



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

USO DE LUZ UV-C PARA MEJORAR LA CALIDAD POSTCOSECHA DE ROSA (*Rosa hybrida*)

EDUARDO ZALATIEL ESPEJEL MAYCOTTE

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Eduardo Zalatiel Espejel Maycotte, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DRA. MA. DE LOURDES C. AREVALO GALARZ, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Uso de luz UV-C para mejorar la calidad postcosecha de Rosa (Rosa hybrida) y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 11 de mayo de 2019



Firma del
Alumno (a)



DRA. MA. DE LOURDES C. AREVALO GALARZ
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: “USO DE LUZ UV-C PARA MEJORAR LA CALIDAD POSTCOSECHA DE ROSA (*Rosa hybrida*)”, realizada por el alumno: **Eduardo Zalatiel Espejel Maycotte**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJEROA:



Dra. Ma. de Lourdes C. Arévalo Galarza

ASESOR:



Dr. J. Alfredo Carrillo Salazar

ASESOR:



Dr. J. Refugio Lomeli Flores

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2019

USO DE LUZ UV-C PARA MEJORAR LA CALIDAD POSTCOSECHA DE ROSA (*Rosa hybrida* L.)

Eduardo Zalatiel Espejel Maycotte, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

El moho gris (*Botrytis cinerea*) es una de las enfermedades que mayores pérdidas económicas causa a las rosas de corte. Diversos tratamientos se han utilizado para reducir su incidencia, sin embargo, los tratamientos químicos son los mayormente utilizados, causando el desarrollo de resistencia. La aplicación de luz UV-C (254 nm) es un tratamiento que ha probado ser efectivo en el control de patógenos en equipo y alimentos, debido a que la luz UV-C es capaz de dañar el ADN afectando su reproducción, además de estimular el metabolismo secundario de las plantas, que le permitirá defenderse de los patógenos. En este estudio se aplicaron tres dosis de luz UV-C (~1.0, ~1.5 y ~2.0 KJ m⁻²) sobre el crecimiento micelial y la germinación de los conidios de *B. cinerea*. Los resultados mostraron un efecto fungicida de la luz UV-C, al inhibir el 100% del crecimiento del micelio por 4 d y más del 90% la germinación de los conidios *in vitro*. De la misma forma al inocular tallos de dos cultivares de rosa (“Proud” y “Polar Star”), con conidios irradiados la infección por *B. cinerea* se redujo significativamente. Por otro lado, al irradiar los tallos de rosa con dosis de ~1.0, ~ 1.5 y ~ 2.0 kJ m⁻² e inocularse con conidios viables, la infección alcanzó un grado de severidad en los pétalos, similar a los tallos testigo, pero con diferencias significativas entre cultivares, pues en el cultivar “Polar Star” los daños se manifestaron en menor tiempo. Al realizar los cortes histológicos de ambos cultivares, se observó que los pétalos de “Proud”, tienen mayor grosor en la epidermis adaxial y abaxial además de mostrar numerosas papilas en la epidermis adaxial. Estos resultados muestran las limitaciones de la aplicación de luz UV-C en el manejo postcosecha de flores de corte.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, susceptibilidad, moho gris, rosas de corte

USE OF UV-C LIGHT TO IMPROVE THE POSTCOSECHA QUALITY OF ROSA (*Rosa hybrid* L.)

Eduardo Zalatiel Espejel Maycotte, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Gray mold (*Botrytis cinerea*) is one of the diseases that causes a high economic losses in cut roses. Various treatments have been used to reduce its incidence, however chemical treatments are the most used, and causing fungi resistance. The application of UV-C light (254 nm) is a treatment that has proven to be effective in the control of pathogens used in food and equipment, because the UV-C light is capable of damaging the DNA affecting the reproduction of the organism, and in plants, an increase of secondary metabolism activity, which will allow them to defend against pathogens. In this study, three doses of UV-C light (~ 1.0, ~ 1.5 and ~ 2.0 kJ m⁻²) were applied on the mycelial and conidia of *B. cinerea*. The results showed a fungicidal effect of the UV-C light, by inhibiting 100 % of the mycelial growth by 4 d and more than 90 % the germination of the conidia *in vitro*. Moreover when inoculating stems of two rose cultivars ("Proud" and "Polar Star"), with irradiated conidia the infection by *B. cinerea* was significantly reduced. On the other hand when irradiating the stems of rose with doses of ~ 1.0, ~ 1.5 and ~ 2.0 kJ m⁻² and inoculated with viable conidia, the infection reached a high severity in the petals, similar to the control stems, but with differences significant among cultivars, because the damage in the cultivar "Polar Star" manifested in less time. The histological tissues in both cultivars, it was observed that the petals of "Proud", have greater thickness in the adaxial and abaxial epidermis besides showing numerous papillae in the adaxial epidermis. These results show the limitations of the application of UV-C light in the postharvest handling of cut flowers.

Keywords: Phenolic compounds, susceptibility, grey mold, cut roses.

DEDICATORIA

A mi hermoso hijo
Marcos Zalatiel Espejel

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias en el Colegio de Postgraduados.

