bibliografía son los de Yohalem (2004), Yohalem y Kristensen (2004) y Yohalem et al. (2007). Dos aislamientos de *U. atrum* fueron más efectivos que otros antagonistas y que el fungicida iprodione (Yohalem, 2004), siendo más efectiva su aplicación el día anterior a la pulverización con *B. cinerea* (Yohalem et al., 2007).

No existen antecedentes acerca del control biológico de *B. cinerea* en rosal en nuestro país. Los únicos estudios realizados se refieren a su control en cyclamen y tomate. Rivera et al. (2001) y Rivera (2005) evalúan la capacidad antagónica de micoflora asociada a distintos órganos de cyclamen a través de inoculaciones sobre discos de hojas, pétalos, pedúnculos y pecíolos. La cepa más promisoría corresponde a *Clonostachys rosea* (= *Gliocladium roseum*), que inhibió la esporulación en todos los órganos, excepto en hojas, donde se observó una muy baja densidad de conidióforos. Estudios realizados por Dal Bello et al. (2005) permitieron obtener unos 100 aislamientos de levaduras a partir del filoplano de especies cultivadas y espontáneas de la familia Solanaceae. Se seleccionaron los que mostraron mayor inhibición de la germinación de los conidios de *B. cinerea* y se utilizaron sobre frutos de tomate. Dos cepas redujeron significativamente la enfermedad en un 20-35%.

3.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE ANTAGONISTAS.

OBJETIVOS

- Seleccionar hongos aislados del filoplano, como posibles antagonistas de *Botrytis cinerea*.

HIPÓTESIS

- La microflora fúngica asociada al filoplano del rosal incluye cepas capaces de controlar biológicamente a *B. cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Aislamiento de cepas del filoplano

Se realizaron muestreos de hojas, pecíolos, pétalos y sépalos en cultivos de rosales para flor de corte en invernadero de los alrededores de Buenos Aires, La Plata y plantaciones de la Facultad de Agronomía para el aislamiento de especies fúngicas potenciales antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea*.

Las muestras se tomaron de plantaciones comerciales de Estancia Chica (Ec), Pontevedra (Po), Rosario (Ro), San Pedro (SP) y Zelaya (Ze), de plantaciones para ensayos del Instituto Hall (IH) y de plantas al aire libre en el parque de Facultad de Agronomía (FA). Las plantaciones Ec, Po, Ro, SP se encontraban en plena producción, mientras que la de Ze estaba en estado de semiabandono, sin aplicación de agroquímicos por al menos un año. Se buscaron organismos asociados naturalmente al follaje y flores del rosal. Se eligieron

muestras que, en lo posible, no presentaran síntomas de la enfermedad, estuvieran rodeados de plantas afectadas y no hubieran recibido aplicaciones de fungicidas durante varios días previos. Las muestras de hojas, pecíolos, pétalos y sépalos se procesaron de acuerdo a la técnica de Peng y Sutton (1991), levemente modificada. Para los cultivos Ec y FA también se procesaron muestras de suelo. Los cultivos Ec, Po, Ro y Sp se encontraban en producción, con aplicaciones periódicas de agroquímicos. El cultivo Ze se encontraba en estado de semiabandono, sin aplicación de productos por varios meses. La plantación IH era conducida en forma similar a cultivos de producción, mientras que en FA se tomaron muestras de plantas de jardín, con poca aplicación de agroquímicos.

De cada lugar de muestreo se tomaron al azar un mínimo de 10 muestras de hojas y flores y tallos, de órganos que no manifestaban síntomas de la enfermedad y se encontraban cercanos a órganos afectados, teniendo en cuenta las recomendaciones de Baker y Cook (1974) mencionadas en la introducción y sin considerar cultivar. De cada muestra, se cortaron con sacabocados 50 discos de hojas y pétalos de 1 cm de diámetro y con bisturí 50 segmentos de sépalos y tallos de 1 cm de largo. El material proveniente de cada órgano y cultivo fue colocado separadamente en frascos tipo Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 100 ml de agua destilada estéril adicionada con 2 gotas de Triton (dispersante) y agitado a 100 rpm durante 2 horas. Posteriormente se realizaron cinco diluciones sucesivas, cada una 1/10, para cada muestra. De cada dilución se tomó 1 ml del agua de lavado que se sembró en cajas de Petri con 10 ml de APG adicionado con 100 ppm de sulfato de estreptomicina (Peng y Sutton, 1991). Para las muestras de suelo se siguió el mismo procedimiento, colocando 50 gr en Erlenmeyer, realizándose las mismas diluciones. Tanto para las diluciones provenientes de los órganos de la planta como las de suelo se sembraron 3 replicas por dilución. El material fue incubado en estufa a 21-23°C.

Se consideraron sólo aquellos aislamientos de cada localidad y órgano que visualmente parecían diferentes. La colección de microorganismos aislados se mantuvo en APG en tubos en estría a 5°C. Los aislamientos obtenidos se identificaron con el número de la muestra seguido por una letra que indica órgano o lugar del cual se obtuvo el aislamiento (H= hoja; P= pétalo; S= sépalo; T= tallo;

B= suelo) y un número que indica la caja de Petri en la cual desarrolló. Se identificarán finalmente aquellas cepas de mejor comportamiento en los distintos ensayos.

3.2.2. Preselección *in vivo*

Se realizaron cortes de hojas sanas de rosal con un sacabocados de 2 cm de diámetro. Los mismos se colocaron en un vaso de precipitado con agua destilada estéril y se realizaron dos lavados en un agitador durante una hora cada uno, cambiando el agua entre los mismos. Se prepararon cajas de Petri de polipropileno de 9 cm de diámetro a las que les fue colocado papel de filtro humedecido con agua; sobre el mismo se ubicaron en forma de cruz dos portaobjetos con el fin de servir de apoyo a 15 discos lavados de hojas de **Rosa** sp. dispuestos sobre los extremos y el centro de la cruz (Fig. 31a). Estas cajas se prepararon en número de dos por aislamiento y seis cajas testigos para cada ensayo.

La suspensión de esporas del posible antagonista se preparó a partir de tubos en estría con medio APG con 5 a 10 días de crecimiento del mismo. A cada tubo se agregó agua destilada estéril y se realizó un raspado utilizando un ansa en anillo. La suspensión se filtró utilizando gasas estériles. Las suspensiones se llevaron a una concentración de entre $3 \cdot 10^7$ y $4 \cdot 10^7$ esporas/ml. Cada una de las suspensiones se aplicó con un pulverizador de Vilbis (Fig. 31b) sobre 30 discos de hojas de rosal (dos cajas de Petri de polipropileno anteriormente preparadas). Las cajas se colocaron a 21 °C bajo luz natural.

Como una forma de comparar la capacidad antagónica de los aislamientos obtenidos se utilizaron también las cepas Gr, Tk₂ y Th. El aislamiento Gr (***Clonostachys rosea* = *Gliocladium roseum***) fue obtenido de cultivos de frutilla y gentilmente cedido por el Dr. J.C. Sutton (Universidad de Guelph), encontrándose entre los organismos más efectivos para el control de ***B. cinerea*** sobre estambres y frutos de dicho cultivo (Peng y Sutton, 1991). Los aislamientos Tk₂ y Th pertenecen a la colección de la Cátedra de Fitopatología (FAUBA). El

aislamiento Tk₂, que corresponde a *Trichoderma koningii*, y el aislamiento Th, que corresponde a *T. harzianum*, fueron obtenidos de micelio y esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* parasitando girasol en la localidad de Norberto de la Riestra, provincia de Buenos Aires (Cortese et al., 1992). Tk₂ y Th manifestaron buena eficiencia antagónica *in vitro* frente a *S. sclerotiorum* y *S. minor* (Wright et al., 1988), *Rhizoctonia solani* (Cortese et al., 1992). Además Tk₂ controló *in vitro* y en aplicaciones a semillas de soja a *Colletotrichum demathium* var. *truncata* (Grijalba et al., 1992).

A partir de un cultivo puro de *B. cinerea* de 10 días, de la cepa obtenida del cultivo Shigenawa y cuya patogenicidad fue probada en la primera parte de este trabajo, se preparó la suspensión de esporas que se llevó a una concentración de 4,10⁶ esporas/ml. El aislamiento del patógeno se inoculó sobre los trozos de hojas inoculados con el antagonista el día anterior. Las cajas se volvieron a colocar a 21 °C bajo luz natural.

Al tercer día se prepararon, para cada aislamiento, tres cajas de Petri de polipropileno de 4,5 cm de diámetro. En cada caja se volcó 100 µl de una solución de cloranfenicol 0,50 g % P/V y 100 µl de una solución de paraquat diluido (1/10 ml), a 5 ml de agar agua. El paraquat favorece la senescencia de los tejidos y por lo tanto favorece el desarrollo de *B. cinerea*. Cada uno de los discos previamente inoculados se traspasó con una pinza a cada caja de Petri conteniendo el medio correspondiente (Fig. 31c). Dichas cajas se colocaron en una cámara a 21°C alternando 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad por un período de 10 días.

Se utilizaron 3 testigos inoculados sólo con el patógeno, 3 inoculados con el antagonista y 3 controles pulverizados con agua destilada estéril. La evaluación de la infección y colonización de *B. cinerea* sobre las hojas de rosal se realizó indirectamente, estimando la esporulación del patógeno a través de una escala para evaluar la densidad de conidióforos (Peng y Sutton, 1991). La escala consiste en ocho categorías equivalentes a 0, 1-12, 13-24, 25-48, 49-100, 101-200, 201-300 y 301-400 conidióforos/disco (Fig. 32).

Análisis estadístico: los datos registrados en la escala fueron transformados a valores medianos de acuerdo al número de conidióforos de las diferentes categorías (Peng y Sutton, 1991). Como los distintos antagonistas fueron evaluados en diferentes días debido a la imposibilidad práctica de completar el estudio en una única vez, se empleó un índice que permite evaluar cada observación en relación a la esporulación del testigo inoculado con ***B. cinerea*** correspondiente a cada día. Un valor del índice cercano a 1 indica densidad de esporulación cercana a 0, un valor cercano 0 indica que el antagonista se comportó de manera similar al testigo con ***B. cinerea*** y un valor negativo indica una densidad de esporulación mayor que el testigo con ***B. cinerea***.

Mediante el análisis de variancia para un modelo anidado (muestra dentro de la caja) (Steel y Torrie, 1985) se compararon las medias de los tratamientos (promedio de los índices de esporulación del patógeno sólo y en presencia de cada antagonista). Se excluyeron de este análisis los antagonistas y el testigo con 0 densidad de esporulación en todas las muestras de todas las cajas. Las medias del resto de los tratamientos (52 en total) fueron separadas mediante análisis de agrupamiento (cluster analysis) de modo de diferenciar, en forma exploratoria, grupos de cepas que produjeron valores semejantes en el grado de esporulación del patógeno. La técnica de agrupamiento jerárquico empleada correspondió a la de acoplamiento completo (complete linking clustering) (SAS, 1996). Este método utiliza la mayor distancia entre una observación en un cluster y una observación en el otro cluster para agrupar en forma jerárquica.

3.2.3. Preselección *in vitro*

Se utilizó la técnica de cultivo dual descrita por Wright et al (1988) y Mariano (1993). Se prepararon cajas de Petri de vidrio de 9 cm con 10 mililitros de APG. Una vez solidificado el medio de cultivo, se colocaron dos discos de APG de 2 cm de diámetro con desarrollo miceliar de 7 días, a una distancia de 5 cm. Uno de ellos con el posible antagonista y el otro con ***Botrytis cinerea***. El patógeno se colocó 24 horas antes que el antagonista y se mantuvo en estufa a

23°C. Como testigos se sembraron discos de cada antagonista y del patógeno frente a APG sin desarrollo micelial alguno.

Una vez sembradas, las cajas fueron incubadas en estufa a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, realizándose 3 repeticiones para cada tratamiento. El testigo *Botrytis* tuvo 15 réplicas. Para cada caja se midió el desarrollo de los microorganismos a través de la superficie cubierta por el micelio durante los primeros cuatro días desde la siembra. Para ello se procedió a reproducir sobre papel de calcar (desde las bases de las cajas) la superficie cubierta por los hongos. Se recortaron los trozos de papel y se midieron en un medidor de área foliar (foliómetro).

El desarrollo del antagonista en el cultivo dual fue analizado mediante un modelo lineal con dos factores (antagonista-patógeno) en cada fecha de observación. Los efectos principales y la interacción fueron probados mediante análisis de varianza. Las medias fueron comparadas posteriormente mediante la prueba DGC (Di Rienzo et al, 2002). En la evaluación del desarrollo del patógeno se consideró un modelo unifactorial con el antagonista como único factor.

RESULTADOS

3.2.1. Aislamiento de cepas del filoplano

A través de la técnica de Peng y Sutton (1991) se obtuvieron más de 300 aislamientos fúngicos. De ellos se seleccionó un total de 62 aislamientos, en forma visual y eliminando aquellos que, obtenidos del mismo lugar y órgano, parecieron iguales. Los aislamientos obtenidos y seleccionados inicialmente se detallan en la Tabla 19. De los aislamientos obtenidos, 13 fueron de hojas, 16 de pétalos, 13 de sépalos, 13 de tallos y 7 de suelo. De las muestras tomadas y procesadas del cultivo Ec (Estancia Chica) se obtuvieron 10 aislamientos, 12 de FA (Facultad de Agronomía), 8 de IH (Instituto Hall), 6 de Po (Pontevedra), 7 de SP (San Pedro) y 19 de Ze (Zelaya). No se obtuvieron aislamientos de las muestras tomadas en Ro (Rosario). La mayor parte de los aislamientos obtenidos corresponden a los géneros *Penicillium* y *Trichoderma*, realizándose a posteriori la identificación solamente de aquellos de mejor comportamiento.

Tabla 19: Número de aislamientos relacionados obtenidos de muestras de rosales provenientes de diferentes plantaciones y estructuras de las plantas de posibles antagonistas.

Plantación	Estructuras	Número de Aislamientos
Ec	Hojas H -	0
Ec	Pétalos P 1, 3	2
Ec	Sépalos S 8, 9, 10, 12	4
Ec	Tallos T -	0
Ec	Suelo B 1, 5, 7, 8	4
FA	Hojas H -	0
FA	Pétalos P 3, 4, 5	3
FA	Sépalos S 4, 7	2
FA	Tallos T 1, 2, 7, 8	4
FA	Suelo B 1, 4, 5	3
IH	Hojas H 1, 2	2
IH	Pétalos P 1, 2, 3	3
IH	Sépalos S -	0
IH	Tallos T 2, 3, 4	3
Po	Hojas H -	0
Po	Pétalos P 1, 3	2
Po	Sépalos S 1,7,12	3
Po	Tallos T 1	1
Ro	Hojas H -	0
Ro	Pétalos P -	0
Ro	Sépalos S -	0
Ro	Tallos T -	0
SP	Hojas H 2, 3	2
SP	Pétalos P 2, 5	2
SP	Sépalos S -	0
SP	Tallos T 2, 3, 4	3
Ze	Hojas H 1, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13	9
Ze	Pétalos P 1, 2, 3, 5	4
Ze	Sépalos S 1, 5, 6, 7	4
Ze	Tallos T 1, 7	2
Sumatoria		62

3.2.2. Preselección *in vivo*

Los resultados obtenidos, expresados en índices de esporulación de *B. cinerea* sobre hojas inoculadas con los distintos antagonistas, se muestran en la Tabla 20. Los aislamientos correspondientes al grupo 1 no permitieron la esporulación del patógeno. Se recuerda que un valor índice cercano a 1 indica densidad de esporulación 0, mientras que un valor cercano a 0 indica que el antagonista se comportó de manera similar al testigo con *B. cinerea* y un valor negativo indica una densidad de esporulación mayor que el testigo con *B. cinerea*. Una mayor disminución de la esporulación (valor más cercano a 1) indica una mayor capacidad antagónica de la cepa evaluada.

Se obtuvo un primer grupo con 14 microorganismos que impidieron la esporulación del patógeno (Tabla 24). De ellos, 9 provenían del cultivo de Zelaya y el resto de los distintos cultivos (2 de Instituto Hall y uno de Facultad de Agronomía, Pontevedra y San Pedro) excepto Estancia Chica. Seis aislamientos se obtuvieron a partir de hojas, cuatro de pétalos, tres de tallos y uno de sépalos. El grupo 2, de muy buen comportamiento, incluyó 38 aislamientos, 9 de Zelaya y de Estancia Chica, 6 del Instituto Hall, 5 de la Facultad de Agronomía, 4 de Pontevedra, 3 de San Pedro y los aislamientos Gr (*Clonostachys rosea*) y Th (*T. harzianum*). Los restantes grupos, de peor comportamiento (3 a 7) incluyeron seis aislamientos de la Facultad de Agronomía, tres de San Pedro, dos de Zelaya, uno de Estancia Chica y Pontevedra y Tk₂ (*Trichoderma koningii*).