Al Colegio de Postgraduados en especial al Programa de RGP – Fisiología Vegetal por la oportunidad brindada.

A la Dra. Ma. de Lourdes Arévalo Galarza por la oportunidad brindada y su gran apoyo y conocimiento para la realización de la presente investigación.

Al Honorable Consejo Examinador: Dra. Ma. de Lourdes C. Arévalo Galarza; Dr. J. Alfredo Carrillo Salazar; Dr. J. Refugio Lomelí Flores; M. C. Victoria Ayala Escobar por su tiempo de oro y amplio conocimiento dedicado en la realización y termino de la presente investigación. GRACIAS.

A la empresa PROFLOSETEQ. S. P. R. de R. L. por el gran apoyo del material vegetal de enero 2017 a junio del 2019. En especial al Ing. Eduardo Espejel Valdés.

A la M. C. Victoria Ayala Escobar por su paciencia y gran conocimiento en Fitopatología. GRACIAS.

Al Dr. Daniel Nieto Ángel por la gran oportunidad de trabajar en su laboratorio y amplio conocimiento en Fitopatología.

Al Dr. Jorge Cadena Iñiguez por el curso brindado y grandes ideas.

A la Dra. Alejandra; Dr. Ibar; Dra Isis por sus ideas intelectuales.

A mis compañeros de diferentes cursos por su apoyo, el gran trabajo en equipo y convivencia, en especial al M. C. Huasanche; M. C. Paloma y M. C. Jaime.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para la ideología de la presente investigación.

GRACIAS

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| RESUMEN..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| DEDICATORIA..... | vi |
| AGRADECIMIENTOS | vii |
| LISTA DE CUADROS | x |
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| Importancia económica del cultivo de rosal (<i>Rosa hybrida</i> L.) | 3 |
| Principales enfermedades en el cultivo de rosa (<i>Rosax hybrida</i>)..... | 4 |
| Métodos físicos para el control de <i>Botrytis cinerea</i> | 8 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| Aislamiento e identificación morfológica | 11 |
| Identificación molecular | 13 |
| Preservación de <i>Botrytis cinerea</i> para su posterior manejo | 14 |
| Prueba de Patogenicidad (Postulados de Koch) | 14 |
| Material vegetal | 15 |
| FASE I | 15 |
| Aplicación de luz UV-C <i>in vitro</i> sobre el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> | 15 |
| Aplicación de radiación UV-C <i>in vitro</i> durante la germinación de <i>Botrytis cinerea</i> | 17 |
| FASE II..... | 17 |
| Inoculación de rosa con suspensión de <i>Botrytis cinerea</i> irradiada..... | 17 |
| FASE III..... | 20 |
| Irradiación de tallos de rosa con luz UV-C e inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> .. | 20 |
| Cuantificación de fenoles | 20 |
| Análisis histológico de los pétalos de ambos cultivares | 21 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 22 |
| Caracterización e identificación morfológica del patógeno | 22 |
| Identificación molecular | 25 |
| Prueba de Patogenicidad (Postulados de Koch) | 25 |