El cladograma de la Figura 33 muestra los resultados del agrupamiento de los índices de esporulación transformados. A partir del gráfico se observan dos grandes grupos, que se confirman por el gran salto que se observa en el R (RSQ= porcentaje de variabilidad explicada por los clusters) al pasar de un grupo a dos. Una partición de grupos mayor lleva a considerar 3 grupos de antagonistas. Sin embargo, como con este número de grupos se siguieron observando diferencias significativas dentro de los mismos, finalmente se decidió considerar la agrupación de antagonistas en 6 grupos más homogéneos, además del grupo sin esporulación. A partir de ese número de grupos quedaron categorizados los

antagonistas de acuerdo a como se presenta en la Tabla 20. El grupo inferior y con mayor número de aislamientos en el dendrograma (Figura 33) corresponde al de mejor comportamiento (grupo 2 de la Tabla 20) después del grupo que no permitió la esporulación de ***B. cinerea*** (grupo 1 de la Tabla 20).

Tabla 20: Grupos de cepas del filoplano según su comportamiento antagónico frente a *B. cinerea* sobre discos de hojas de rosal. A partir del grupo 2 son valores transformados (índice de esporulación).

Grupo 1

Cepa	Índice de esporulación (Peng y Sutton, 1991)
IH P1	sin esporulación
IH P2	sin esporulación
Ze H11	sin esporulación
FA T1	sin esporulación
Ze H10	sin esporulación
Ze P1	sin esporulación
Ze P2	sin esporulación
SP H3	sin esporulación
Ze T1	sin esporulación
Ze T7	sin esporulación
Po S1	sin esporulación
Ze H1	sin esporulación
Ze H12	sin esporulación
Ze H7	sin esporulación

Grupo 2

Cepa	Índice de esporulación (Peng y Sutton, 1991)
Ec B8	0,9973
Ze H4	0,9971
Ze H3	0,9971
Po T1	0,9913
Ze H13	0,9908
Ze P5	0,9888
IH T2	0,9869
Ze P3	0,9863
IH T4	0,9805
Ec B1	0,9769
IH H2	0,9748
Gr	0,9746
Ec S9	0,9745
Po P3	0,9745
Ec P1	0,9700

Ze S1	0,9679
FA P4	0,9588
FA T2	0,9547
Ec S12	0,9530
Ec B5	0,9387
IH H1	0,9341
SP T4	0,9341
Ec P3	0,9337
Po S12	0,9160
Ze P5	0,9050
IH P3	0,8967
Po S7	0,8934
IH T3	0,8876
FA B4	0,8850
Ec B7	0,8796
Ze H8	0,8685
FA B1	0,8672
Ze S5	0,8659
Ec S10	0,8550
SP T2	0,8430
SP P5	0,8350
Th	0,8200
FA T7	0,8190

Grupo 3

Cepa	Indice de esporulación (Peng y Sutton, 1991)
SP T3	0,7592
Ec S8	0,7554
Ze S7	0,7497
SP H2	0,7449
Po P1	0,7306
FA S4	0,7240
FA T8	0,6840
Tk ₂	0,6569
FA S7	0,6306

Grupo 4

Cepa	Indice de esporulación (Peng y Sutton, 1991)
FA B5	0,4135

Grupo 5

Cepa	Indice de esporulación (Peng y Sutton, 1991)
FA P3	0,1145
FA P5	0,0770
Testigo Botrytis	0

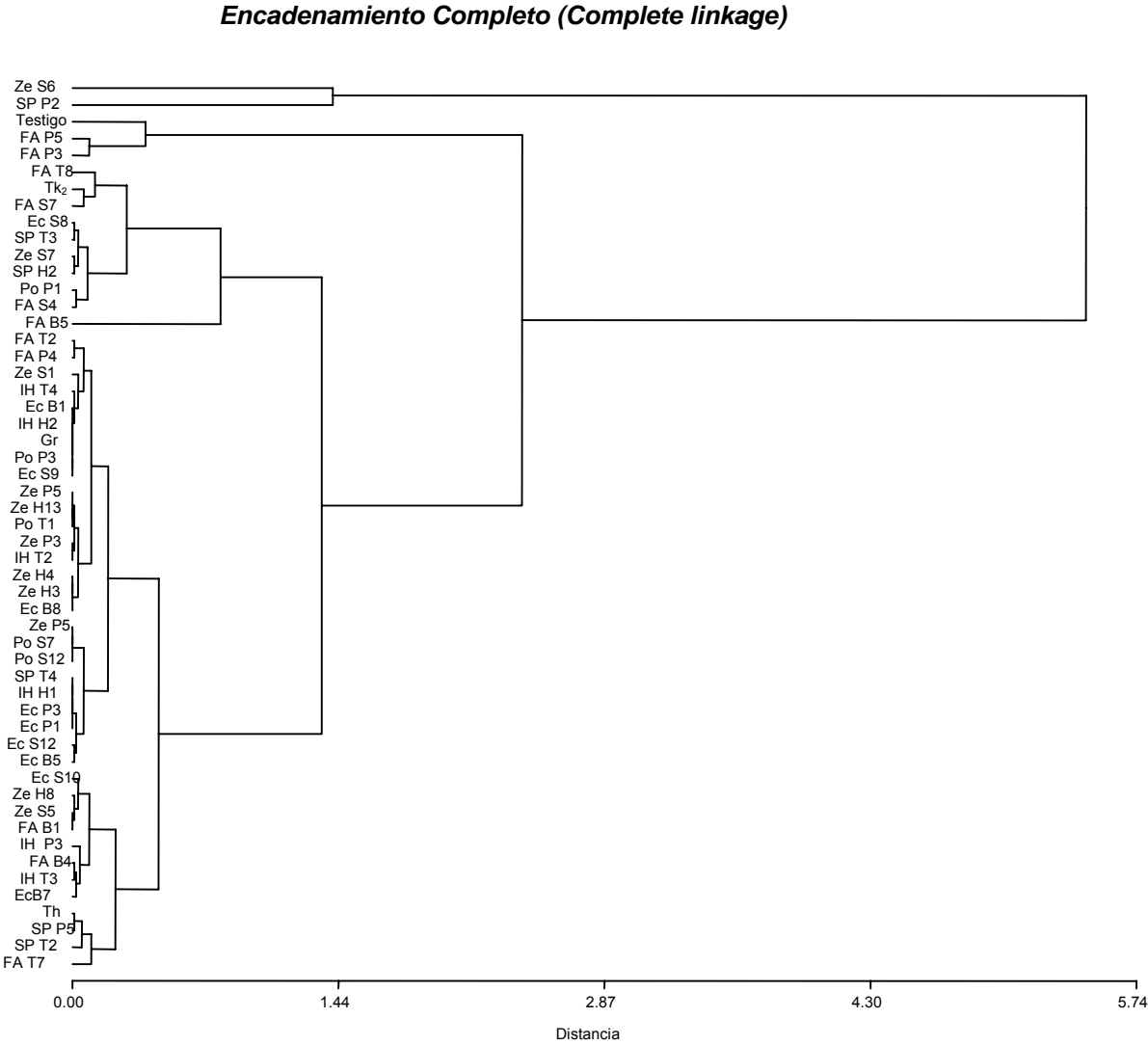
Grupo 6

Cepa	Indice de esporulación (Peng y Sutton, 1991)
SP P2	-0,7642

Grupo 7

Cepa	Indice de esporulación (Peng y Sutton, 1991)
Ze S-6	-1,3759

Figura 33: Dendrograma de las especies del filo plano según su capacidad antagónica frente a *B. cinerea* (valores transformados). No se incluye el grupo 1, que no presentó esporulación).



3.2.3. Preselección *in vitro*

La Tabla 21 resume los promedios de crecimiento de cada una de las cepas, del primer al cuarto día de cultivo. La Tabla 22 resume los promedios de crecimiento de dichas cepas desarrollando en cultivo dual con ***B. cinerea***. La Tabla 23 presenta los valores del crecimiento de ***B. cinerea*** en cultivo dual con las diferentes cepas. Todos los valores están expresados en cm². Se observa en esta tabla que los aislamientos antagonistas utilizados se comportaron en forma diferencial en la inhibición del desarrollo de ***B. cinerea***. Algunos de ellos inhibieron marcadamente su desarrollo, en cambio el crecimiento del patógeno frente a otros aislamientos fue similar al del testigo sin presencia de antagonista, implicando entonces un efecto nulo o reducido.

Tabla 21: Crecimiento diario medio de las cepas del filoplanio de rosal.

Cepa	Crecimiento medio de la colonia (cm ²)			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Ze H4	1.1 a	2.3 a	4.3 a	6.1 a
Gr	1.9 a	4.4 a	5.2 a	6.7 a
Po S12	0.8 a	3.1 a	3.6 a	7.5 a
Ze H10	0.0 a	2.4 a	4.0 a	7.8 a
SP H3	0.8 a	3.3 a	4.8 a	8.8 a
IH P2	1.0 a	2.2 a	2.9 a	9.2 a
Ze P1	2.0 a	3.1 a	8.2 a	12.3 a
SP P2	2.0 a	4.1 a	6.2 a	11.7 a
FA P3	2.2 a	9.9 a	13.7 b	21.9 a
FA B5	2.1 a	6.7 a	13.7 b	24.3 b
Ze S5	1.7 a	5.2 a	14.7 b	24.9 b
SP P5	2.6 a	14.4 b	18.8 b	24.9 b
Ze S6	2.1 a	5.8 a	12.4 a	26.1 b
Ze S1	8.4 c	19.6 c	26.6 c	31.1 c
SP T3	0.0 a	3.8 a	18.9 b	34.5 c
IH H1	0.5 a	40.9 a	20.4 a	39.2 c
FA P5	4.5 b	19.7 c	27.1 c	41.6 c
IH T3	3.8 a	25.3 c	37.0 d	42.5 c
Ze S7	3.6 a	8.4 a	25.4 c	43.2 c
SP H2	3.7 a	9.3 a	26.4 c	43.3 c
Po S7	3.0 a	23.7 c	29.7 c	44.5 c
Ze P5	1.6 a	2.5 a	6.2 a	44.6 c
FA S4	2.5 a	10.3 a	30.9 c	46.7 c
Ec B8	5.0 b	26.2 c	34.5 c	54.8 d
Ze H7	9.1 c	23.9 c	35.5 c	54.9 d
Ze H8	5.5 b	24.9 c	37.0 d	54.9 d
FA T1	6.0 b	27.1 c	43.3 d	57.6 d
Ze P2	2.9 a	18.8 b	27.3 c	57.9 d
Po P3	6.9 b	32.0 c	43.0 d	58.2 d
IH T2	6.4 b	21.8 c	40.6 d	60.5 d
Ze H3	7.4 c	20.4 c	26.6 c	60.7 d
IH P1	0.0 a	2.6 a	4.6 a	61.1 d
Po S1	7.0 b	28.3 c	43.0 d	61.2 d
FA S7	7,1 b	30,2 c	44,1 d	61,2 d
FA T2	8.2 c	30.3 c	45.2 d	61.2 d
Ec S10	9.7 c	31.7 c	47.5 d	62.2 d
Ec S8	8,8 c	32,3 c	47,0 d	62,2 d
SP T2	8.8 c	31.8 c	48.7 d	62.2 d
FA T7	8.3 c	32.2 c	45.4 d	62.5 d
Ec P1	13.7 e	36.7 e	51.5 d	63.2 d
Ze H13	0.6 a	2.3 a	3.6 a	63.6 d
Ze T1	0.5 a	6.4 a	39.2 d	63.6 d
Ze T7	0.8 a	9.2 a	38.7 d	63.6 d
Ec B5	6.4 b	25.4 c	42, d	63.6 d
Ze P3	6.4 b	21.2 c	43.6 d	63.6 d
Po P1	8.3 c	26, C	43.6 d	63.6 d
Ec P3	5.1 b	29, C	44.4 d	63.6 d
FA B4	6,4 b	27,2 c	46,4 d	63,6 d
IH H2	6.0 b	24.1 c	45.5 d	63.6 d
Ec S12	8.1 c	26.3 c	47.8 d	63.6 d
FA T8	8.8 c	29.0 c	47.9 d	63.6 d
Ze H1	11.0 d	26.0 c	49.1 d	63.6 d
SP T4	5.8 b	31.6 c	49.1 d	63.6 d

FA P4	9.8 c	37 d	49.1 d	63.6 d
Ec B7	5.8 b	24.8 c	49.7 d	63.6 d
Ec S9	15.5 e	39.7 d	49, d	63.6 d
IH P3	5.8 b	25.2 c	49.8 d	63.6 d
FA B1	4.7 b	23.9 c	50.5 d	63.6 d
Th	12.2 d	44.7 d	52.6 e	63.6 d
IH T4	11.7 d	39.6 d	53.5 e	63.6 d
Po T1	18.2 f	41.3 d	54.1 e	63.6 d
Ze H12	14.5 e	44.6 e	54.4 e	63.6 d
Ec B1	9.1 c	39.4 d	55.9 e	63.6 d
Tk ₂	12.1 d	41.1 d	57.2 e	63.6 d
Ze H11	30.4 g	59.5 e	60.5 e	63.6 d

Tabla 22: Crecimiento diario medio de las cepas del filoplano de rosal en cultivos duales con *B. cinerea*

Cepa	Crecimiento medio de la colonia (cm ²)			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
IH P2	0.0 a	2.7 a	3.3 a	3.3 a
Ze P5	0.0 a	2.3 a	3.2 a	3.6 a
Ze H10	1.6 a	2.5 a	2.7 a	4.1 a
Ze H4	0.0 a	2.7 a	5.1 a	6.7 a
Gr	1.5 a	2.5 a	6.6 a	7.5 a
SP P2	1.2 a	3.7 a	7.5 a	13.7 b
SP T3	0.9 a	2.7 a	7.6 a	13.7 a
Po S12	0.0 a	3.2 a	12.9 a	14.1 a
Ze H13	1.4 a	5.3 a	6.9 a	14.1 b
Ze T1	0.0 a	3.4 a	12.1 b	14.3 b
Ec B5	4.5 b	15.8 b	16.7 b	17.5 b
Ec B7	7.6 c	16.0 b	16.7 b	17.8 b
Ze S6	3.3 b	9.0 a	17.1 b	18.6 b
SP P5	1.4 a	7.1 a	12.1 b	20.2 b
FA S4	1.4 a	7.3 a	7.6 a	25.5 b
FA S7	2.8 a	24.1 c	25.4 c	30.1 c
Ze T7	0.9 a	3.9 a	23.2 c	30.2 c
SP T2	3.3 b	17.0 b	26.1 b	30.2 c
FA P4	4.0 b	20.2 c	22.2 c	33.5 c
Ec S12	3.0 a	16.5 b	26.0 c	34.0 c
Ze H8	7.5 c	16.3 b	28.0 c	34.2 c
Ec B8	3.3 b	26.9 c	30.1 c	36.2 c
Ze S7	2.4 a	7.7 a	18.3 b	37.0 c
SP H2	2.4 a	7.8 a	19.2 b	37.2 c
FA P3	2.4 a	7.9 a	26.2 c	37.4 c
FA B5	2.4 a	7.8 a	20.3 b	37.7 c
FA T2	4.1 b	21.1 c	31.2 c	38.2 c
IH T3	3.4 b	22.7 c	34.8 c	39.2 c
Ze S1	4.1 b	17.3 b	24.5 b	39.4 c
Po P3	7.7 c	27.6 c	41.0 d	42.7 c
FA T1	5.5 b	33.0 c	39.1 d	42.9 c
FA P5	8.2 c	38.5 d	41.1 d	46.7 c
Ec S9	8.1 c	41.2 d	44.3 d	47.5 c
Ec S10	13.7 e	41.2 d	47.7 d	50.72
Ze S5	2.1 a	7.8 a	15.6 b	51.4 d
FA B1	2.8 a	13.0 b	29.2 c	51.5 d
SP H3	11.7 d	43.9 d	38.6 d	53.1 d
Ze P2	4.1 b	17.9 b	31.7 c	54.3 d
Ze H7	9.5 c	39.9 d	46.6 d	54.7 d
Ec P3	5.7 b	31.2 c	32.0 c	56.3 d
FA B4	7.6 c	17.1 b	37.2 d	57.2 d
Po S7	8.2 c	31.2 c	38.3 d	55.4 d
Ze H1	9.1 c	37.6 d	45.9 d	55.7 d
Ec P1	8.7 c	36.1 d	46.6 d	56.8 d
Ec S8	6.1 b	31.1 c	44.4 d	58.3 d
Po S1	6.6 b	28.4 c	31.9 c	59.0 d
Tk ₂	8.0 c	38.6 d	42.6 d	59.6 d
SP T4	5.4 b	28.0 c	36.9 d	60.6 d
Ze P3	4.1 b	23.9 c	34.3 c	61.5 d
IH H1	1.0 a	2.2 a	27.9 c	63.6 d

IH H2	4.8 b	17.1 b	33.5 c	63.6 d
Po T1	9.6 c	39.9 d	41.9 d	63.2 d
Ze H3	1.1 a	30.2 c	43.4 d	63.6 d
Th	9.4 c	40.7 d	45.4 d	63.6 d
IH T2	11.5 d	23.1 c	45.7 d	63.6 d
IH P3	10.1 c	45.4 d	46.6 d	63.6 d
IH T4	8.5 c	32.9 c	46.9 d	63.6 d
FA T7	9.5 c	40.5 d	47.2 d	63.6 d
Ze H12	9.4 c	41.1 d	47.3 d	63.6 d
IH P1	0.4 a	3.9 a	63.6 e	63.6 d
Po P1	6.4 b	26.0 c	63.6 e	63.6 d
Ze P1	1.1 a	30.2 c	63.62 e	63.6 d
FA T8	6.4 b	30.5 c	63.6 e	63.6 d
Ze H11	6.4 b	51.8 e	63.6 e	63.6 d

Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)
+1: antagonista desarrollando en cultivo puro. 2: antagonista desarrollando en cultivo dual con *B.cinerea*

Tabla 23. Crecimiento de *B. cinerea* en cultivo dual con las diferentes cepas del filoplanos de rosal

Cepa	Crecimiento medio de la colonia (cm ²)			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Po P1	10.2 a	19.3 a	20.0 a	19.7 a
Ze H12	12.0 a	15.0 a	19.3 a	20.3 a
IH T2	8.8 a	11.0 a	19.7 a	21.1 a
Ze H11	11.1 a	18.4 a	21.8 a	21.8 a
Ze H10	14.3 a	19.3 a	21.9 a	21.9 a
Th	14.1 a	19.4 a	23.5 a	22.1 a
Ze S6	9.0 a	17.8 a	20.4 a	22.2 a
Ec P1	12.4 a	18.9 a	22.7 a	24.9 a
SP H3	10.4 a	18.9 a	23.0 a	25.2 a
Ec P3	4.8 a	20.4 a	24.5 a	25.7 a
Tk ₂	10.2 a	22.7 a	24.6 a	25.8 a
Ze P3	11.7 a	21.6 a	24.8 a	25.9 a
Ze T7	13.5 a	22.4 a	25.1 a	26.3 a
IH T3	16.7 a	26.3 a	26.9 a	27.3 a
Ec S9	18.2 a	35.2 a	27.0 a	27.5 a
Ze H7	10.5 a	17.9 a	25.3 a	27.6 a
IH P3	16.0 a	25.8 a	26.2 a	27.6 a
FA P4	8.9 a	16.9 a	26.6 a	27.6 a
Ec B1	11.1a	19.7a	27.1 a	27.7 a
Ze H1	15.5 a	26.8 a	27.7 a	27.9 a
Po S7	12.3a	22.1a	27.1a	28.1a
Ze H4	14.7 a	24.9 a	27.0 a	29.1 a
Po P3	13.9 a	24.4 a	28.7 a	29.4 a
SP T4	13.4 a	26.6 a	29.4 a	30.0 a
Ze S5	11.3 a	17.7 a	30.3 a	30.3 a
FA T7	13.5 a	21.4 a	30.3 a	30.7 a
FA T2	13.3a	23.2a	29.8a	30.9a
IH T4	16.5 a	28.9 a	30.5 a	31.2 a
FA P5	16.2 a	21.5 a	30.6 a	31.7 a
Ec B8	12.4 a	29.4 a	32.8 a	31.9 a
IH H2	9.9 a	22.6 a	31.7 a	32.1 a
Ze P2	13.2 a	24.5 a	30.7 a	32.5 a
Ze S1	10.1 a	22.9 a	29.3 a	32.7 a
Po T1	19.7 a	31.2 a	31.8 a	32.8 a
Ec S8	14.4 a	20.8 a	29.8 a	33.1 a
FA P3	19.2 a	20.9 a	25.5 a	33.2 a
FA B5	12.3 a	20.7 a	30.6 a	34.2 a
FA S7	10.6 a	17.5 a	33.8 b	35.3 a
Ze T1	10.3 a	31.9 a	34.5 b	34.5 a
FA T1	17.0 a	30.3 a	35.1 b	35.1 a
IH P2	16.8 a	30.2 a	37.5 b	35.8 a
Po S1	14.5 a	9.7 a	35.4 b	35.8 a
Ec S12	12.2 a	22.3 a	32.1 a	36.0 a
Ec B7	16.3 a	19.7 a	19.7 a	38.1 a
Ze H8	12.2 a	19.4 a	25.4 a	28.2 a
FA B4	15.4 a	22.3 a	27.3 a	38.3 a
SP T3	16.3 a	25.7 a	31.0 a	38.3 a
Ze P5	11.3 a	25.9 a	38.3 b	38.8 a
Po S12	16.2 a	27.4 a	38.2 b	40.5 b
IH P1	38.1 b	40.5 b	40.5 b	40.5 b
Ec S10	15.1 a	38.5 b	40.4 b	41.7 b
SP T2	12.7 a	22.8 a	40.4 b	42.4 b
SP P5	12.5 a	27.5 a	41.2 b	42.4 b
Ze H3	12.9 a	41.7 b	42.5 b	42.5 b
Ze H13	9.4 a	25.4 a	38.1 b	44.6 b
FA S4	24.7 b	37.7 b	41.4 b	44.8 b
Gr	21.2 a	38.2 b	43.1 b	44.8 b
IH H1	21.5 a	43.6 b	45.9 b	46.1 b
FA B1	35.8 b	49.5 b	49.7 c	50.4 c
SP P2	36.1 b	47.2 b	50.1 c	51.8 c
FA T8	34.3 b	44.4 b	50.7c	52.1c
Ze S7	44.5 b	47.4 b	51.2 c	52.4 c
SP H2	40.2 b	47.8 b	51.4 c	52.4 c
Ec B5	36.0 b	50.9 b	52.4 c	52.5 c

Ze P1	43,8 b	50,7 b	53,4 b	54,1 c
TEST B	44,5 b	53,1 b	59,9 c	60,3 c

Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

3.3. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE MICRO-ORGANISMOS ANTAGONISTAS DE *B. cinerea* EN PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE FUNGICIDAS.

OBJETIVOS

- Evaluar el comportamiento de micro-organismos, previamente seleccionados como potenciales antagonistas de *Botrytis cinerea*, sobre tejidos de rosal, en presencia de diferentes diluciones de varios fungicidas.

HIPÓTESIS

- Los microorganismos seleccionados como potenciales antagonistas de *Botrytis cinerea* presentan un comportamiento diferencial frente a diferentes dosis de diversos fungicidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron nueve antagonistas pertenecientes a los géneros *Trichoderma* y *Penicillium*, entre los de mejor comportamiento preseleccionados por su capacidad para inhibir la esporulación de *B. cinerea* sobre discos de hojas de rosal. El listado de los mismos se presenta en la Tabla 24.

Tabla 24: Cepas de antagonistas de *B. cinerea* utilizadas en los ensayos de comportamiento frente a fungicidas.

Antagonista	Nombre	Identificación
1	<i>Penicillium sp.</i>	FA T1
2	<i>Penicillium sp.</i>	IH P1
3	<i>Trichoderma sp.</i>	SP H3
4	<i>Penicillium sp.</i>	Ze H4
5	<i>Penicillium sp.</i>	Ze H10
6	<i>Trichoderma sp.</i>	Ze H12
7	<i>Trichoderma sp.</i>	Ze H13
8	<i>Penicillium sp.</i>	Ze P1
9	<i>Penicillium sp.</i>	Ze T1

Los fungicidas empleados fueron: Rovral (principio activo Iprodione 50%), Captan Tomen (principio activo Captan 80%), Chemcarb (Carbendazim 50%) y Euparem multi (Tolifluanid 50%) en diluciones de 100, 1.000 y 10.000 ppm en agua destilada estéril. La Tabla 25 resume las características de los fungicidas utilizados.

Tabla 25: Características de los fungicidas utilizados en los ensayos (CASAFE, 2005)

Marca Comercial	Rovral	Captan Tomen	Chemcarb	Euparem Multi 50 WG
Empresa	Rhone Poulenc	Arvesta Corporation	Chemiplant	Bayer S.A.
Principio activo	Iprodione	Captan	Carbendazim	Tolilfluanid
Formulación	Polvo mojable	Polvo mojable	Suspensión concentrada	Polvo mojable
Concentración	50%	80%	50%	50%
Clasificación química	Dicarboximida	Dicaboximida (ftalamida)	Bencimidazol	Sulfamida
Acción	Contacto	Contacto, preventivo y curativo	Sistémica, preventiva y curativa	Preventiva y curativa
Uso	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida
Absorción	Por raíces		Por órganos verdes y raíces	
Riesgo ambiental	Virtualmente no tóxico para abejas. Ligeramente tóxico para aves y peces	No tóxico para abejas. En las condiciones de uso, no afecta la vida silvestre	Virtualmente no tóxico para abejas. Prácticamente no tóxico para aves. Moderadamente no tóxico para peces.	Virtualmente no tóxico para abejas. Prácticamente no tóxico para aves. Extremadamente tóxico para peces.
Clase toxicológica	IV: normalmente no ofrece peligro	IV: normalmente no ofrece peligro	IV: normalmente no ofrece peligro	IV: normalmente no ofrece peligro

Se utilizó la metodología de Ortíz Molinuevo et al. (1995). Cada antagonista se sembró en una caja de Petri de 10 cm de diámetro conteniendo 12 ml de agar papa glucosado 2% pH 7 (APG). A los 7 días se extrajeron con un sacabocados discos de APG de 10 mm de diámetro con el desarrollo del antagonista. Los discos

de cada aislamiento se sembraron en el centro de una caja de Petri de 10 cm de diámetro conteniendo 12 ml de APG con un fungicida a una dilución dada. Se realizaron 6 repeticiones por combinación fungicida-dilución. Como testigos se sembraron discos de los hongos antagonistas sobre APG sin agregado de fungicida.

Las mediciones del crecimiento se realizaron diariamente hasta los 7 días desde la siembra. Se calcaron sobre papel la superficie cubierta por los hongos desde las bases de las cajas de Petri, se recortaron los discos de papel correspondientes a cada observación y se midieron las superficies cubiertas utilizando un medidor de área foliar. Los datos se analizaron mediante el esquema de un experimento factorial, en un diseño completamente al azar y contrastes entre medias (Westfall et al., 1999) y fueron procesados mediante el programa estadístico SAS (SAS, 1996). Se analizó la variable respuesta, superficie de crecimiento del antagonista, para cada antagonista y cada día. El análisis se realizó en dos etapas, con sendos contrastes ortogonales. Primero se realizó el contraste del tratamiento control versus el resto de los tratamientos y en segundo término se analizó el resto de los tratamientos mediante un análisis de la variancia multifactorial en un diseño completamente aleatorizado. Se realizó, cuando fue necesario, el método de comparaciones múltiples de Tukey. Todas las pruebas se concluyeron al nivel de significación de 0,05.

RESULTADOS

En la Figura 34 se grafica el crecimiento diario de cada cepa para cada combinación fungicida-dosis. Las Tablas 26 a 30 muestran los resultados para el último día de medición. La Tabla 26 agrupa a los antagonistas para los cuales se detectó interacción fungicida-dosis. Las Tablas 27 y 28 presentan los resultados obtenidos para la cepa 146 P1, para la cual no se detectó interacción fungicida-dosis sino efectos de los fungicidas y efectos de las dosis. La Tabla 29 corresponde al crecimiento medio de la cepa 161 H12, para la cual no se detectaron interacción fungicida-dosis, efectos de los fungicidas ni efectos de las dosis. La Tabla 30 muestra el crecimiento medio del antagonista 161 P1, cuyo crecimiento sólo fue afectado por las distintas dosis de fungicidas.

Se observó un comportamiento diferencial de los antagonistas ensayados, frente a los distintos fungicidas empleados y las diferentes dosis de ensayo. Captan fue el único fungicida en presencia del cual todos los antagonistas mostraron desarrollo miceliar. En presencia del fungicida Rovral, el crecimiento de la mayoría de los antagonistas fue inhibido, a excepción de dos cepas de *Penicillium* spp.. Por otra parte, el fungicida Chemcarb inhibió el crecimiento miceliar de dos cepas de *Penicillium* spp., en tanto que en presencia del fungicida Tolifluanid fueron inhibidos en su crecimiento una cepa de *Penicillium* sp. y otra de *Trichoderma* sp.. Se observaron desarrollos significativos de cepas de *Penicillium* spp. en presencia de los fungicidas Rovral, Captan o Tolifluanid, fundamentalmente a las dosis intermedias y menores ensayadas.

Tabla 26: Superficie media de crecimiento de FA T1, SP H3, Ze H4, Ze H10, Ze H13 y Ze T1 al 6° día de cultivo en APG con diferentes dosis de distintos fungicidas.

Tratamiento	Superficie media (cm ²)					
	FA T1	SP H3	Ze H4	Ze H10	Ze H13	Ze T1
Rovral 100 ppm	4,81 a	0 a	17,46 a	4,93 c	0 a	0 a
Rovral 1000 ppm	0 a	0 a	1,70 a	0 a	0 a	0 a
Rovral 10000 ppm	0 a	0 a	2,57 a	0 a	0 a	0 a
Captan 100 ppm	69,95 c	5,66 cd	69,95 b	0 a	4,98 bc	6,64 de
Captan 1000 ppm	30,23 b	4,04 bcd	69,95 b	2,43 abc	4,54 bc	5,47 cd
Captan 10000 ppm	0 a	2,35 ab	42,30 b	2,10 ab	3,60 b	3,68 bc
Chemcarb 100 ppm	0 a	5,45 cd	0 a	4,79 bc	5,36 cd	3,64 bc
Chemcarb 1000 ppm	0 a	5,19 cd	0 a	4,48 bc	4,33 bc	2,49 b
Chemcarb 10000 ppm	0 a	3,38 bc	0 a	3,20 bc	3,95 bc	4,36 bc
Tolifluanid 100 ppm	65,14 c	4,29 bcd	69,95 b	5,11 c	6,73 d	7,50 e
Tolifluanid 1000 ppm	0 a	6,17 d	69,95 b	0 a	0 a	0 a
Tolifluanid 10000 ppm	69,95 c	0,40 a	10,30 a	0 a	0 a	0 a

Letras iguales implican que no hay diferencias significativas entre tratamientos, dentro de cada columna.

Tabla 27: Superficie media de crecimiento de IH P1 al 6° día de cultivo en APG con diferentes dosis de distintos fungicidas.

Fungicida	Superficie media de IH P1 (cm ²)
Tolifluanid	0,46 a
Captan	4,10 b
Chemcarb	5,24 c

Letras iguales implican que no hay diferencias significativas entre tratamientos

Tabla 28: Superficie media de crecimiento de Ze P1 al 6° día de cultivo en APG con diferentes dosis de distintos fungicidas.

Dosis	Superficie media de Ze P1 (cm ²)
10000ppm	2,43 a
1000ppm	2,54 a
100 ppm	4,14 b

Letras iguales implican que no hay diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 29: Superficie media de crecimiento de Ze H12 al 6° día de cultivo en APG con diferentes dosis de distintos fungicidas.

Dosis	Rovral	Captan	Chemcarb	Tolifluanid	Medias de dosis
100 ppm	16,88	27,24	4,35	0	11,68
1.000 ppm	0	25,80	4,32	0	7,67
10.000 ppm	0	0	4,00	0	0,74
Medias de fungicidas	4,22	17,68	4,04	0	6,62

Tabla 30: Superficie media de crecimiento de Ze P1 al 6° día de cultivo en APG con diferentes dosis de distintos fungicidas.

Dosis	Superficie media de Ze P1 (cm ²)
10000ppm	3,95 a
1000ppm	6,41 b
100 ppm	7,62 b

Letras iguales implican que no hay diferencias significativas entre tratamientos.

3.4. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ANTAGONISTAS SOBRE TALLOS DE ROSAL.

OBJETIVOS

- Evaluar a lo largo del tiempo la capacidad de control de *B. cinerea* en tallos de rosal por hongos antagonistas (géneros *Trichoderma* y *Penicillium*), seleccionados por su capacidad antagónica y de desarrollo en medios de cultivo conteniendo fungicidas.

HIPÓTESIS

- El atizonamiento de los rosales ocasionado por *B. cinerea* puede ser controlado biológicamente a través de la aplicación de antagonistas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La eficiencia se evaluó utilizando tres de los mejores antagonistas evaluados en etapas anteriores: Ze H-12; Ze H-10; SP H-3, de los cuales el primero corresponde al género *Trichoderma* sp., y los dos restantes al género *Penicillium* spp. Se utilizó la cepa de *B. cinerea* obtenida del cultivo Shigenawa y cuya patogenicidad fue probada en la primera parte de este trabajo.

Los tratamientos incluyeron pulverizaciones con suspensión de esporas del patógeno y de los posibles antagonistas. El testigo fue pulverizado con agua destilada estéril.

Los tratamientos fueron:

T1. agua (testigo)

T2. ***B. cinerea***

T3. Los tres antagonistas y ***B. cinerea***

T4. El aislamiento SP H3

T5. El aislamiento SP H3 y ***B. cinerea***

T6. El aislamiento Ze H10

T7. El aislamiento Ze H10 y ***B. cinerea***

T8. El aislamiento Ze H12

T9. El aislamiento Ze H12 y ***B. cinerea***

Se utilizaron tallos de rosas de origen nacional (mezcla de variedades sin identificar), compradas en el Mercado de Flores de la Ciudad de Buenos Aires. Se eliminaron las flores y se utilizaron las varas con heridas de la poda. Cada vara de 200 mm de longitud, fue colocada en un tubo de ensayo de 16 mm de diámetro y 150 mm de longitud, que a su vez se cubrió con otro tubo de 20 mm de diámetro, para evitar que las esporas sean dispersadas de un tratamiento a otro contiguo. Cada conjunto tallo-tubo constituyó una unidad experimental. Los tratamientos se asignaron siguiendo un diseño en bloques completos aleatorios, asegurando condiciones homogéneas de humedad y temperatura a los tubos que constituyen un mismo bloque. Cada bloque estuvo integrado por nueve unidades experimentales colocadas en un soporte cuadrado de madera de pino de 12 centímetros de lado (Fig. 35a y b). Éstos a su vez se distribuyeron de a tres dentro de cajas de plástico con tapa (Fig 35c y d). En total se realizaron 18 repeticiones por tratamiento. Las 6 cajas se incubaron en estufa a 20°C, manteniendo humedad cercana a la saturación (Fig 35e). Previo a la inoculación los tallos fueron desinfectados superficialmente sumergiéndolos 3 minutos en alcohol 70%, 3 minutos en hipoclorito de sodio al 0,2% y lavados durante 3 minutos en agua destilada estéril. Posteriormente se inocularon los antagonistas sobre el extremo superior de las varas, con pulverizaciones de suspensiones de esporas en agua destilada estéril a una concentración de 10^5 conidios ml^{-1} . Luego de 24 hs se inoculó ***B. cinerea***, sumergiendo el extremo superior de los tallos en una suspensión de 10^7 ml^{-1} esporas en agua destilada estéril.