| | |
|---|-----------|
| FASE I | 25 |
| Aplicación de radiación UV-C <i>in vitro</i> sobre el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> | 25 |
| Aplicación de radiación UV-C <i>in vitro</i> durante la germinación de <i>Botrytis cinerea</i> | 29 |
| FASE II | 31 |
| Inoculación de flores de rosa con suspensión de <i>Botrytis cinerea</i> irradiada | 31 |
| FASE III | 34 |
| Irradiación con UV-C de flores de rosa e inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> | 34 |
| Efecto del tiempo de irradiación de los tallos de rosa y su respuesta a la infección con <i>Botrytis cinerea</i> | 40 |
| Cuantificación de fenoles | 42 |
| Análisis histológico de los pétalos de ambos cultivares | 45 |
| CONCLUSIONES | 48 |
| LITERATURA CONSULTADA | 49 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Características histológicas de los pétalos | 46 |
|--|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Epidemiología y aerobiología de <i>Botrytis</i> spp. (Carisse, 2016)..... | 5 |
| Figura 2. Ejemplo de ciclo de vida de <i>Botrytis</i> spp. (Agrios, 2006). | 6 |
| Figura 3. Ciclo de desarrollo sexual y asexual de <i>Botrytis</i> (F.M.D. (Molly) and R. Grant-Downton). | 7 |
| Figura 4. Material vegetal en campo bajo invernadero | 11 |
| Figura 5. Purificación de la cepa por punta de hifa (flecha) de micelio hialino | 12 |
| Figura 6. Cajas Petri con conidióforos en esporulación (A). Flor de rosa inoculada (B). Condiciones aptas para la infección (C)..... | 14 |
| Figura 7. Cultivares de rosa evaluados A) Polar Star® y B) cultivar Proud® | 15 |
| Figura 8. Punto de corte (AA 1/2) para las evaluaciones de ambos cultivares (A), inoculación de las flores (B) y homogeneidad de la aspersion (C). | 18 |
| Figura 9. Escala de severidad de la infección de <i>Botrytis cinerea</i> sobre los pétalos de los cultivares de <i>Rosa hybrida</i> L. Polar Star® y Proud®..... | 19 |
| Figura 10. Cepa pura de 4 días de edad a partir del método punta de hifa (A) y crecimiento concéntrico de micelio que formó esclerocios negros (B). | 24 |
| Figura 11. Colonia de 15 días de edad (A cara superior, B cara inferior) y C, colonia de más de un mes de edad. | 24 |
| Figura 12. Conidióforo ramificado con conidios (A) y conidios con forma ovoide (B).. | 24 |
| Figura 13. Respuesta del crecimiento del micelio in vitro, después de aplicarle luz UV-C (254 nm) a diferentes dosis bajo las condiciones descritas (n=48 ± EE)..... | 27 |
| Figura 14. Prueba fungicida de discos de PDA con micelio de <i>Botrytis cinerea</i> irradiado a ~ 1.0 kJ m ⁻² (A), ~ 1.5 kJ m ⁻² (B) y ~ 2.0 kJ m ⁻² (C) colocados en nuevo PDA. | 28 |
| Figura 15. Crecimiento del micelio de <i>Botrytis cinerea</i> bajo los tratamientos (T0 = 0 kJ m ⁻² ; T1= ~ 1.0 kJ m ⁻² ; T2= ~1.5 kJ m ⁻² y T3= ~ 2.0 kJ m ⁻²) a los 4 d después de irradiación (A), y crecimiento del micelio bajo los tratamientos 8 d después..... | 28 |
| Figura 16. Porcentaje de germinación de los conidios de <i>Botrytis cinerea</i> irradiados a diferentes dosis de luz UV-C (254 nm) (n=48 ± EE)..... | 30 |
| Figura 17. Germinación de los conidios después de la aplicación de los tratamientos (T0 = 0 kJ m ⁻² ; T1= ~ 1.0 kJ m ⁻² ; T2= ~1.5 kJ m ⁻² y T3= ~ 2.0 kJ m ⁻²)..... | 31 |
| Figura 18. Índice de severidad en “Polar Star” después de inocularlo con conidios de <i>Botrytis cinerea</i> viables a diferentes dosis de irradiación con luz UV-C | 32 |
| Figura 19. Índice de severidad de rosas “Proud” irradiados con diferentes dosis de luz UV-C e inoculados con conidios de <i>Botrytis cinerea</i> viables | 33 |
| Figura 20. Índice de severidad de los tallos de “Polar Star” irradiados con luz UV-C a diferentes dosis y posteriormente inoculados con conidios de <i>Botrytis cinerea</i> viables. | 35 |
| Figura 21. Índice de severidad de los tallos de “Proud” irradiados a diferentes dosis de luz UV-C e inoculados con conidios viables de <i>Botrytis cinerea</i> | 36 |
| Figura 22. Severidad en “Polar Star” (A) y “Proud” (B) por tratamiento 8 d después de la inoculación con <i>B. cinerea</i> irradiada. Y severidad en “Polar Star” (C) y “Proud” (D) por tratamiento 8 d después de la irradiación y posteriormente inoculados con conidios viables de <i>B. cinerea</i> | 39 |
| Figura 23. Índice de severidad en “Proud” después de inocularlo con conidios viables (T02) y tallos irradiados (T1= ~ 1 kJ m ⁻²) posteriormente inoculados con conidios viables 0, 6 y 12 horas después. Y tallos aparentemente sanos (T01)..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Figura 24. Cantidad de fenoles totales (mg g^{-1}) en “Polar Star” después de la irradiación (0, 6 y 12 horas después). | 43 |
| Figura 25. Cortes histológicos de “Polar Star” (A) y “Proud” (B) | 47 |

INTRODUCCIÓN

La producción de rosa (*Rosa hybrida* L.) de corte reportada en México para 2016 fue de 7.6 M de gruesas, ubicando a esta especie en el primer lugar de importancia comercial (SIAP, 2017). El estado de México es el mayor productor de esta especie, con una participación de 6.8 M de gruesas, representando el 75.5 % del volumen total. El volumen exportado, fue de solo 2,953 toneladas, que generaron divisas por 6.4 M de dólares, siendo el destino principal Estados Unidos (99.4 %) (SIAP, 2018).

Sin embargo, durante todo el proceso de producción, el cultivo del rosal es afectado por *Botrytis cinerea* (moho gris), causando graves pérdidas económicas. Se ha reportado que en los centros de subasta de flores en Holanda la infección por *Botrytis* spp., redujo la vida de florero hasta por tres días rosas de corte, con pérdidas de hasta € 1.3 millones a nivel mundial (Elad *et al.*, 2016b; Vrind, 2003).

En la actualidad el método más común para minimizar el daño causado por *Botrytis*, es el uso de fungicidas con buenos resultados cuando se inicia la aplicación. Sin embargo, el uso continuo y sin control de estas sustancias químicas, generan resistencia del microorganismo (Fillinger y Walker, 2016). Además el uso indiscriminado de estos productos pone en riesgo la salud de los trabajadores y consumidores, además de la contaminación al medio ambiente.