Se evaluó el desarrollo del patógeno en los distintos tratamientos, midiendo el avance longitudinal del tejido necrosado y del micelio del patógeno sobre los tallos a la precisión del milímetro, utilizando un calibre. Las mediciones se hicieron cada 48 hs, llegando a 12 mediciones. Los datos de las medidas repetidas a lo largo del tiempo fueron analizados empleando un modelo mixto.

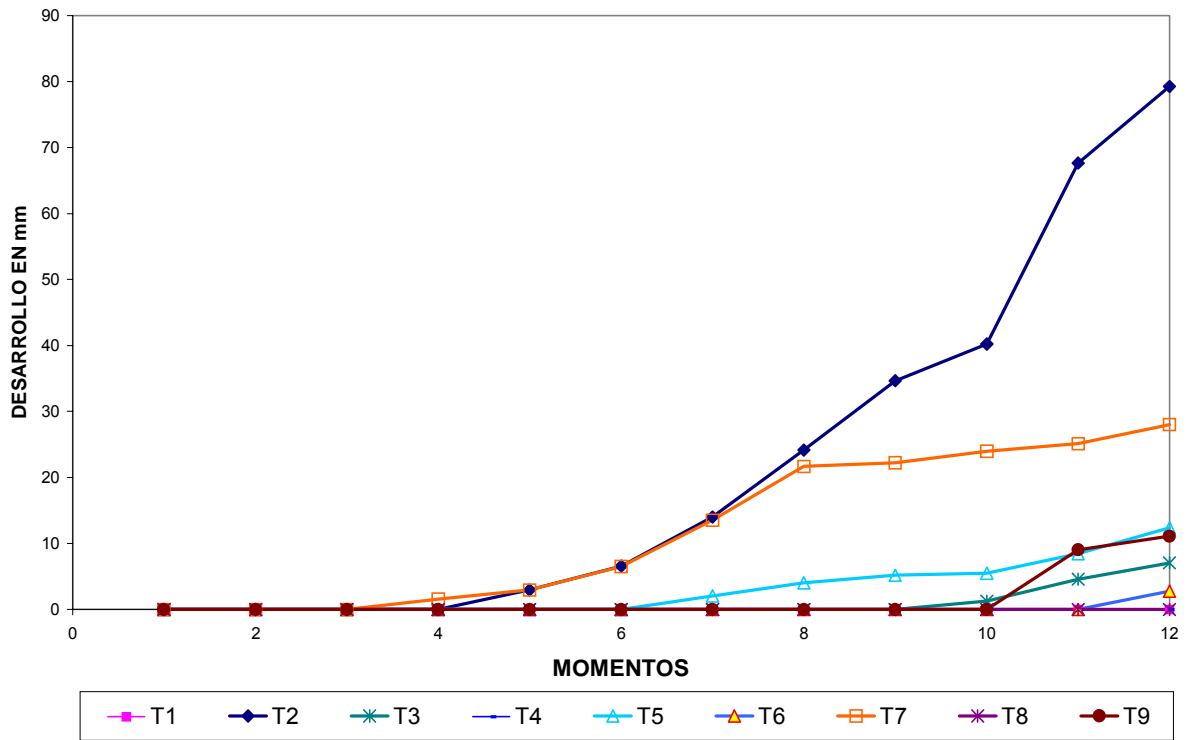
Hay dos pasos básicos en el análisis de medidas repetidas usando la metodología de modelos mixtos. El primer paso fue modelar la estructura de covariancia correspondientes al error y a tallos. Las estructuras de covariancia fueron comparadas objetivamente usando el criterio de Akaike (Wolfinger y Chang, 1995), seleccionando aquella estructura que presentara el mayor valor. El segundo paso fue analizar la tendencia en el tiempo para los tratamientos estimando y comparando medias. Las estructuras de covariancia probadas fueron: simetría compuesta, autoregresiva y no estructurada.

RESULTADOS

En el análisis de los datos se descartaron los 4 primeros momentos de observación ya que el desarrollo del patógeno fue nulo en todos los tratamientos y esto no aportaba ninguna información al análisis, dificultando el manejo de los datos. También se descartaron los tratamientos correspondientes al testigo general (tratamiento 1) y a los testigos de los antagonistas (tratamientos 4, 6 y 8) que, como se esperaba, no tuvieron crecimiento del patógeno.

En la Figura 36 se muestran las tendencias observadas con el tiempo para los 9 tratamientos en estudio. Se observa un incremento muy marcado, de tipo exponencial, en el desarrollo de *B. cinerea* en el tratamiento testigo sin antagonista. Este desarrollo es similar al del tratamiento Ze H10 hasta el momento 8 de evaluación. A partir de allí, el desarrollo de síntomas en el tratamiento Ze H10 se estabiliza. El resto de los tratamientos se comportaron en forma similar a través del tiempo, con menor desarrollo del patógeno. La Fig. 37a muestra el tratamiento 2 (inoculado con *B. cinerea*) al momento de inocular y a los 10 días. La Fig 37b muestra el tratamiento 1 (control sin inocular) y el tratamiento 9 (inoculado con el antagonista Ze H12 y *B. cinerea*), ambos a los 10 días.

Figura 36: Tendencia del avance del atizonamiento de tallos de rosal a través del tiempo



Análisis utilizando un modelo mixto

La Tabla 31 presenta los resultados del análisis de los efectos. La interacción momento por tratamiento resultó significativa por lo que se compararon las medias de los tratamientos en cada momento (Tabla 32) y los distintos momentos para cada tratamiento (Tabla 33). Se observa que recién a partir del día 11 el antagonista Ze H10 se diferencia significativamente del control, mientras que el resto de los antagonistas y la mezcla de los tres presentan un desarrollo promedio significativamente inferior al control a partir del día 6.

Tabla 31: Resultados del análisis de variancia del modelo mixto con matriz de covariancia no estructurada.

Fuente de Variación	F	Pr > F
Tratamiento	6,74	< 0,0001
Momento	5,39	< 0,0001
Momento x Tratamiento	2,60	0,0004

Tabla 32: Comparación de medias de desarrollo de *B. cinerea* en mm mediante análisis de diseño de modelo mixto en distintos momentos de observación.

Tratam.	Día5	Día6	día7	Día8	Día9	día10	Día11	día12
T2	2,94a	6,56a	14 ^a	24,17a	34,67a	40,22a	67,67a	79,28a
T3	0a	0b	0b	0b	0c	1,28c	4,61b	7,056b
T5	0a	0b	2,06b	4,06b	5,17bc	5,5bc	8,44b	12,39b
T7	2,94a	6,5a	13,5 ^a	21,67a	22,2ab	24ab	25,11b	28,06b
T9	0a	0b	0b	0b	0c	0c	9,06b	11,11b

Letras distintas por columna indican diferencias significativas entre tratamientos

En la Tabla 33 se compararon los distintos momentos dentro de cada tratamiento. Los resultados confirman lo observado en el gráfico de perfiles (Figura 36). El tratamiento control presenta un crecimiento sostenido de *B. cinerea*, que se

manifiesta en una diferencia significativa entre todos los momentos sucesivos. En cambio, en los tratados con los antagonistas el desarrollo no fue significativo a lo largo del tiempo, con excepción del tratamiento Ze H10 que manifestó un crecimiento sostenido hasta el momento 8 en que llegó a un plateau.

Tabla 33: Comparación de medias de desarrollo del tizón del rosal causado por *B. cinerea* en mm a través del tiempo.

Trat.	Día5	Día6	Día7	Día8	Día9	día10	Día11	día12
T2	2,94h	6,56g	14f	24,17e	34,67d	40,22c	67,67b	79,28a
T3	0a	0a	0a	0a	0a	1,28a	4,61a	7,056a
T5	0a	0a	2,06 ^a	4,06 ^a	5,17a	5,5a	8,44a	12,39a
T7	2,94d	6,50c	13,5b	21,67 ^a	22,22a	24,0a	25,11ab	28,06ab
T9	0a	0a	0a	0a	0a	0a	9,06a	11,11a

Letras distintas por fila indican diferencias significativas entre momentos dentro de cada tratamiento

3.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.

3.5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Se identificaron las especies mediante el análisis micromorfológico de las cepas y la utilización de las claves taxonómicas correspondientes.

Las cepas de *Penicillium* fueron cultivadas en Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA; Pitt, 1973) a 0, 25 y 37°C, 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N; Pitt, 1973) y Malt Extract Agar (MEA; Blakeslec, 1915). Se utilizó el método de inoculación en placas (Pitt, 1974). Se realizaron siembras en 3 puntos en cajas de Petri de 9 cm de diámetro (5 cajas por aislamiento) utilizando 0,2-0,4 ml de una suspensión semisólida de agar esterilizada contenida en un tubo pequeño con tapa a rosca (de hemólisis). Se tomaron propágulos de cada cultivo con una aguja histológica, se mezclaron introduciendo la aguja en la suspensión y se inocularon las placas. Las cepas se mantuvieron en MEA (Pitt 1979). La identificación se realizó en base a cultivos de 7 días con las claves de Pitt (1973, 1974, 1979, 2000) y Pitt y Hocking (1997). La cepa de *Trichoderma* fue cultivada a 25 ° en MEA e identificada en base a las claves de Rifai (1969), Bisset (1984, 1991a, 1991b, 1991c, 1992) y Samuels (1996). Se utilizó la carta de colores de Rayner (1970).

3.5.2 RESULTADOS

El aislamiento Ze H10 presenta conidióforos libres, erectos, terminando en pincel. Es biverticilado, correspondiendo entonces al subgénero *Biverticillium* Dierckx. No presentó coremios ni sinemas. El desarrollo de las colonias en MEA alcanzó los 35-45 mm de diámetro a los 7 días (Fig. 38). En CYA a 25ª desarrolló colonias de 25-30 mm de diámetro con pigmentación roja (Fig 38.), a 5º no se observó desarrollo y a 37°C desarrolló colonias de 12-17 mm. En G25N las colonias fueron de 5-10 mm. (Fig. 38). Los conidios son subesféricos, de 3-3,5 mm de longitud, con paredes verrucosas. Las

mencionadas características corresponden a *Penicillium purpurogenum* Stoll (Pitt 1973, 1974, 1979, 2000; Pitt y Hocking, 1997). La Fig. 39 muestra los conidióforos y conidios de *P. purpurogenum*.

El aislamiento SP H3 presenta conidióforos libres, erectos, terminando en pincel. Es biverticilado, correspondiendo entonces al subgénero *Biverticillium* Dierckx. No presentó coremios ni sinnemas. El desarrollo de las colonias en MEA alcanzó los 40-45 mm de diámetro a los 7 días (fig. 40). En CYA a 25° desarrolló colonias de 35 a 45 mm de diámetro (Fig. 40), a 5° no se observó desarrollo y a 37°C desarrolló colonias de 5-10 mm. En G25N el desarrollo a los 7 días fue de 5-10 mm de diámetro (Fig. 40). Los conidios son apiculados, con paredes lisas, de 2-2,5 x 2,5-3,2 μm . Las características mencionadas corresponden a *Penicillium minioluteum* Dierckz (Pitt 1973, 1974, 1979, 2000 y Pitt y Hocking, 1997). La Fig. 41 muestra los conidióforos de *P. minioluteum*.

El aislamiento Ze H 12 presentó colonias verdosas de 6-8 cm de diámetro después de 3 días a 20°C. El revés de las colonias presentó una coloración amarillenta. No se observó la presencia de clamidosporas. Los conidióforos son hialinos, con paredes lisas, las ramas principales son largas y flexuosas, las laterales en ángulos cercanos al recto, flexuosas, de a pares, ramificándose en forma repetida de a pares, con ramas cada vez más cortas hacia el extremo del conidióforo. Toda la estructura del conidióforo presenta aspecto piramidal. Las fiálides son curvadas de 7-12 x 2,7-3,0 μm , angostándose abruptamente en el extremo portador del conidio. Los conidios son unicelulares, de color verde intenso, de pared lisa, subglobosos de 3,2 x 2,9 μm en promedio, presentándose en forma agregada en el extremo de las fiálides. Las características mencionadas corresponden a *Trichoderma atroviride* Karsten, según Bissett (1992). La Fig. 42 muestra el desarrollo de la colonia de *T. atroviride* en MEA y APG.

3.6. DISCUSIÓN

Los mejores antagonistas de *B. cinerea* (solos o con fungicida) fueron cepas de *Tichoderma atroviride* y *Penicillium minioluteum*. A partir de la metodología desarrollada por Peng y Sutton (1991) pudieron obtenerse aislamientos de posibles antagonistas a efectos de iniciar la selección e determinar cuales son los de mejor comportamiento antagónico frente a *B. cinerea*.

En este estudio no se observó diversidad en la micoflora fúngica asociada al filoplano de rosal, dado que la mayoría de los aislamientos correspondieron a los géneros *Penicillium* y *Trichoderma*. En cambio Lopez et al. (1998) y Rivera et al. (1998) obtienen una colección de cepas que muestra una diversidad de poblaciones de hongos naturalmente asociados al filoplano de plantas de cyclamen cultivadas localmente. La mayoría de ellas corresponden a hongos filamentosos, 26 a especies de *Penicillium*, 10 a *Clonostachys rosea* y 10 a *Trichoderma*. Además obtuvieron aislamientos de *Fusarium*, *Acremonium*, *Phoma*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, levaduras y un Hyphomycete sin identificar (Rivera, 2005).

El método de Peng y Sutton (1991) permitió diferenciar el comportamiento antagónico de los aislamientos obtenidos frente a *B. cinerea* sobre discos de hojas de rosal. Del vivero semiabandonado de Zelaya, se obtuvo un número mayor de aislamientos que en el resto de las muestras. La mayoría de ellos con buen o muy buen comportamiento. Los cambios en las poblaciones del filoplano pueden ser atribuidos al efecto directo de las condiciones bajo las cuales las plantas desarrollan (humedad y temperatura) y al efecto indirecto debido a cambios en la naturaleza física o química de la filósfera (Morris y Rouse, 1985). En este caso, la ausencia de aplicaciones de fungicidas en el cultivo de Zelaya pudo haber favorecido el desarrollo de una micoflora más abundante. Estos resultados coinciden con los de Waller y Masaba (2006), quienes determinaron que la aplicación de fungicidas reduce la población de hongos filamentosos sobre todos los tejidos de plantas de café. Cuando los arbustos nunca habían recibido aplicaciones de

fungicidas, presentaban una baja población de *Colletotrichum kahawae* y muy bajos niveles de la enfermedad conocida como “coffee berry disease”. La enfermedad se presentó en un bajo nivel sobre arbustos que no habían sido pulverizados durante 2 años y donde las poblaciones de la microflora eran más altas.

De los 3 aislamientos con que se contaba previamente en la Cátedra de Fitopatología, y que fueran utilizados en este ensayo ninguno de ellos impidió totalmente la esporulación del patógeno, sin embargo Gr (*Gliocladium roseum*) confirmó su eficiencia para el control de *B. cinerea* (Peng y Sutton, 1991), ya que se encontró en el grupo de buen comportamiento. De las dos cepas de *Trichoderma* con antecedentes de buen comportamiento antagónico, *T. harzianum* frente a *S. sclerotiorum* y *S. minor* (Wright et al., 1988), *Rhizoctonia solani* (Cortese et al., 1992) y *Trichoderma koningii* frente a los mismos patógenos (Wright et al., 1988, Cortese et al., 1992) y además frente a *Colletotrichum demathium* var. *truncata* (Grijalba et al., 1992), sólo la primera de ellas presentó un desempeño aceptable, mientras que la segunda mostró una baja capacidad de bioncontrol de este patógeno.

El método *in vitro* de los cultivos duales (Wright et al (1988), Mariano (1993) también permitió evaluar el comportamiento de los aislamientos obtenidos, en este caso en base a la capacidad de inhibir el crecimiento del patógeno en medio de cultivo. Se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento de *B. cinerea* en presencia de distintas cepas (Tabla 27). Mientras en algunos casos el patógeno vió disminuido su crecimiento en forma marcada, en otros desarrolló en forma similar al testigo sin antagonista.

La comparación de los resultados obtenidos a través de los dos métodos de evaluación permite establecer que la mayoría de las cepas aisladas se comportaron de manera similar en los dos ensayos. Aquellos aislamientos que no permitieron la esporulación de *B. cinerea* o la redujeron en forma importante sobre las hojas de rosal siguiendo la metodología de Peng y Sutton

(1991), también disminuyeron el crecimiento del patógeno en cultivos duales. A pesar de ello se observaron algunas excepciones muy particulares. Por ejemplo, el aislamiento Ze S6 que presentó el peor desempeño sobre hojas, fue uno de los de mejor desempeño en cultivos duales. Por otro lado, el aislamiento Gr (***C. rosea***), que se ubicó en el grupo 2 (de buen desempeño) según la metodología de Peng y Sutton, no inhibió el crecimiento de ***B. cinerea*** en cultivos duales. De esta manera, sí bien la evaluación por el método del cultivo dual es más sencilla y en la mayoría de los casos los resultados obtenidos siguen la misma tendencia de aquellos a partir de la inoculación de discos de hojas, podría eliminarse *in vitro* un antagonista de buen comportamiento en condiciones de cultivo como es la cepa Gr (***C. rosea***) (Peng y Sutton, 1991; Yu y Sutton, 1997, 1998, 1999; Shafia et al., 2001; Sutton et al., 2002). No se encontraron referencias acerca de la comparación de los resultados obtenidos a través de metodologías *in vivo* e *in vitro*. Quizás podría explicarse este comportamiento, como resultado de diferente mecanismo, o combinación de varios, que pueden manifestarse *in vivo* y no *in vitro*, o viceversa.

Se observó un comportamiento diferencial de los antagonistas ensayados, frente a los distintos fungicidas empleados y las diferentes dosis de ensayo, resultados coincidentes con los de Ortiz Molinuelo et al. (1995). En el presente estudio Captan fue el único fungicida en presencia del cual todos los antagonistas mostraron desarrollo miceliar, en cambio frente a cada uno de los otros fungicidas desarrollaron sólo algunas cepas

Deberán continuarse los estudios para evaluar la utilización de una rotación de los antagonistas seleccionados y fungicidas. Elad et al. (1994) encuentran que Trichodex (***Trichoderma harzianum*** T 39) controla a ***B. cinerea*** en cultivos bajo invernáculo y en viñedos cuando se aplica sólo o en combinación con fungicidas. Alternancias con fungicidas mostraron tan buena supresión de la enfermedad como con fungicidas aplicados solos y mejor que con el biocontrolador sólo. Similares resultados se obtuvieron en cultivos de tomate bajo invernáculo (Elad et al. 1995). La actividad de ***T. harzianum*** pueden ser efectivas sí es integrada con otras

prácticas de control y puede resultar en un nivel aceptable de enfermedad con niveles reducidos de fungicidas (Latorre et al., 1997).

En este estudio, los resultados obtenidos muestran un activo control de los antagonistas evaluados sobre el desarrollo de *B. cinerea*, siendo el tratamiento Ze H10 (*Penicillium purpurogenum*) el que mostró el peor comportamiento. Sin embargo, aún en este caso y aunque el efecto no fue inmediato, finalmente disminuyó el desarrollo de *B. cinerea*. Los tratamientos con pulverizaciones de esporas de SP H3 (*Penicillium minioluteum*), Ze H12 (*Trichoderma atroviride*) y la mezcla de los 3 antagonistas se comportaron de manera similar, inhibiendo significativamente el avance de *B. cinerea*.

Además de ser efectivos los biocontroladores deben satisfacer otros requerimientos, entre ellos el más importante es su falta de patogenicidad (Da Silva Tatagiba et al., 1998; Köhl et al., 2000). Sí bien ninguno de los tres antagonistas utilizados en el último ensayo mostró patogenicidad sobre los tallos de rosal, se deberán continuar los estudios realizando pruebas de patogenicidad sobre otros órganos de rosal, como las flores, y otros hospedantes para determinar si alguno de ellos pudiera ser potencialmente patógeno. Se debe comprobar además que no existan riesgos para la salud humana y animal. *P. minioluteum* ha sido identificado en nuestro país como agente causal de pudrición de bulbos de tulipán en Chubut y gladiolo y liliun en Corrientes (Wright et al., 2003). En Brasil, Freire y Barguil (2001) determinaron la presencia de siete especies distintas de *Penicillium*, entre las que se encuentran *P. minioluteum* y *P. purpurogenum*, asociadas al deterioro de frutos de acajú (*Anacardium occidentale*). Ambas especies han sido encontradas colonizando frutos de vid (Serra et al., 2006). *P. minioluteum* es además un patógeno de brevas e higos, ocasionando pudriciones postcosecha (Montealegre et al., 2001) y de *Lolium multiflorum* y *L. perenne* (Farr et al., 2007). El género *Penicillium* se encuentra entre los contaminantes más comunes del ambiente. Unas 15 especies causan micosis oportunistas en pacientes inmunodeprimidos. *P. purpurogenum* ha estado involucrado en casos de enfermedades pulmonares en humanos y en un caso de micosis

diseminada en un perro (Zanatta et al., 2006). Varias especies de ***Aspergillus*** y ***Penicillium*** son los hongos más comunes que causan podredumbres en granos almacenados de maíz (Ullstrup, 1966). Entre los contaminantes de granos se encuentra ***P. purpurogenum*** (Aziz et al., 2006). En un estudio realizado en Argentina sobre muestras de maíz se detectó la presencia de 8 especies de ***Penicillium*** productoras de toxinas, entre las que se encuentra ***P. minioluteum*** (Etcheverry et al. 2004).

A pesar de ello existen algunas referencias acerca del uso de ***Penicillium*** sp. como agente de biocontrol. Eden et al. (1996) encuentran una alta variabilidad entre aislamientos de ***Penicillium*** (no identifican especies) en su capacidad para controlar ***B. cinerea*** en tomate bajo invernáculo. ***P. oxalicum*** redujo el marchitamiento del tomate ocasionado por ***Fusarium oxysporum*** f.sp. ***lycopersici*** con diferentes niveles de severidad, mientras que ***P. purpurogenum*** fue eficiente sólo a bajos niveles de severidad (de Cal et al., 1995). ***P. oxalicum***, inoculado al sustrato y a la rizósfera antes del transplante, logró un control efectivo del marchitamiento del tomate ocasionado por ***Verticillium*** y ***Fusarium***. Aislamientos de distintas especies de ***Penicillium***, entre las que se encontraba ***P. purpurogenum*** fueron obtenidos de la rizósfera de plantas de trigo y mostraron actividad antagónica sobre ***Fusarium*** spp. (Patrowska, 2002). Cepas de ***P. radicum*** inhibieron *in vitro* el crecimiento de los patógenos de suelo ***Gaeumannomyces graminis*** var. ***tritici***, ***Rhizoctonia solani***, ***Pythium irregulare*** y ***Phytophthora cinnamomi*** y mostraron un efecto promotor del crecimiento de plantas de trigo (Wakelin et al., 2004; 2006). Sin embargo no se encontraron referencias acerca de la existencia de productos comerciales en base a cepas de ***Penicillium*** spp. (Copping, 2001).

Entre los aislamientos obtenidos se encuentran cepas del género ***Trichoderma***, siendo promisorio para su uso como biocontrolador la cepa de ***T. atroviride***. La capacidad de hongos del género ***Trichoderma*** para actuar como biocontroladores es conocida desde al menos 1920 (Harman, 2006).

Biofungicidas basados en *Trichoderma* son una realidad en agricultura, con más de 50 formulaciones disponibles como productos registrados en numerosos países de cinco continentes, para proteger y aumentar el rendimiento de cultivos hortícolas, ornamentales y árboles frutales (Woo et al., 2005). Dos aislamientos de *T. atroviride*, uno de *T. viride* y uno de *Rhodotorula* sp. mostraron potencial como agentes de biocontrol de la podredumbre morena de los frutales de carozo poscosecha (Hong et al., 1998). *T. atroviride* también inhibe el crecimiento saprofítico de *Sclerotinia sclerotiorum* (Li et al., 2005). *T. atroviride* CHS 861 es un hiperparásito, que desarrolla entre 4 y 33°C, con amplio rango de hospedantes, parasitando entre otros a *B. cinerea*, y produce promoción del crecimiento de las plantas (Mc Beath, 2003).

Se ha comprobado que varias especies de *Trichoderma*, entre ellas *T. atroviride*, inoculadas en un lugar diferente del patógeno, reducen el desarrollo de síntomas de enfermedad, produciendo de esta manera resistencia inducida (Woo et al., 2005). *T. atroviride* es un hongo micoparásito comercialmente utilizado como agente de control biológico contra varios hongos fitopatógenos. La interacción es específica e incluye reconocimiento, ataque y muerte del hospedante a través de la producción de estructuras de infección especializadas, enzimas que lisan la pared celular y metabolitos antifúngicos (Kubiceck, 2004). Dodd et al., 2004, comprueban que un aislamiento de *T. atroviride* (C65) puede vivir y desarrollar sobre hojas y frutos de kiwi durante toda una estación de crecimiento, haciéndolo de esta manera un candidato ideal como agente de biocontrol para reducir el inóculo de *B. cinerea* en cosecha y poscosecha.

En este trabajo no se realizaron estudios sobre los mecanismos de acción de los antagonistas seleccionados. No es fácil determinar con precisión los mecanismos de acción que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta. La antibiosis ha sido el mecanismo más frecuentemente descrito. Ello se debe al sesgo provocado por la metodología

utilizada en la investigación (Vero, 1998). Las especies del género *Trichoderma* pueden utilizar varios mecanismos de acción. No todos los aislamientos de una misma especie poseen la misma capacidad antagónica cuando se utilizan como agentes de control biológico (Tronsmo y Hjeljord, 1997). *Trichoderma* spp. actúa a través de la producción de enzimas líticas, la producción de metabolitos con actividad biológica y el hiperparasitismo (Soares de Melo, 1991). *Penicillium* spp. son hongos productores de micotoxinas (Aziz et al., 2006), de manera que es probable que este sea el principal mecanismo involucrado.

Un desafío permanente para los fitopatólogos es el desarrollo de métodos efectivos para el manejo de enfermedades que sean compatibles con los sistemas de producción y aceptables en términos de costos, salud y ambiente. Cambios en los patosistemas, métodos de cultivo y standards de aceptabilidad de prácticas de manejo de enfermedades, en especial tratamientos con fungicidas, frecuentemente han necesitado de innovaciones en la metodología de manejo de la enfermedad. El desarrollo de tolerancia de las poblaciones de patógenos a fungicidas, presiones económicas para reducir costos y, especialmente, la preocupación pública en relación a los pesticidas, han motivado la necesidad de reducir la aplicación de fungicidas (Sutton, 1990). Un análisis de los resultados obtenidos con el control biológico lleva a la conclusión que, muchas veces, se obtiene solamente un control parcial de la enfermedad. Ello puede ser explicado por la constante dependencia del control biológico de diversos factores bióticos y abióticos (Ghini, 1991).

El control biológico de *B. cinerea* se basa principalmente en el uso de saprófitos. El uso de formulaciones biológicas para el control de este patógeno es sólo moderadamente efectivo, pero adecuado para su uso en un planteo de manejo integrado (Elad et al., 1996). Aunque el número de productos biocontroladores se está incrementando, representan solo el 1% de las ventas de agroquímicos. A pesar de ello, representan importantes contribuciones porque ofrecen alternativas para el manejo de enfermedades (Fravel, 2005). Los métodos de control deberían ser dirigidos hacia combinaciones de métodos culturales como reducción de la humedad relativa en el invernáculo (Hammer y Marois, 1988), fertilización con calcio (Volpin y Elad, 1991), control de la producción

de etileno (Elad, 1988a) y aplicaciones de fungicidas químicos o biológicos en el invernáculo o sobre flores cosechadas (Elad et al., 1993). Los microorganismos nativos son importantes contribuyentes en la supresión de enfermedades en sistemas de cultivo. Se han logrado considerables avances introduciendo antagonistas nativos en el sistema productivo (Sutton y Peng, 1993).

Además, los organismos seleccionados como antagonistas deben tener propiedades que faciliten la aplicación en la superficie de las plantas y la capacidad de un rápido establecimiento. Los organismos deben presentar alta tasa de crecimiento y capacidad reproductiva, especialmente de esporas relativamente resistentes. Los antagonistas deben ser fácilmente cultivados en medios disponibles y no ser exigentes en sus requerimientos nutricionales, de modo que grandes cantidades de inóculo pueden ser fácilmente preparadas a bajo costo (Wood y Tveit, 1955).

Los métodos y estrategias de biocontrol involucran la oportuna manipulación del antagonista para suprimir el patógeno en diferentes fuentes de inóculo o sobre las plantas hospedantes. El biocontrol ideal introduce o promueve al antagonista sólo cuando se necesita o cuando es más efectivo y minimiza aplicaciones de inóculo no adecuadas. Eficiencia, practicidad y seguridad de estrategias y métodos para aplicar y mantener los antagonistas microbianos son fundamentales para el éxito del biocontrol en sistemas de cultivo y la aceptación del biocontrol por productores y la sociedad. Conciencia de posibles peligros de los antagonistas microbianos sobre la salud humana, como por ejemplo esporas aéreas alergénicas, pueden ayudar a evitar rechazos de candidatos a biocontrol por las agencias reguladoras y para mantener la confianza del público en el control biológico (Cook, 1992, citado por Sutton y Peng, 1993).

Factores importantes que pueden afectar la eficiencia del control biológico a través de la introducción de antagonistas incluyen viabilidad del inóculo (Sutton y Peng, 1993), formulación (Sutton y Peng, 1993; Batta, 2004; Sabuquillo et al., 2006), concentración del organismo de biocontrol (Sutton y Peng, 1993; Zhang et al., 1996a; Morandi, 1997; Sutton et al., 1997; Da Silva Tatagiba et al., 1998, Yu y

Sutton, 1999; Hjeljord y Tronsmo, 2003), estado de desarrollo de los órganos de la planta (Elad y Kirshner, 1993; Sutton et al., 1997) tipo de adyuvantes utilizados (Sutton y Peng, 1993), el momento de aplicación de los organismos y adyuvantes al blanco (Sutton y Peng, 1993; Zhang et al., 1996a; Köhl et al., 1998; Kessel et al., 2002), método y estrategia de aplicación (Peng et al., 1992; Sutton y Peng, 1993; Sutton et al., 1997; Morandi, 1997, Da Silva Tatagiba et al., 1998, Cook, 2002b), cantidad de aplicaciones (Zhang et al., 1996a), condiciones microclimáticas durante la aplicación (Soares de Melo, 1991; Elad y Kirshner, 1993; Sutton y Peng, 1993; Köhl et al., 1995a; Morandi, 1997; Sutton et al., 1997; Yu y Sutton, 1998; Morandi et al., 2006), duración del efecto y sobrevivencia del antagonista (Elad y Kirshner, 1993; Zhang et al., 1996a), mecanismo de acción del antagonista (Elad et al., 1982; Di Pietro et al., 1992; Elad et al., 1994; Lorito et al., 1993, 1994; Zhang et al., 1996b; Esterio y Auger, 1997; Köhl y Fokkema, 1997; Morandi 1997; Sutton et al., 1997; Yu and Sutton, 1997; Li et al. 2002; Howell, 2005), manejo del cultivo (Elad y Kirshner, 1993; Shafia et al., 2001), presencia de insectos y ácaros (Morandi et al., 2001) y costos (Sutton y Peng, 1993).

La prueba más importante e indispensable para seleccionar a un antagonista es la introducción a la comunidad microbiana natural (Andrews, 1985). Muchos antagonistas eficientes *in vitro* y en condiciones controladas no pasan por este test final (Bettioli, 1991c).

Los antagonistas seleccionados constituyen un avance en la búsqueda para desarrollar un manejo integrado de la enfermedad en sistemas de producción de rosas. Se deberán continuar los estudios para comprobar su eficiencia sobre otros órganos y otras condiciones hasta llegar a pruebas en condiciones de invernáculo de producción comercial. Además deberá evaluarse su efecto sobre los distintos agentes causales de atizamientos identificados en el presente trabajo.

3.7. CONCLUSIONES

- En el filoplano del rosal desarrolla una micoflora fúngica compuesta principalmente por hongos de los géneros ***Trichoderma*** y ***Penicillium***.
- Las cepas aisladas presentan actividad antifúngica diferencial frente a ***Botrytis cinerea***.
- Las cepas SP H3 (***Penicillium minioluteum***) y Ze H12 (***Trichoderma atroviride***) son las que presentaron mejor eficiencia antagónica.
- Un alto número de aislamientos de buen comportamiento fueron obtenidos del cultivo de Zelaya, sin aplicación de productos por al menos un año.
- La mayoría de los antagonistas presentan una respuesta similar cuando son evaluados según la técnica de los discos de hoja o la técnica del cultivo dual.
- Los microorganismos FA T1, IH P1, Ze H4, Ze H10, Ze P1, Ze T1 (***Penicillium*** spp.) y SP H3, Ze H12, Ze H13 (***Trichoderma*** spp.) presentan un comportamiento diferencial frente a diferentes dosis de fungicidas.
- El atizonamiento de los rosales ocasionado por *B. cinerea* puede ser controlado biológicamente a través de la pulverización con esporas de una cepa de ***Trichoderma atroviride***, de ***Penicillium minioluteum*** o la mezcla de ambos con ***P. purpurogenum***.