Por tal motivo, es importante encontrar métodos amigables con el ambiente y que no generen resistencia, y puedan ser utilizados en flores de corte, para reducir la incidencia de *Botrytis cinerea*.

Algunos métodos usados para reducir la incidencia de esta enfermedad son: agua caliente, aire caliente, radiofrecuencia, microondas, atmosferas controladas y la luz UV entre otras, sin embargo, no todas pueden ser utilizadas en flores de corte, por su alta susceptibilidad al manejo (Usall *et al.*, 2016).

De acuerdo con Urban *et al.*, (2016) el uso de luz UV-C (254 nm) es una opción viable y segura como método para controlar enfermedades fungosas, debido a que afecta la reproducción celular, porque daña el ADN de los microorganismos además

de inducir estrés en la planta, que estimula la biosíntesis de compuestos de defensa como las fitoalexinas, por lo que es un método de control de la enfermedad que puede usarse en plantas ornamentales (Darras *et al.*, 2014). Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la dosis de luz UV-C en el crecimiento y germinación de *Botrytis cinerea* inoculada en tallos florales de *Rosa hybrida*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia económica del cultivo de rosal (*Rosa hybrida* L.)

La rosa (*Rosa hybrida* L.) es una especie ornamental destaca en el comercio internacional, como flor de corte, así como en la industria cosmética, farmacéutica e incluso en la gastronomía exótica, seguida de otras especies ornamentales como son los crisantemos (*Chrysanthemum x morifolium*), claveles (*Dianthus* sp.) y tulipanes (*Tulipa* sp.). La producción de estas especies ornamentales se obtiene ante un mercado cada vez es más exigente en cuanto a la calidad, inocuidad y variedad del producto (Yong, 2004; SIAP, 2018).

El cultivo del rosal en especial los cultivares del tipo “híbridos de té” (*Rosa x hybrida*), es producido bajo invernadero e injertado sobre un patrón como “Manneti” o “Natal Brian”. El tipo de rosal llamado “hibrido de té” es un arbusto ornamental de porte abierto, tallo leñoso, normalmente espinoso, con longitud entre 50 y 90 cm, hojas pinnadas, con estipula, caducas, ovaladas, compuesta por tres, cinco o más folíolos, la flor suele ser grande y solitaria. Las flores son con o sin fragancia, de diferentes tamaños, formas y colores, actualmente la floración se produce sin requerimiento de horas frío, logrando producir hasta tres cosechas al año, como resultado del mejoramiento genético a través de cruzamientos, hibridaciones y selecciones que aumentan año tras año debido a la gran demanda (Rodríguez y Flórez, 2006; Yong, 2004).

En México para 2017 la producción fue de 9,011,683 gruesas en comparación con 6,558,964 gruesas en el año 2012. Los principales estados productores, por volumen de producción fueron: México, Morelos, Puebla, Querétaro, Jalisco, entre otros. La producción se concentra en ciertos meses del año: 16.1% en febrero, 13.2 % en marzo, 10.4 % en mayo y 14.6 % en diciembre, mientras que la producción más baja se observa en enero con 1.6%.

Principales enfermedades en el cultivo de rosa (*Rosax hybrida*)

Durante el proceso de producción de la rosa, la calidad es afectada severamente por el ataque de hongos fitopatógenos que causan graves daños al follaje y a la flor. Las enfermedades fúngicas más importantes son: la mancha negra (*Diplocarpon rosae* Wolf) (Dong *et al.*, 2017), la roya del rosal, (*Phragmidium mucronatum* (Pers.) Schltd. 1824) (Gado *et al.*, 2016), el mildiú polvoriento, (*Podosphaera pannosa* (Wallr.:Fr) de Bary 1870) (Chandran y Sriram, 2017), el mildiú vellosa (*Peronospora sparsa*) (Salazar *et al.*, 2018) y el moho gris (*Botrytis cinerea*) (Liu *et al.*, 2018).

Sin embargo, una de las especies que ha sido más difícil de controlar en el rosal es *Botrytis* spp. pues ataca tanto en pre como en postcosecha. Tiene un amplio espectro de ataque (aproximadamente 1400 huéspedes) que incluyen especies de más de 170 familias de plantas cultivadas. Algunas especies de este patógeno tienen comportamiento endófito al poder permanecer en el tejido vegetal sin mostrar síntomas de la enfermedad. Las plantas hospederas del patógeno, son desde especies de climas tropicales hasta de regiones frías tanto en lugares húmedos como en secos, a la intemperie o en invernadero, en espacios cerrados o durante el almacenamiento en cámaras frías (Elad *et al.*, 2016).

También, *Botrytis cinerea* es un hongo de comportamiento necrotrófico al destruir las células que componen los tejidos vegetales, para posteriormente alimentarse, además de que después de infectar y causar la muerte del tejido del hospedante, tiene la capacidad de sobrevivir y esporular como saprófito, pudiendo producir esclerocios, como estructuras de supervivencia (Figura 2). El patógeno se dispersa principalmente por el aire y herramientas de uso común a través de los conidios (micro y/o macroconidios) asexuales que una vez maduros invaden al hospedante (Holz *et al.*, 2007; Carisse, 2016) (Figura 1 y 2).