4. CONCLUSIONES GENERALES

- El atizonamiento de los rosales se produce a partir de las ramas heridas por la poda o por el corte para la cosecha de flores.
- La incidencia del atizonamiento fue muy elevada en la mayoría de los cultivos analizados, con un promedio del 70% en cultivos para flor de corte y del 55% en plantas para ornamentación de jardines. La muerte de plantas llegó al 40% en rosales para jardines.
- El atizonamiento de los tallos del rosal es ocasionado por un complejo de hongos que incluye a ***Botrytis cinerea***, ***Trichothecium roseum***, ***Alternaria alternata***, ***Pestalotiopsis guepinii***, ***Fusarium verticillioides***. y ***Phomopsis*** sp. Constituye esta la primera referencia acerca de la presencia de ***Trichothecium roseum***, ***Alternaria alternata***, ***Pestalotiopsis guepinii***, ***Fusarium verticillioides***. y ***Phomopsis*** sp. como agentes causales de enfermedades del rosal en la Argentina.
- Los muestreos realizados permiten afirmar que ***B. cinerea*** es el patógeno que presenta una mayor incidencia en rosales para flor de corte y el único que afecta otros órganos de la planta, produciendo síntomas de atizonamientos sobre flores, pimpollos y pedúnculos florales.
- ***A. alternata*** es el patógeno que presenta una mayor incidencia en cultivos para jardines.
- No existe una sintomatología específica asociada a cada patógeno.
- La incidencia de la enfermedad está estrechamente relacionada el manejo del cultivo.
- En el filoplano del rosal desarrolla una micoflora fúngica compuesta principalmente por hongos de los géneros ***Trichoderma*** y ***Penicillium***.
- Las cepas aisladas presentan actividad antifúngica diferencial frente a ***Botrytris cinerea***.
- Las cepas SP H3 (***Penicillium minioluteum***) y Ze H12 (***Trichoderma atroviride***) son las que presentaron mejor eficiencia antagónica. .
- El atizonamiento de los rosales ocasionado por ***B. cinerea*** puede ser controlado biológicamente a través de la pulverización con esporas de una cepa de ***Trichoderma atroviride***, de ***Penicillium minioluteum*** o la mezcla de ambos con ***P. purpurogenum***.

5. BIBLIOGRAFÍA

- ADIKARAMN N.K.B.; D.C. JOYCE and L. A. TERRY 2002. Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against gray mold of strawberry fruit. *Australasian Plant Pathology* 31: 223-229.
- ALFONSO, C.; R. RAPOSO and P. MELGAREJO 2000. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouse in south-eastern Spain. *Plant Pathology* 49: 243-251.
- ALPI, A. y F. TOGNONI. 1991. Cultivo en invernadero. 3º Ed. Mundi Prensa. Madrid. 269 pp.
- ANDREWS, J.H. 1985. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. Pp. 31-44. In: WINDELS, C.L. y S.E. LINDON. Biological control on the phylloplane. St. Paul. The American Phytopathological Society.
- ARRAS, G.; G. D´HALLEWIN 1994. In vitro and in vivo control of *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* in citrus fruit by *Bacillus subtilis* strains. *Agricultura Mediterranea* 124: 56-61.
- AUGER S., J. y M. ESTERIO G. 1997. *Botrytis* en vides en Chile: epidemiología y resistencia a fungicidas. Pp 3-9. In: ESTERIO GREZ, M. Y AUGER SAAVEDRA, J. *Botrytis*: nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile, Santiago.
- AZIZ, N.H.; Z.A. MATTAR and S.R. MAHROUS 2006. Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma radiation. *Journal of Food Safety* 26: 184-201.
- BABBITT, S.B.; F.Z. RESNIK; A. TOZZINI Y E.R. WRIGHT (ex-aequo) 1997. Presencia de *Agrobacterium tumefaciens* en cultivos de rosales en los alrededores de Buenos Aires, República Argentina. Actas del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Montevideo, Uruguay.
- BAKER, K.F. and R.S. COOK. 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman and Company. New York. 433 pp.
- BALD, J.G. 1952. Stomatal droplets and the penetration of leaves by plant pathogens. *American Journal of Botany* 39:97-99.
- BATTA, Y.A. 2004. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection* 23: 19-26.

- BEDI, P.S. and J.P. SINGH. 1972. Leaf blight of rose in the Punjab. *Indian Phytopathology* 25: 534-539.
- BERGAMIN FILHO, A. y L. AMORIN. 1996. Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico. Editorial Agronômica Ceres, São Paulo. 289 pp.
- BETTIOL, W. 1991a. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. Pp. 1-5. En: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA.
- BETTIOL, W. 1991b. Controle biológico de doenças do filoplano. Pp. 34-52. En: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA.
- BETTIOL, W. 1991c. Seleção de microorganismos antagônicos a fitopatógenos. Pp. 223-236. En: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA.
- BETTIOL, W. 1997. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. *Revisão Anual de Patología de Plantas* 5: 59-97.
- BHATNAGAR, G.C. and K. MATHUR. 1987. *Alternaria* dieback, a serious menace to rose cultivation in Pushkar Valley (Rajasthan). *Indian Journal of Plant Pathology* 5: 210.A.
- BISSET, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. Section Longibrachiatum sect. nov. *Canadian Journal of Botany* 62: 924-931.
- BISSET, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69: 2357-2372.
- BISSET, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section Pachybasium. *Canadian Journal of Botany* 69: 2373-2417.
- BISSET, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma* IV. Additional notes on section Longibrachiatum. *Canadian Journal of Botany* 69: 2418-2420.
- BISSET, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany* 70: 2418-2420.
- BLAKEMAN, J.P. 1991. Ecological sucesión of leaf microorganisms in relation to biological control. Pp 6-30 In: C.R. WINDERS AND S.E. LINDOW. (editors) *Biological control on the Phylloplane*. APS Press. St. Paul.

- BLAKEMAN, J.P. and N.J. FOKKEMA 1982. Potencial for biological control of plant diseases of the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology* 20 (167-192). Palo Alto.
- BLOM T. and J. SUTJITA. 1996. Bending/Arching. *Roses Inc. Bulletin*. December:29-33.
- BOFF, P.; J. KÖHL; M. JANSEN; P.J.F.M. HORSTEN; C. LOMBAERS-VAN DER PLAS; M. GERLAGH. 2002. Biological control of gray mold with *Ulocladium atrum* in annual strawberry crops. *Plant Disease* 86: 220-224.
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. C.A.B. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey, England. 237 pp.
- BOOTH, C. 1977. *Fusarium*. C.A.B. Commonwealth Mycological Institute Kew Surrey, England. 57 pp.
- BUCK, J.W. and S.N. JEFFERS, 2004. Effect of pathogen aggressiveness and vinclozolin on efficacy of *Rhodotorula glutinis* PM4 against *Botrytis cinerea* on geranium leaf discs and seedlings. *Plant Disease* 88:1262-1268.
- BURGESS, D.R. and P.J. KEANE 1997. Biological control of *Botrytis cinerea* on chickpea seed with *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum*: Indigenous versus non-indigenous isolates. *Plant Pathology* 46: 910-918.
- BURGESS, D.R.; T. BRETAG and P.J. KEANE 1997. Biocontrol of seedborne *Botrytis cinerea* in chickpea with *Gliocladium roseum*. *Plant Pathology* 46: 298-305.
- CALPAS, J.T., M. N. KONSCHUH; C.C. TOEWS and J.P. TEWARI 2006. Relationships among isolates of *Botrytis cinerea* collected from greenhouses and field locations in Alberta, based on RAPD analysis. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 109-124.
- CAMPBELL, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. 218 p.
- CASAFE, 2005. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes república Argentina. Buenos Aires. 2080 pp.
- CHAVES, N. y A. WANG 2004. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía Costarricense* 28:73-85.

- COERTZE, S. and G. HOLZ, 2001. Germination and establishment of infection on grape berries by single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. Plant Disease 85:668-677.
- COOK, D.W.M., 2002a. Effect of formulated yeast in suppressing the liberation of *Botrytis cinerea* conidia. Plant Disease 86: 1265-1270.
- COOK, D.W.M., 2002b. A laboratory simulation for vectoring of *Trichoderma pullulans* by conidia by *Botrytis cinerea*. Phytopathology 92: 1293-1299.
- COOK, R.S. and K.F. BAKER. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society., St. Paul. 539 pp.
- COPPING, L.G. (ed.). 2001. A World Compendium. The Manual of Biocontrol Agents. BCPC Publications. UK. 702 pp.
- CORTESE, P.L.; M.E. GALLY y M.V. LÓPEZ 1992. Eficiencia "in vitro" de antagonistas de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* y análisis comparativo de distintos modelos de crecimiento. Revista de la Facultad de Agronomía 13: 59-65.
- CRISTINZIO, M.; F. MARZIANO and G. MANCINI. 1973. *Phomopsis* sp. on rose. Notiziario sulle Malattie delle Piante 88-89: 133-151.
- DAL BELLO, G.; C. MÓNACO; L. RONCO y S. LARRÁN. 2005. Control biológico de la podredumbre del fruto de tomate causada por *Botrytis cinerea*. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Libro de Resúmenes pág. 263.
- DA SILVA TATAGIBA, J ; L.A. MAFFIA; R.W. BARRETO; A.C. ALFENAS and J.C. SUTTON, 1997. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of Rose (*Rosa hybrida*). Phytoparasitica 26: 8-19.
- DÁRCY, C.J.; D.M. EASTBURN and G.L. SCHUMAN 2001. Illustrated Glossary of Plant Pathology. The American Phytopathological Society. Education Center. www.apsnet.org.
- DE CAL, A.; S. PASCUAL; I. LARENA and P. MEGAREJO 1995. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Plant Pathology 44:909-917.
- DI PIETRO, A.; M. LORITO; C.H. HAYES; R.M. BROADWAY and G.E. HARMAN. 1992. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. Phytopathology 83:308-313.

- DIMITRI, M.J. 1972. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. ACME, Buenos Aires. 1028 pp.
- DI RIENZO, J.A.; A.W. GUZMÁN and F. CASANOVES. 2002. A multiple comparison method based on the distribution of the root node distance of a binary tree obtained by average linkage of the matrix of euclidean distances between treatment means. *JABES* 7(2): 1-14.
- DODD, S.L.; R.A.HILL and A. STEWART 2004. Monitoring the survival and spread of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* (C65) on kiwifruit using a molecular marker. *Australasian Plant Pathology* 33: 189-196.
- DOMSCH, K.H.; W. GAMS and TRAUTE-HEIDI ANDERSON, 1980. Compendium of soil fungi. Vol 1. London. Academic Press. 859 pp.
- EDEN, M.A.; R.A. HILL and A. STEWART 1996. Biological control of *Botrytis* stem infection of greenhouse tomatoes. *Plant Pathology* 45: 276-284.
- ELAD, Y. 1988a. Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. *Crop Protection* 7: 361-366.
- ELAD, Y. 1988b. Scanning electron microscopy of parasitism of *Botrytis cinerea* on flowers and fruits of cucumber. *Transactions of the British Mycological Society* 91:185-190.
- ELAD, Y., I. CHET and Y. HENIS. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719-725.
- ELAD, Y. and K. EVENSEN. 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85: 637-643.
- ELAD, Y.; M.L. GULLINO; D. SHTIENBERG and C. ALOI 1995. Managing *Botrytis cinerea* in tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. *Crop Protection* 14: 105-109.
- ELAD, Y. and B. KIRSHNER, 1993. Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* as modified by abiotic conditions. *Phytoparasitica* 21: 303-313.
- ELAD, Y.; B. KIRSHNER and Y. GOTLIB. 1993. Attempts to control *Botrytis cinerea* on roses by pre- and postharvest treatments with biological and chemical agents. *Crop Protection* 12: 69-73.

- ELAD, Y.; J. KÖHL and N. J. FOKKEMA. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology* 84: 1193-1200.
- ELAD, Y.; N.E. MALATHRAKIS and A.J. DIK 1995. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Protection* 15: 229-240.
- ELAD, Y. and D. SHTIENBERG. 1995. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews* 1: 15-29.
- EL-GHAOUTH, A.; C.L. WILSON; M. WISNIEWSKI. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology* 88: 282-291.
- EL-GHAOUTH, A.; C.L. WILSON; M. WISNIEWSKI. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology* 93: 344-348.
- ELLIS, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey. 608 pp.
- ELLIS, M.B. and J.M. WALLER 1974. *Sclerotinia fuckeliana* (conidial state: *Botrytis cinerea*). C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 431. Commonwealth Mycological Institute Kew.
- EL-ZAYAT, M.M.; K.H.A. OKASHA; M. EL-TOBSHY ZEINAB; M.M.A. EL-KHOLI; SANEYA M. EL-NESHWAY. 1993. Efficiency of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against gray mold rot "*Botrytis cinerea*" of strawberry fruits. *Annals of Agricultural Science* 38: 283-290.
- ESTERIO G., M. y J. AUGER S. 1997. Control integrado de *Botrytis cinerea* en vid (*Vitis vinifera* L.). Pp 14-26. In: ESTERIO GREZ, M. Y AUGER SAAVEDRA, J. *Botrytis: nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa*. Universidad de Chile, Santiago.
- ETCHEVERRY, M.; A. NESCI; G. BARROS; A.TORRES and S. CHULZE. 2004. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B₁ in corn genotypes and corn meal in nArgentina. *Mycopathologia* 147: 37-41.
- FAINSTEIN, R. 1997. Manual para el cultivo de rosas en Latinoamérica. Ecuaooffset, Quito. 247 pp.

- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2006. IPM Home Page. <http://www.fao.org/AGP/AGPP/IPM>.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2007. Glossary of Phytosanitary terms. <http://www.fao.org>
- FARR, D.F.; G.F. BILLS; G.P. CHAMURIS; and A.Y. ROSSMAN 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, USA. 1252 pp.
- FARR, D.F.; A.Y. ROSSMAN; M.E. PALM and E. B. MCCRAY 2007. Fungal databases, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- FERNÁNDEZ VALIELA, M.V. 1978a. Introducción a la Fitopatología. Vol. IV. Hongos y Micoplasmas. Colección Científica del INTA. Buenos Aires. 613 pp.
- FERNÁNDEZ VALIELA, M.V. 1978b. Introducción a la Fitopatología Vol. III. Hongos. Colección Científica del INTA. Buenos Aires. 779 pp.
- FERNANDEZ, H.L. 2000. Los pasos de la calidad. Revista Supercampo N° 65 ,56-59.
- FISCHER, N. L.; W.F.O. MARASAS and T.A. TOUSSOUN 1983. Taxonomic importance of microconidial chains in *Fusarium* Section Liseola and effects of water potential on their formation. Mycologia 75: 693-698.
- FOURIE, J.F. and G. HOLZ 1995. Initial infection processes by *Botrytis cinerea* on nectarine and plum fruit and the development of decay. Phytopathology 85: 82-87.
- FRAVEL, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43: 337-359.
- FREIRE; F. DAS C.O. y B.M. BARGUIL 2001. Fungos que deterioram amêndoas de cajueiro no Brasil. Comunicado Técnico 64. EMBRAPA. Fortaleza, Brasil. 3 pp.
- FUCHS, H.W.M. 1996. Harvesting, pruning and root reaction of roses. Acta Horticulturae 189:109-115.
- GAMBOA, B.S. 1982. Marchitamiento del rosal (*Rosa* sp.) ocasionado por *Fusarium oxysporum* Schlectht. en la República Argentina. Actas del 2º Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Pp. 80-83.

- GARIBALDI, A. and G. GULLINO. 1973. New and little known diseases of flowering and ornamental plants in Italy. *Notiziario sulle Malattie delle Piante*. 88-89: 53-71.
- GASONI, L. 1994. El complejo *Rhizoctonia* en la Argentina: distribución, patogenicidad y biocontrol. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 225 pp.
- GASONI, L.; K. KOBAYASHI; A. VICARIO; B. STEGMAN DE GURFINKEL and J. COZZI. 2004. Biocontrol agents and its mechanisms involved. Pp. 53-69. In: KOBAYASHI, K., L. GASONI Y H. TERASHIMA (eds.). *Biological control of soilborne plant pathogens*. Buenos Aires. JICA Joint Study Project.
- GHINI, R. 1991. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas. Pp. 201-217. En: BETTIOL, W. *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA.
- GOULD, A.B.; D.A. KOBAYASHI and M.S. BERGEN. 1996. Identification of bacteria for biological control of *Botrytis cinerea* on petunia using a petal disk assay. *Plant Disease* 80: 1029-1033.
- GRASSO, S. and R. LA ROSA. 1982. Cankers due to *Phomopsis incarcerata* on rose. *Rivista di Patologia Vegetale* 18: 143-148.
- GRIJALBA, P.; G.A. DEVITTO; E.R. WRIGHT; M.V. LÓPEZ y O.S.F. DE DELFINO. 1992. Eficiencia antagónica "in vitro" y en invernáculo de *Trichoderma koningii* sobre *Colletotrichum dematium* var. *truncata*. *Revista de la Facultad de Agronomía* 13: 157-162.
- GRINSTEIN, A.; Y. RIVEN and Y. ELAD. 1997. Improved chemical control of *Botrytis* blight in roses. *Phytoparasitica* 25 (Suppl.): 87S-92S.
- GUETSKY, R.; D. SHTIENBERG; Y. ELAD and A. DINOOR. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91: 621-627.
- HAMMER, P.E.; K.B. EVENSEN and W.J. JANISIEWICZ. 1993. Postharvest control of *Botrytis cinerea* on cut rose flowers with Pyrrolnitrin. *Plant Disease* 77: 283-286.
- HAMMER, P.E. and K.B. EVENSEN. 1994. Differences between rose cultivars in susceptibility to infection by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 84:1305-1312.