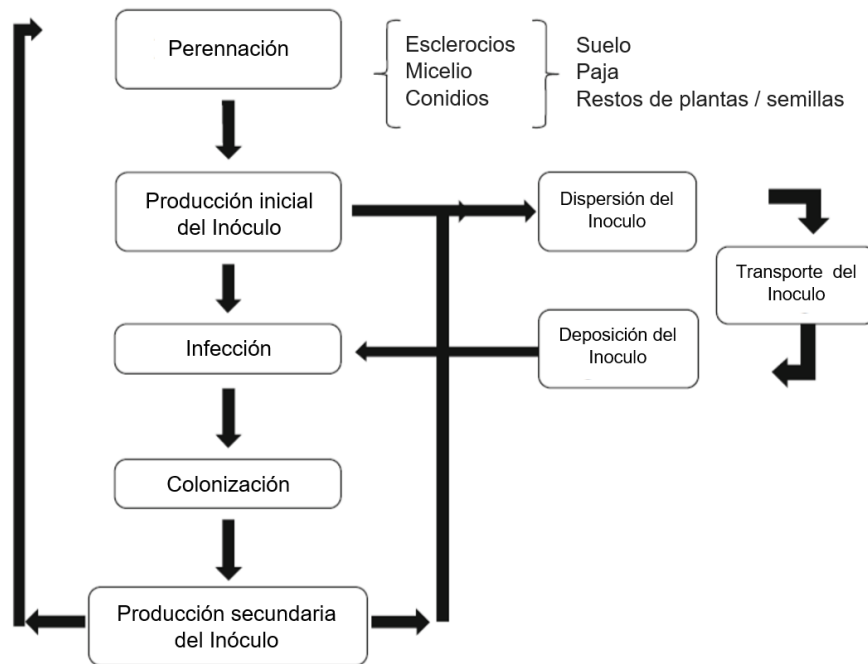


Figura 1. Epidemiología y aerobiología de *Botrytis* spp. (Carisse, 2016).

Independientemente de la ruta del inoculo para dispersarse y depositarse, (Figura 2), la germinación de los conidios es fuertemente influenciada por la humedad del medio, que a 93% es esencial tanto para la germinación como para la penetración. A una temperatura óptima (15 a 20 ° C) la infección tarda por lo menos 4 h (Carisse, 2016).

En *Botrytis* spp, se forman se forman estructuras como las clamidiosporas que son células terminales o intercaladas por transformación de partes de micelio vegetativo y se liberan por desintegración hifal comúnmente observadas en lesiones viejas del hospedante, de diversas formas como estructuras de supervivencia en periodos cortos desfavorables para el hongo (Elad *et al.*, 2016) (Figuras 2 y 3).

En general las especies de *Botrytis* spp., producen numerosas esporas en las puntas de los conidióforos ramificados (Figura 2), su tamaño depende de cada especie y su supervivencia es mediada por la temperatura, humedad, actividad microbiana y exposición a la luz solar. El desarrollo de microconidios resulta de la exposición del hongo a condiciones adversas, y pueden encontrarse en zonas viejas

donde ha estado el hongo a través de sus diferentes estructuras como el tubo germinativo de los propios macroconidios, hifas maduras, etc. (Dewey y Grant-Downton, 2016; Elad *et al.*, 2016).

En invierno el patógeno sobrevive como micelio o esclerocios en tejido de plantas en descomposición. Algunas especies desarrollan la etapa teleomórfica (*Botryotinia* Whetz) en la cual producen apotecios que surgen de esclerocios fertilizados y que posteriormente liberan ascosporas (Dewey y Grant-Downton, 2016) (Figura 2 y 3).

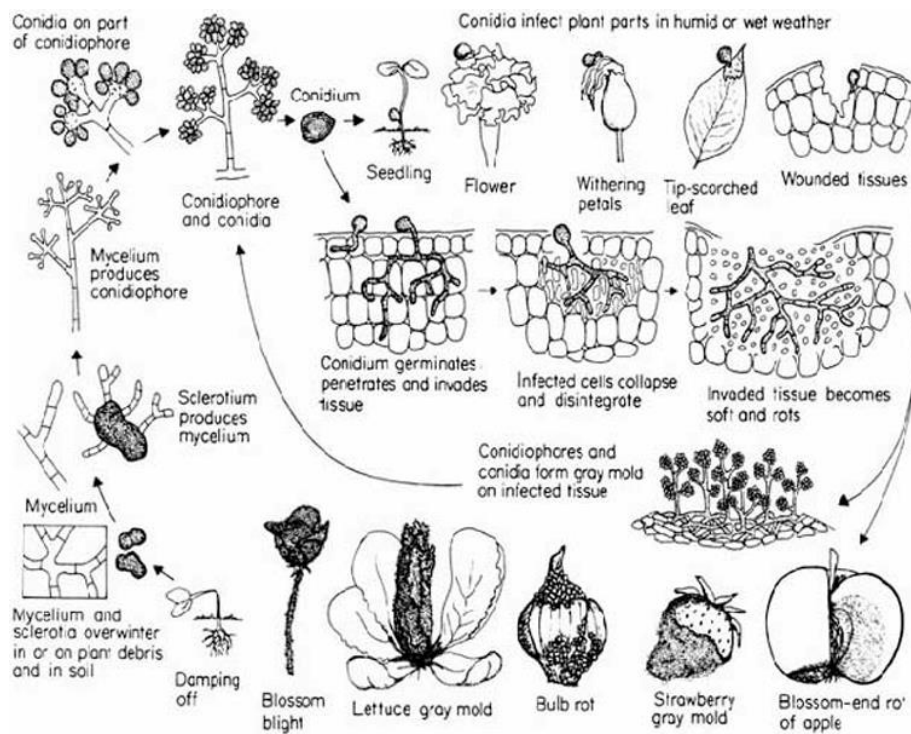


Figura 2. Ejemplo de ciclo de vida de *Botrytis* spp. (Agrios, 2006).

Los microesclerocios (Figura 2 y 3) al estar compuestos de micelio rodeado por una corteza melanizada y β -glucanos, logran sobrevivir durante la sequía, la exposición a luz UV y al ataque microbiano; aún así dichos factores adversos pueden disminuir la población del patógeno. Sin embargo, una pequeña cantidad de esclerocios generalmente tienen potencial de inóculo significativo (Carisse, 2016).

Una vez que el patógeno se ha depositado sobre el huésped, la interacción planta-patógeno, desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la planta como mecanismo de defensa, que el patógeno modula, al poseer un sistema sensible al estrés oxidativo para defenderse del ROS. *B. cinerea* tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios como el ácido botrial y el ácido botcínico, dos fitotoxinas inespecíficas características del comportamiento necrotrófico y polífago del patógeno, capaces de matar las células del hospedante (Collado y Viaud, 2016).

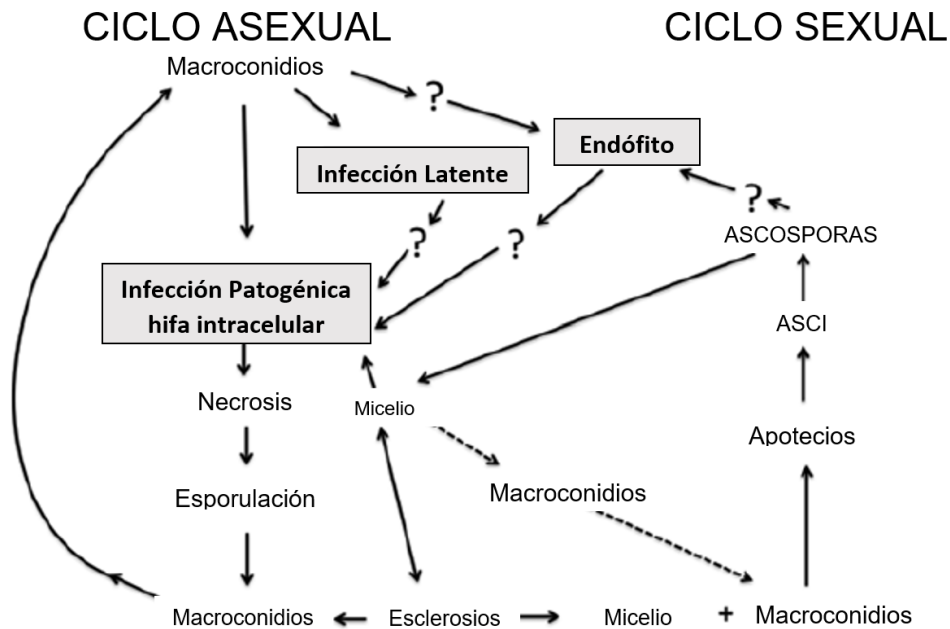


Figura 3. Ciclo de desarrollo sexual y asexual de *Botrytis* (Dewey y Grant-Downton, 2016).

Botrytis sp. tiene la capacidad de adaptarse a cualquier situación adversa durante los procesos de infección, pues modula la reacción del hospedante por el patógeno, por ejemplo, el patógeno puede secretar ARNs a las células del hospedante, y son capaces de silenciar los genes de defensa del huésped mediante el secuestro del sistema de interferencia de ARN de la planta (González *et al.*, 2016).

Para el control de *Botrytis cinerea* se recomiendan diferentes métodos culturales y reducir la humedad del entorno, junto con la aplicación de productos químicos como los benzimidazoles (benomil, carbendazim, tiabendazol, entre otros). Los fungicidas de carbamato de metil bencimidazol (MBC) se introdujeron en el mercado a principios de los años 70 y se utilizaron ampliamente en la agricultura. Los MBC son potentes inhibidores de la polimerización de la tubulina y ejercen sus actividades antifúngicas dirigiéndose a la subunidad β -tubulina de los microtúbulos, lo que resulta en la detención de la formación de microtúbulos y un fallo en la división celular de los hongos, que conduce a la muerte celular (Fillinger y Elad, 2016).