- HAMMER, P.E. and J.J. MAROIS. 1988. Postharvest control of *Botrytis cinerea* on cut roses with pico-cupric-ammonium formate. *Plant Disease* 72: 347-350.
- HAMMER, P.E.; S.F. YANG; M.S. REID and J.J. MAROIS. 1990. Postharvest control of *Botrytis cinerea* infections on cut roses using fungistatic storage atmospheres. *Journal of The American Society of Horticultural Science* 115: 102-107.
- HARMAN, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194.
- HAUMAN, L. y R.L. PARODI. 1921. Los parásitos vegetales de las plantas cultivadas en la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*, 3:227-274.
- HAUSBECK, M.K. and G.W. MOORMAN. 1996. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flowers crops. *Plant Disease* 80:1212-1219.
- HAUSBECK, M.K. and S.P. PENNYPACKER. 1996. The use of forced air to manage *Botrytis* stem blight of geranium stock plants in a commercial greenhouse. *Plant Disease* 80: 940-943.
- HJELJORD, L.G. and A. TRONSMO. 2003. Effect of germination initiation on competitive capacity of *Trichoderma atroviride* P1 conidia against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 93:1593-1598.
- HONG, C.X.; T.J. MICHAILIDES and B.A. HOLTZ 1998. Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. *Plant Disease* 82: 1210-1216.
- HORST, P.K. 1983. Compendium of rose diseases. APS, Minnesota. 50 pp.
- HORST, L.E.; J. LOCKE; C.R. KRAUSE; R.W. Mc MAHON; L.V. MADDEN and H.A. J. HOITINK. 2005. Suppression of botrytis blight of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. *Plant Disease* 89: 1195-1200.
- HOWELL, C.R. 2005. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96: 178-180.
- JAMALUDDIN; M. and P. TANDON. Some new leaf spot diseases. *Current Science* 42:3-103.

- JARVIS, W.R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity. Research Branch. Department of Agriculture. Monograph N° 15. Canadá. 195 pp.
- JAUCH, C. 1959. El mildiu de los rosales *Peronospora sparsa* (Berk). Anales de la Sociedad Científica Argentina 168: 52-59.
- JAUCH, C. 1985. Patología Vegetal. El Ateneo. Buenos Aires. 320 pp.
- JENNINGS, D.L. and E. BRYDON. 1989. Further studies on breeding for resistance to *Botrytis cinerea* in red raspberry canes. Annals of applied biology 115: 507-513.
- KARABULUT, O.A. and N. BAYKAL 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. Crop Protection 23: 431-435.
- KARABULUT, O.A.; J.L. SMILANICK; F.M. GABLER and M. MANSOUR, 2003. Near-harvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in Central California. Plant Disease 87: 1384-1389.
- KESSEL, G.J.T.; B.H. DE HAAS; C.H. LOMBAERS-VAN DER PLAS; E.M.J. MEIJER; F.M. DEWEY; W. VAN DER WERF y J. KÖHL. 1999. Quantification of mycelium of *Botrytis* spp. and the antagonistic *Ulocladium atrum* in necrotic leaf tissue of cyclamen and lily by fluorescence microscopy and image analysis. Phytopathology 89: 868-876.
- KESSEL, G.J.T.; B.H. DE HAAS; W. VAN DER WERF y J. KÖHL. 2002. Competitive substrate colonisation by *Botrytis cinerea* and *Ulocladium atrum* in relation to biological control of *B. cinerea* in cyclamen. Mycological Research 106: 715-728.
- KIMISHINA, E.; Y. KOBAYASHI and T. KOBAYASHI. 1996. Cane blight of rose caused by *Pestalotiopsis populi-nigrae* (Sawada et Ito). Annals of the Phytopathological Society of Japan 62(5): 502-504.
- KÖHL, J. and N.J. FOKKEMA. 1997. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. Pp. 49-88 In: G.J. BOLAND y L.D. KUYKENDALL (editors) Plant-Microbe Interactions and biological control. Marcel Dekker Inc. New York.

- KÓHL, J.; M. GERLAGH and G. GRIT. 2000. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in different production systems of cyclamen. *Plant Disease* 84: 569-573.
- KÓHL, J.; M. GERLAGH; B.H. DE HAAS y M.C. KRIJGER. 1998. Biological control of *Botrytis cinera* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology* 88: 568-575.
- KÓHL, J.; W.M.L. MOLHOEK; C.H. VAN DER PLAS y H.J. FOKKEMA. 1995a. Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology* 85:293-401.
- KÖHL, J.; C.H. VAN DER PLAS; W.M.L. MOLHOEK y H.J. FOKKEMA. 1995b. Effect of interrupted leaf wetness periods on supresión of sporulation of *Botrytis allii* and *Botrytis cinerea* by antagonists on dead onion leaves. *European Journal of Plant Pathology* 101: 627-637.
- KOOL, M. 1996. Importance of plant architecture and plant density for rose crop performance. *Journal of Horticultural Science* 72(2): 195-203.
- KOOL, M.T.N.; R. DE GRAAF and C.H.M. ROU-HAEST. 1997. Rose flower production as related to plant architecture and carbohydrate content: effect of harvesting method and plant type. *Journal of Horticultural Science* 72(4):623-633.
- KUBICEK, C:P: 2004. Gene technology and applied biochemistry. Institute of Chemical Enggineering. www.vt.tuwien.ac.at/project.
- LAL, B. and A. ARYA. 1981. A new leaf blight of rose caused by *Phomopsis gulabia* sp. nov. *National Academy Science Letters* 4:8.
- LATORRE, B.A.; AGOSIN, E.; R. SAN MARTÍN and G.S. VÁSQUEZ 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection* 16: 209-214.
- LAVY-MEIR, G.; R. BARKAI-GOLAN; E. KOPELIOVITCH. 1989. Resistance of tomato ripening mutants and their hybrids to *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 73: 976-978.
- LEE, J.P.; S.W. LEE; C.S. KIM; J.H. SON; J.H. SONG; K.Y. LEE; H.J. KIM; S.J. SUANG and B.J. MOON 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus*

- licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 37: 329-337.
- LEGARD, D.E.; C.L. XIAO; J.C. MERTERELY and C.K. CHANDLER. 2000. Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. *Plant disease* 84: 531-538.
- LEIBINGER, W.; B. BREUKER; M. HAHN and K. MENDGEN. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103-1110.
- LEIFERT, C.; D.C. SIGEE; R. STANLEY; C. KNIGHT, H.A.S. EPTON. 1993. Bioncontrol of *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola* on Dutch white cabbage by bacterial antagonists at cold-store temperatures. *Plant Pathology* 42: 270-279.
- LI, G.Q.; H.C. HUANG; S.N. ACHARYA. And R.S. ERICKSON 2005. Effectiveness of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma atroviride* in suppression of sclerotinia blossom blight of alfalfa. *Plant Pathology* 54: 204-211.
- LI, G.Q.; H.C. HUANG; E.G. KOKKO and S.N. ACHARYA. 2002. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 43: 211-218.
- LINDQUIST, J.C. 1982. *Royas de la República Argentina y zonas limítrofes. Colección Científica. Tomo XX. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires. 574 pp.*
- LOPEZ, S..E.; D. CABRAL; E.R. WRIGHT and M.C. RIVERA. 1998. Isolation and evaluation of fungal biocontrol agents of ornamental species. XII international Scientific Conference. IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movement), Mar del Plata, Argentina. Acta de resúmenes pág. 100.º
- LOPEZ, M. DEL P. y E.G. DE GRANADA 1998. Reconocimiento e identificación de enfermedades fungosas en *Rosa odorata* cv. Madame Delbard. *Fitopatología Colombiana* 22: 7-9.
- LORITO, M.; G.E. HARMAN; C.K. HAYES; R.M. BROADWAY; A. TRONSMO; S.L. WOO and A. DI PIETRO. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.

- LORITO, M.; C.K. HAYES; A. DI PIETRO; S.L. WOO and G.E. HARMAN. 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,2- β -glucosidase and an *N*-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84:398-405.
- MARCHIONATTO, J.B. 1942. Enfermedades comunes de los rosales y medios par combatirlas. Sociedad Argentina de Horticultura. Buenos Aires. 7 pp.
- MARCHIONATTO, J.B. 1944. Manual de enfermedades de las plantas. Sudamericana, Buenos Aires. 368 pp.
- MARIANO, R.L.M., 1993. Métodos de seleção in Vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patología de Plantas* 1: 369-409.
- MARIANO, R.L.R. y S.J. MICHEREFF. 1994. Competitividad de *Trichoderma* en el filoplano. *Anales del 4º SICONBIOL. Simposio de controle biologico.* Gramado. Brasil. EMBRAPA-CPACT. 131-136.
- MASCARINI, L.; G. LORENZO y F. VILELLA 2003. Producción y calidad de rosas para corte con y sin agobio de ramas y su relación con la respuesta al stress ambiental por fitomonitorio. Pp. 241-251. En: MASCARINI, L., F. VILELLA y E.R. WRIGHT. (Eds.) *Floricultura en la Argentina. Investigación y Tecnología de Producción.* Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- MATTA, A.; A. GARIBALDI and G. GULLINO 1976. Research on desiccating diseases of rose wood in Piamonti and Liguria. *Rivista di Patologia Vegetale* 12: 5-19.
- MCBEATH, J. H. 2003. *Trichoderma atroviride* (cold tolerant *Trichoderma*). www.ampacbiotech.net.
- MC KEEN, W.E. 1974. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 64:455.
- MEIR, S.; S. DROBY; H. DAVIDSON; S. ALSEVIA; L. COHEN; B. HOREV and S. PHILOSOPH-HADAS. 1998. Suppression of *Botrytis* rot in cut rose flowers by postharvest application of methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology* 13: 235-243.
- MELGAREJO, P., A. DE CAL and E. M-SAGASTA. 1989. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. *Can. J. Bot.* 67: 83-87.

- MITIDIERI, I.M. s/fecha. Control Biológico de hongos patógenos de suelo. Boletín Divulgación técnica. Estación Experimental Agropecuaria. 17 pp.
- MONTEALEGRE, J.; J. OYARZUN; R. HERRERA; H. BERGER y L. GALLETI 2001. Hongos causantes de pudriciones postcosecha de brevas e higos. X Congreso Nacional de Fitopatología. Resúmenes. Simiente 71: 33-73.
- MONTEALEGRE, J.R. y G. VÁSQUEZ P. 1996. Resistencia a benzimidazoles, carboximidazoles y dicarboximidazoles en cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de peras. Fitopatología 31: 59-65.
- MONTE VÁSQUEZ, E.; I. GRONDONA ESPAÑA y M.R. HERMOSA PRIETO 2005. Apuntes del curso "Control Biológico. Principios Generales y Aplicación de Biofungicidas en Agricultura". Escuela para Graduados, Facultad de Agronomía (UBA). Buenos Aires. 41 pp.
- MORANDI, M.A.B. 1997. *Gliocladium roseum* como agente de biocontrol de *Botrytis cinerea* em roseiras cultivadas em casa de vegetação. Tese para obtenção do título de "Magíster Scientiae". Universidade Federal de Viçosa. Brasil. 60 pp.
- MORANDI, M.A.B.; L.A. MAFFIA; E.S.G. MIZUBUTI; A.C. ALFENAS; J.G. BARBOSA and C.D. CRUZ 2006. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. Biocontrol Science and Technology 16: 619-630.
- MORANDI, M.A.B.; L.A. MAFFIA and J.C. SUTTON 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. Phytoparasitica 29: 103-113.
- MORANDI, M.A.B.; J.C. SUTTON and L.A. MAFFIA 2001. Relationships of aphid and mite infestations to control of *Botrytis cinerea* by *Clonostachys rosea* in rose (*Rosa hybrida*) leaves. Phytoparasitica 28: 55-64.
- MOREIRA, L.M. 2005. Alternativas de controle integrado da podridão parda do pessegueiro. Tese apresentada como requisito parcial a obtenção do Grau de Doctor. Universidade Federal do Paraná. 129 pp.
- MORISIGUE, D.E.; M. MORITA y K. KITASHIMA. 2002. Relevamiento de la Actividad Florícola y Plantas Ornamentales. CETEFFHO JICA, Buenos Aires. 26 pp.

- MORRIS, C.E. and D.J. ROUSE. 1985. Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial populations, pp. 63-82. In: WINDELS, C.E. y S.E. LINDOW (Eds) Biological control on the phylloplane. American Phytopathological Press, St. Paul, MN.
- NEERGARD, P. 1979. Seed pathology. 2nd Edition. The Macmillan Press, London. 1191 pp.
- NELSON, M.E. and M.L. POWELSON. 1988. Biological control of grey mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. Plant Disease 72:727-729.
- NELSON, P. E. TOUSSOUN, T. A. and MARASAS, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press University Park.
- NICOT, P.C.; V. SALTZIS and M.H. GUINEBRETIERE, 1993. A miniaturised *in vivo* assay for the screening of potencial antagonists of *Botrytis cinerea* on tomato plants. In: N:J: FOKKEMA, J. KÖHL y Y. ELAD. Biological control of foliar and post-harvest diseases. IOBC/WPRS Bulletin. Vol 16(11). France.
- NOBRE, S.A.M.; L.A. MAFFIA; E.S.G. MIZUBUTI; L.V. COTA and A.P.S. DIAS 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. Biological Control 34: 132-143.
- NUNES, C.; J. USALL; N. TEIXIDÓ; M. ABADIAS and I. VIÑAS. 2002. Improved control of postharvest decay of pears by the combination of *Candida sake* (CPA-1) and ammonium molybdate. Phytopathology 92: 281-287.
- OGAWA, J.M. and H. ENGLISH 1969. Blossom blight and green fruit rot of almond, apricot and plum, caused by *Botrytis cinerea*. Plant Disease Reporter 44:365-268.
- ORTÍZ MOLINUEVO, P.; E.R. WRIGHT; O.S.F. DE DELFINO; P.E. GRIJALBA y M.V. LÓPEZ. 1995. Desarrollo de microorganismos antagonistas en presencia de distintas concentraciones de fungicidas. Revista de la Facultad de Agronomía 15(1):37-42.
- PALMUCCI, H.E. and P. GRIJALBA. 2005. Leaf Spot and Stem Blight Caused by *Botrytis cinerea* on Poinsettia in Argentina. Plant Disease 89:1359.
- PALMUCCI, H.E.; M.C. RIVERA y E.R. WRIGHT. 1997. *Botrytis cinerea* en plantas ornamentales cultivadas en maceta en Argentina. Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas 23(2):295-299.

- PALMUCCI, H.E. and E.R. WRIGHT. 2006. Occurrence of *Botrytis cinerea* on *Pelargonium* spp in Argentina. Plant Disease 90 (8): 1107.
- PATROWSKA, E. 2002. The role of rhizosphere antagonistic microorganisms in limiting the infection of underground parts of spring wheat. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Horticulture. www.ejpau.media.pl/series.
- PENG, G. and J.C.SUTTON. 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. Ca. J. Plant Pathology 13: 247-257.
- PENG, G.; J.C. SUTTON and P.G. KEVAN. 1992. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Plant Pathology 14: 1117-129.
- PÉREZ, J.A. 2004. Fungicidas. Pp. 95-100. En: MOYA, M.; R. GIMÉNEZ y J.A. PEREZ. La salud de las plantas. El cuidado de jardines, huertas, viveros y parques. Grupo Guía S.A. Buenos Aires.
- PIC, K. and Y.C.M. BROUWER, 1993. Susceptibility of cut rose flower cultivars to infection by different isolates of *Botrytis cinerea*. Journal of Phytopathology 137: 233-244.
- PIE, K. and G.T.N. DE LEEUW 1991. Histopathology of the initial stages of the interaction between rose flowers and *Botrytis cinerea*. Netherlands Journal of Plant Pathology 97:335-344.
- PITT, J.I. 1973. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. Mycologia 65: 1135-1157.
- PITT, J.I. 1974. A synoptic key to the genus *Eupenicillium* and to sclerotigenic *Penicillium* species. Canadian Journal of Botany 52: 2231-2236.
- PITT, J.I. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. London. 634 pp.
- PITT, J.I. 2000. A laboratory guide to common *Penicillium* species. 3rd. Edition. CSIRO, North Ryde. 197 pp.
- PITT, J.I and A.D. HOCKING 1997. Fungi and food spoilage. Blackie Academic & Professional. Great Britain. 593 pp.