Sin embargo, el uso de fungicidas se ha restringido, debido al impacto que generan hacia el ambiente y a los residuos en la cosecha y al desarrollo de resistencia, ya que *Botrytis* tienen la capacidad de modificar sus sitios de acción ante la presencia de los fungicidas, y muta en las posiciones de aminoácidos 198 y 200 en el gen de la β -tubulina (Banno *et al.*, 2008). Además ha desarrollado resistencia a inhibidores de la enzima succinato deshidrogenasa, como los son los fungicidas: fluopyram, carboxin, isopyrazam, entre otros (FRAC, 2018).

En los últimos años se han desarrollado agentes de control biológico y otros bioplaguicidas, como son los extractos de plantas, minerales y compuestos orgánicos para el control de enfermedades provocadas por *Botrytis* spp. También se han usado microorganismos vivos de los géneros, *Pseudomonas*, actinomicetos (*Streptomyces*), levaduras (*Aureobasidium*) y hongos (*Trichoderma*) para el control biológico, así como aceites minerales y ácidos orgánicos como aceite parafínico y aceite de neem (Elad *et al.*, 2016).

Métodos físicos para el control de *Botrytis cinerea*

De acuerdo con Usall *et al.* (2016), algunas de las tecnologías usadas como tratamientos físicos para el control de enfermedades en postcosecha son: agua o aire caliente, radiofrecuencia, microondas, presión hipobárica e hiperbárica, las atmosferas controladas y la luz UV entre otras; sin embargo, no todas pueden aplicarse a plantas ornamentales.

La radiación UV es radiación electromagnética con longitudes de onda entre 400 y nm, aunque tiene una longitud de onda más larga que los rayos X, es más corta que la luz visible. De manera natural la radiación UV representa el 10 % de la energía irradiada por el sol. La atmosfera bloquea el 77 % de la radiación UV, por lo que a la superficie terrestre solo incide el 3 % de UV. De esta, la radiación UV-C es el tipo de luz UV que tiene más energía pero no atraviesa la atmosfera terrestre (Helmenstine, 2017).

De manera artificial la luz UV puede ser producida por lámparas de vapor de mercurio. De acuerdo con la norma ISO-21348 la radiación UV se clasifica en UV-A con longitudes de onda de 315 a 400 nm (luz negra) la cual no es absorbida por el ozono; UV-B con longitudes de onda de 280-315 nm la cual es mayormente absorbida por el ozono; y UV-C con longitudes de onda de 100 a 280 nm la cual es completamente absorbida por el ozono (Helmenstine, 2018).

El uso de radiación UV-C es una tecnología emergente para el control de enfermedades fungosas en postcosecha. El principio de acción se basa en el efecto nocivo que produce sobre el ADN de los organismos, generando una reacción fotoquímica en las timinas del ADN, formando dímeros entre ellas que inhiben su replicación de forma normal, afectando la germinación de esporas y el crecimiento micelial del hongo. Además la radiación UV-C tiene un efecto inductivo de resistencia sobre el huésped, por ejemplo, la estimulación de compuestos químicos de defensa como las fitoalexinas. Este tipo de radiación concentra su poder germicida entre los 250 y 270 nm, siendo los 254 nm el pico de emisión de mejor efecto germicida (Usall *et al.*, 2016; Millán *et al.*, 2015).

La aplicación de radiación UV-C a 254 nm en la agricultura se ha realizado principalmente sobre la superficie de diversos frutos a dosis en un intervalo de 0.2 hasta 20 kJ m⁻² a una distancia de la superficie o producto a irradiar de 10 a 40 cm con resultados significativos sobre el control de enfermedades fungosas como *Botrytis cinerea* además de inducir la síntesis de metabolitos secundarios como los fenoles y prolongar la vida de anaquel (Millán *et al.*, 2015; Quintero *et al.*, 2013). En cambio, son pocas las investigaciones en cultivos ornamentales.

Por ejemplo, Darras *et al.* (2012) al aplicar luz UV-C en flores de gerbera de corte, los diámetros de las lesiones se redujeron en un 92 a 95 % en comparación con las no irradiadas. La calidad de las flores de “Intenza” y “Ophir” no se vio afectada por el uso de luz UV-C, por el contrario los porcentajes de germinación de los conidios de *Botrytis cinerea* tratados con dosis de 0.5, 1, 2.5 o 5.0 kJ m⁻² se redujeron significativamente en comparación con los conidios no irradiados, el crecimiento del micelio en PDA, se retrasó al primer, segundo y tercer día.

Marquenie *et al.* (2002) observaron que al colocar 100 µL de solución con *B. cinerea* a una concentración de 10⁵ a 10⁶ conidios por ml en medio de cultivo agar de rosa de bengala (ARB) y *Monilinia fructigena*, en extracto de malta agar (EMA), y posteriormente irradiadas con radiación UV-C, los conidios de *Botrytis cinerea* no sobrevivieron a dosis de 1.0 J cm⁻², mientras que conidios de *Monilinia fructigena* se inactivaron por completo a una dosis de 0.50 J cm⁻². La distancia entre las cajas de Petri y las lámparas fue de 14 cm.