- PITTA, G.P.B. and J. TERANISHI. 1973. *Phomopsis* and *Botryodiplodia* associated with rose stem and desiccation. *Biologico* 39: 21-23.
- PIZZINGRILLI. P.; E.R. WRIGHT; D. CABRAL; M. SICCARDI; J. CAMPOS HAEDO; M. CALIGARIS y M. MIZUNO 2003. Atizonamiento de los rosales ocasionado por *Alternaria alternata*. V Jornadas Nacionales de Floricultura. San Miguel de Tucumán.
- PLAUT, J.L. and R. D. BERGER. 1981. Infection rates in three patosystem epidemics initiated with reduced disease severities. *Phytopathology* 71:917-921.
- RAHE, J.E. and R.S. UTHEDE, 1985. Integrated biological and chemical control of sclerotial pathogens. Pp. 124-126. In: PARKER, C.A. Ecology and management of soilborne plant pathogens. St. Paul. The American Phytopathological Society.
- RAI, M.K. 1985. The pathogen of a serious leaf spot of roses at Hirdagarh was identified as *Pestalotiopsis adusta*. *Indian Botanical Reporter* 4: 1.
- RAPOSO, R.; J. DELCAN, V. GOMEZ and P. MEGAREJO 1996. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathology* 45:497-505.
- RAYNER, R. 1970. A Mycological Colour Chart. Comm. Mycol. Inst. Kew Surrey, England.
- REDMOND, J.C. 1987. Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. *Plant Disease* 71: 799-802.
- REDMOND, J.C.; J.J. MAROIS; J.D. MAC DONALD. 1987. Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. *Plant Disease* 71:799-802.
- REGLINSKI T.; P.A.G. ELMER; J.T. TAYLOR; F.J. PARRY; R. MARSDEN and P.N. WOOD 2005. Suppression of *Botrytis* bunch rot in Chardonay grapevines by induction of host resistance and fungal antagonism. *Australasian Plant Pathology* 34: 481-488.
- RIFAI, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* N° 116: 1-6.

- RIFAI, M.A. and R.C. COOKE 1966. Studies on some didymosporous genera of nematode trapping hyphomycetes. Transactions of the British Mycological Society 49:147-168.
- RIVERA, M. 2005. Aspectos biológicos del patosistema *Cyclamen persicum* – *Botrytis cinerea* y micoflora asociada. Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 140 pp.
- RIVERA, M.; M.V. LOPEZ y S.E. LOPEZ 2001. Evaluación de microorganismos para el control biológico de *Botrytis cinerea* en violeta de los Alpes. Fitopatología Brasileira 26 (suplemento): 474.
- RIVERA, M.C. and S.E. LOPEZ. 2004. First Report of *Botrytis cinerea* on pansy flowers in Buenos Aires. Plant Disease 88:1164.
- RIVERA, M.C. and S. LOPEZ. 2006. First report of *Botrytis* gray mold on common calla lily in Buenos Aires, Argentina. Plant Dis. 90:970.
- RIVERA, M.C., M.G. MAZZA y E.R. WRIGHT. 1999. Podredumbre de la hoja y flores de *Primula* spp. en Buenos Aires (Argentina). Rev. Facultad de Agronomía 19 (2): 147-150.
- RIVERA, M.C.; D.E. MORISIGUE and S.E. LOPEZ. 2004. First report of *Hydrangea macrophylla* flower spot caused by *Botrytis cinerea* in Buenos Aires. Plant Disease 88:1160.
- RIVERA, M.C. and E.R. WRIGHT. 2002. First report of blight caused by *Botrytis cinerea* on china rose in Argentina. Plant Health Progress <http://www.plantmanagementnetwork.org/php/briefs/chinarose/top.cfm>.
- RIVERA, M.C.; E.R. WRIGHT, D. CABRAL; S.E. LÓPEZ y M.V. LÓPEZ. 1998. Aislamiento, evaluación y preselección de biocontroladores fúngicos en especies ornamentales. Fitopatología 34: 61.
- ROBERTS, R.G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. Phytopathology 80: 526-530.
- ROSSLENBROICH, H.J. and D. STUEBLER 2000. *Botrytis cinerea* – History of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protection 19: 557-561.

- ROTEM, J. 1994. The Genus **Alternaria**. Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS, Minnesota, 326 PP.
- ROWELL, D. 1990. Pests and diseases of roses. Combined Proceedings. International Plant Propagators' Society 40: 260-263.
- SABUQUILLO, P.; DE CAL, A. and P. MELGAREJO 2006. Biocontrol of tomato wilt by **Penicillium oxalicum** formulations in different crop conditions. Biological Control 37: 256-265.
- SAHNI, M.L. 1973. **Alternaria** leaf blight of roses and its control through fungicidal sprays. Indian Journal Of Mycology and Plant Pathology 3: 150-152.
- SAMUELS, G.J. 1996. **Trichoderma**: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research 100: 923-935.
- SAS. 1996. Stat User's Guide. 4ª Edición. Vol I 520-614 pp; Vol II 1614-1641pp. Cary, NC. USA.
- SERRA, R.; A. LOURENCO; P. ALÍPIO and A. VENÂNCIO 2006. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on **Aspergillus** and **Penicillium** species. Mycological Research 110:971-978.
- SEZGIN, E.; A. KARCILIOGLU and M. ESENTEPE. 1973. The first report of **Alternaria** leaf spot on rose in Turkey. Journal of Turkish Phytopathology 2: 88-89.
- SHAFIA, A.; J.C. SUTTON; H. YU and R.A. FLETCHER 2001. Influence of preinoculation light intensity on development and interactions of **Botrytis cinerea** and **Clonostachys rosea** in tomato leaves. Canadian Journal of Plant Pathology 23: 346-357.
- SHTIENBERG, D. and Y. ELAD. 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of **Botrytis cinerea**. Phytopathology 87: 332-340.
- SHUKLA, P. and P.N. CHOWDHRY. 1991. A new wilt disease of roses caused by **Fusarium solani** (Mart.) Sacc. Advances in Horticulture and Forestry 3:171-172.
- SIMAY, E.I. 1991. Results of seed tests. VII. Occurrence of **Fusarium** species and **Trichotecium roseum** Link. on stored seeds of lentil. Lens Newsletter (ICARDA). Lentil Experimental News Service 18 (1-2): 36-38.

- SOARES DE MELO, I. 1991. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. No controle biológico de doenças de plantas. Pp. 136-156. En: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA.
- STEEL, R. and J.H. TORRIE. 1985. Bioestadística. Principios y procedimientos. 2ª Edición. México. Mc Graw-Hill. 622 pp.
- SUTTON, B.C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Micologycal Institute. Kew, England. 696 pp.
- SUTTON, J.C. 1990. Epidemiology and management of botrytis leaf blight of onion and gray mold of strawberry: a comparative analysis. Canadian Journal of Plant Pathology 12: 100-110.
- SUTTON, J.C. 1994. Biocontrol of aerial plant diseases: perspectives and application of epidemiology and microbial ecology. Anales del 4º SICONBIOL. Simposio de controle biologico. Gramado. Basil. EMBRAPA_CPACT. 140-151.
- SUTTON, J.C.; L. DE-WEI; G. PENG; H. YU; P. ZHANG y R.M. VALDEBENITO-SANHUESA. 1997. A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. Plant Disease 81: 318-328.
- SUTTON, J.S.; W. LIU; R. HUANG and N. OWEN-GOING 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and supress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. Biocontrol Science and Technology 12: 413-425.
- SUTTON, J.C. and G. PENG. 1993. Manipulating and vectoring of bioncontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. Annual Review of Phtopathology 31:473-493.
- SWEETS, L.E., F.L. PFLEGER, F.C.MORGAN and J. R. MIZICKO. 1982. Control of fungi associated with cankers of greenhouse roses. Plant Disease 66: 491-494.
- SZANDALA, E.S. and D. BACKHOUSE. 2001. Suppression of sporulation of *Botrytis cinerea* by antagonists applied after infection. Australasian Plant Pathology 30: 165-170.
- TRONSMO, A y L.G. HJELJORD. 1997. Biological control with *Trichoderma* species. Pp. 111-126. In: G.J. BOLAND y L.D. KUYKENDALL (editors) Plant-Microbe Interactions and biological control. Marcel Dekker Inc. New York.

- ULHOA, C.J. 1996. Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. 5º Siconbiol. Simposio de controle biológico. Foz de Iguaçu, Brasil. Anais: Conferencias y palestras pp. 234-238.
- ULLSTRUP, A.J. 1966. Enfermedades del maíz en los Estados Unidos y su control. Manual de Agricultura N° 199. Buenos Aires. INTA. 69 pp.
- VAN DRIESCHE, R.G. and T. S. BELLOWS Jr. 1996. Biological Control. Chapman & Hall. New Cork. 539 pp.
- VARGAS, T.E.; R. NOGUERA y GUNTA SMITS 1989. Algunos hongos patógenos del rosal en la región central de Venezuela. Fitopatología Venezolana 2(1):1015.
- VERHOEFF, K. 1970. Spotting of tomato fruits caused by *Botrytis cinerea*. Netherlands Journal of Plant Pathology 76: 219-226.
- VERO, S. 1998. Metabolismo secundario de hongos filamentosos. Tesis presentada como requisito para obtener el título de Doctor en Química. Facultad de Química. Universidad de la República. Montevideo 131 pp.
- VOLPIN, H. and Y. ELAD. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility or rose flowers to Botrytis blight. Phytopathology 81: 1390-1394.
- WAKELIN, S.A; S.T. ANSTIS; R.A. WARREN and M.H. RYDER 2006. The role of pathogen suppression on the growth promotion by *Penicillium radicum*. Australasian Plant Pathology 35: 253-258.
- WAKELIN, S.A; R.A. WARREN; P.A. HARVEY and M.H. RYDER 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. Biology and fertility of soils 40: 36-43.
- WALLER, J.M. and D.M. MASABA 2006. The microflora of coffee surfaces and relationships to coffee berry disease. International Journal of Pest Management 52:89-96.
- WESTFALL, P.; R. TOBIAS; D. ROM; R. WOLFINGER and Y. HOCHBERG. 1999. Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System. SAS Institute Cary, NC.
- WILLIAMSON, B.; G.H. DUNCAN; J.G. HARRISON; L.A. HADING; Y. ELAD and G. ZIMAND. 1995. Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. Mycological Research 99: 1303-1310.

- WILSON, A.R. 1963. Some observations on the infection of tomato stems by *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of Applied Biology* 24:258-288.
- WOLCAN, S.; R.E. ALVAREZ y M.C. CABRERA. 2001. Oídios de ornamentales. Pp. 419-446. En: Stadnik. M.J. y M. C. Rivera (Eds.). Oídios. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente.
- WOLCAN, S., L. RONCO, E. DAL BO, G. LORI and H. ALIPPI. 1996. First report on diseases on lisianthus in Argentina. *Plant Disease* 80: 223.
- WOLFINGER, R. and M. CHANG. 1995. Comparing the SAS GLM and Mixed procedures for repeated measures. *SUGI 20 Proceedings*, Cary NC., SAS Institute INC. 11 pp.
- WOO, S.L.; F. SCALA; M. RUOCCO and M. LORITO. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96: 181-185.
- WOOD, R.K.S. and M. TVEIT 1955. Control of plant diseases by antagonistic organisms. *Bot. Rev.* 21: 441-492.
- WRIGHT, E.R., 2006. Las enfermedades de los rosales en la República Argentina. *Jornadas de Enfermedades en Cultivos Bajo Cubierta. Actualización Fitosanitaria en Cultivos Protegidos. Libro de Resúmenes* pp 34-37.
- WRIGHT, E.R.; D. CABRAL; P.A. PIZZINGRILLI; G. LORI; G. PÉREZ; M. CALIGARIS y M. MIZUNO 2002a. El atizonamiento de los rosales en la República Argentina. *Primer Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales - Cuartas Jornadas Nacionales de Floricultura. Buenos Aires. Acta de Resúmenes* p. 9.
- WRIGHT, E.R.; D.E. MORISIGUE; M.C. RIVERA y H.E. PALMUCCI. 2001. Las enfermedades de los rosales en la República Argentina. *CETEFFHO-JICA, Buenos Aires.* 46 pp.
- WRIGHT, E.R.; H.E. PALMUCCI; S. VERO; M.J. PIANZZOLA; M.R. MOSCATELLI y S. CAPUCCHIO. 2003. Podredumbre de bulbos de especies ornamentales ocasionada por *Penicillium minioluteum* en Argentina. *PHYTON (internacional Journal of Experimental Botany)* 53:241-250.

- WRIGHT, E.R., G. PÉREZ, G.A. LORI, S. MARINO y P. PIZZINGRILLI. 2002b. Atizonamiento de tallos del rosal ocasionado por *Fusarium verticillioides*. IX Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Río Cuarto (Córdoba) del 23 al 26 de junio 2002. Acta de Resúmenes pág. 106.
- WRIGHT, E.R.; P. PIZZINGRILLI, M.V. CALIGARIS y D. CABRAL. 2007. Rose Dieback Caused by *Trichothecium roseum* in Argentina. Plant Disease 91: 631.
- WRIGHT, E.R.; M.C. RIVERA y H.E. PALMUCCI. 1996. *Botrytis cinerea* en plantas cultivadas para flor de corte en Argentina. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 2: 59-63.
- WRIGHT, E.R.; P. VASQUEZ; A. CRELIER; M. CALIGARIS, M. MIZUNO y D. CABRAL, 2006. Atizonamiento de rosales ocasionado por *Phomopsis* sp. Tercer Congreso Argentino de Floricultura, Octavas Jornadas Nacionales de Floricultura. La Plata. Acta de Resúmenes pág. 269-270.
- WRIGHT, E.R.; R. ZAPATA; O. DE DELFINO; M. LÓPEZ y M. SENLLE. 1988. Eficiencia in vitro de antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. Revista de la Facultad de Agronomía 9: 109-116.
- YOHALEM, D.S. 2004. Evaluation of fungal antagonists for grey mould management in early growth of pot roses. Annals of Applied Biology 144: 9-15.
- YOHALEM, D.S. and K. KRISTENSEN 2004. Optimization of timing and frequency of application of the antagonist *Ulocladium atrum* for management of gray mold in pot rose under high disease pressure. Biological Control 29: 256-259.
- YOHALEM, D.S.; K. PAASKE; K. KRISTENSEN and J. LARSEN 2007. Single application prophylaxis against gray mold in pot rose and pelargonium with *Ulocladium atrum*. Biological Control 41: 94-98.
- YPEMA, H.L.; P.A. VAN DE POL and G.J. BOLLEN. 1987. Black rot of stentlings of roses: a new disease caused by various soil fungi. Scientia Horticulturae 33: 269-280.
- YU, H. and J.C. SUTTON. 1997. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. Canadian Journal of Plant Pathology 19: 237-246.

- YU, H. and J.C. SUTTON. 1998. Effects of inoculum density, wetness duration, and temperature on control of *Botrytis cinerea* by *Gliocladium roseum* in raspberry. Canadian Journal of Plant Pathology 20: 243-252.
- YU, H. and J.C. SUTTON. 1999. Density dynamics of *Gliocladium roseum* in relation to biological control of *Botrytis cinerea* in red raspberry. Canadian Journal of Plant Pathology 2: 23-32.
- ZANATTA, R.; B. MINISCALCO; J. GUARRO; J. GENÉ; M.T. CAPUCCHIO; M.G. GALLO; B. MIKULICICH and A. PEANO 2006. A case of disseminated mycosis in a German dog due to *Penicillium purpurogenum*. Medical Mycology 44: 93-97.
- ZHANG, P.G.; J.C. SUTTON and A.A. HOPKIN. 1996a. Inoculum concentration and time of application of *Gliocladium roseum* in relation to biocontrol of *Botrytis cinerea* in black spruce seedlings. Canadian Journal of Forest Research 26: 360-367.
- ZHANG, P.G.; J.C. SUTTON, W. TAN and A.A. HOPKIN 1996b. *Gliocladium roseum* reduces physiological changes associated with infection of black spruce seedlings by *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Plant Pathology 18: 7-13.
- ZHANG, H.; L. WANG; Y. DONG; S. JIANG; J. CAO and R. MENG 2007. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. Biological Control 40: 287-292.
- ZHOU, T.; C.L. CHU; W.T. LIU; and K.E. SCHNEIDER 2001. Postharvest control of blue mold and gray mold on apples using isolates of *Pseudomonas syringae*. Canadian Journal of Plant Pathology 23: 246-252.
- ZIMAND, G.; Y. ELAD; I. CHET. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology 86: 1255-1260.

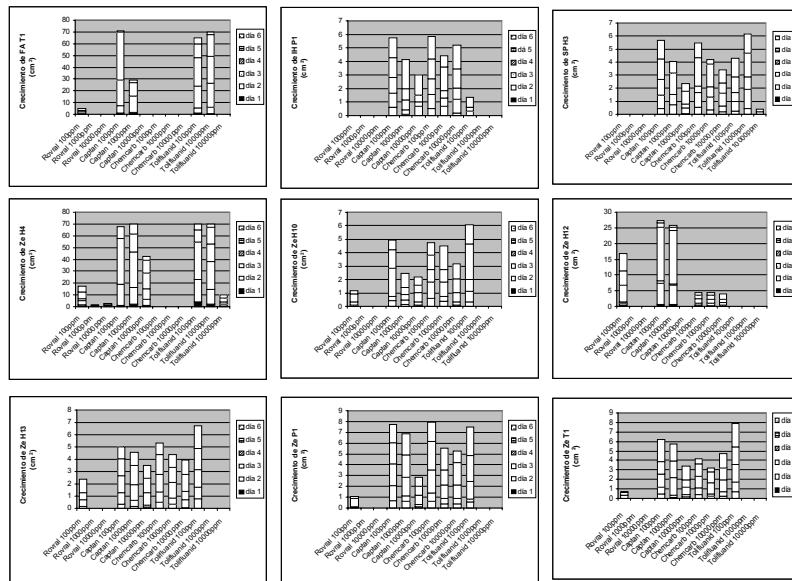


Figura 34 : Crecimiento de los antagonistas preseleccionados, en APG adicionado con cuatro fungicidas a tres dosis.