Latorre *et al.* (2012) observaron un efecto de control sobre la supervivencia de conidios de *B. cinerea* con radiación UV-A, UV-B y UV-C en donde la viabilidad media de los conidios fue de 38, 31 y 19% respectivamente, resaltando que la inhibición completa del crecimiento se obtuvo con 80 y 110 mJ cm⁻² de irradiación con luz UV-C.

De acuerdo con Quintero *et al.* (2013) la aplicación de radiación UV-C en la agronomía es un método efectivo para el control de hongos fitopatógenos; además, funciona como un elicitador, es capaz de estimular la biosíntesis de compuestos que confieren resistencia al producto y mejoran la calidad del producto (aumento en la vida de anaquel y de compuestos antioxidantes). Es una tecnología de fácil acceso, bajos costos y fácil instalación: es una oportunidad de control de enfermedades en auge para los productores, y que ofrecen productos microbiológicamente estables para el consumo humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación morfológica

El material vegetal fue proporcionado por la empresa PROFLOSETEQ. S. P. R. de R. L. ubicada en la comunidad de Tequexquihuac, municipio de Texcoco, Estado de México. La empresa produce tallos de rosa (*Rosa hybrida* L.) para corte bajo invernadero tipo tierra (Figura 4). La cosecha de los tallos se realizó de enero 2018 a junio 2019, en condiciones ambientales aproximadas de 15 ° C de temperatura media anual y 48 % de humedad relativa media anual.

Inicialmente se tomaron pétalos del cultivar Polar Star® con síntomas característicos del moho gris (Ferrada *et al.*, 2016), posteriormente se desinfectaron con cloro (1.5 %) por 2 min, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron con sanitas estériles, para después colocarlos en condiciones de 100 % de humedad relativa (HR) a una temperatura de 23 ± 2 °C monitoreadas con un Data Logger (HOBO® U12), fin de promover el desarrollo de la enfermedad, hasta observar la formación de estructuras del patógeno.



Figura 4. A) Cultivo bajo invernadero de rosa (*Rosa hybrida* L.); B) Tallos de rosa con síntomas característicos de infección por moho gris

Seis días después se observó la formación de conidióforos con conidios con un estereoscopio (American Optical® 569). Con una aguja de disección estéril se recolectaron las esporas y se depositaron en una caja Petri de 60 x 15 mm de plástico estéril con medio de cultivo agua-agar (2%), e inmediatamente se tapó y selló con Parafilm® colocándola en obscuridad a 23 ± 2 °C para promover su desarrollo.

Cuatro días después se extrajo parte del micelio por el método de punta de hifa (Figura 5) para resembrar en cinco cajas de Petri de 90 x 15 mm de plástico estériles con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), colocando una hifa en la superficie del medio, e inmediatamente se sellaron con Parafilm®, y después, sin sobreponerlas, se colocaron en una incubadora a 23 ± 2 °C con fotoperiodo de 12-12 h, proporcionado por una lámpara lineal fluorescente (Plus Lighting PL-FL-T8) de 32 W / de 6000 K.

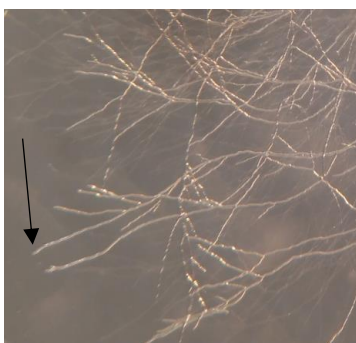


Figura 5. Purificación de la cepa del moho gris por punta de hifa (flecha) de micelio hialino

De un aislamiento puro de 4 d de edad, con ayuda de un saca bocados estéril, se extrajeron 5 discos de 5 mm de diámetro para colocarlos en el centro de cinco cajas Petri con medio de cultivo PDA, las cajas se sellaron e inmediatamente se colocaron sin sobreponerlas en una cámara incubadora e iluminada (B.O.D®, SHEL LAB® LI15), a una temperatura de 23 ± 2 °C con fotoperiodo de 12-12 h aplicado por una lámpara lineal fluorescente (Plus Lighting PL-FL-T8) de 32 W / de 6000 K.

Se observaron las colonias cada día después de la siembra con un microscopio compuesto (Wiloyt® V365) y un estereoscopio (AO Eichert 569) para medir con un vernier digital el crecimiento tomando como referencia dos diámetros representativos, debido a un crecimiento concéntrico del micelio. Después de 10 d, de las colonias con crecimiento homogéneo, se tomaron pequeños trozos de micelio con formación de estructuras, para realizar preparaciones permanentes con glicerol-agua (50 %).

Para la caracterización de las estructuras se midieron 100 conidios por caja, realizando 3 repeticiones por cada una, haciendo un total de 300 conidios. Las evaluaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio compuesto (ROSSBACH® MG-11T) con una cámara CANON® 5D MARK II y el software ENTANGLE® 0.7.2 para digitalizar las imágenes. Una vez capturadas las imágenes, las estructuras se identificaron, con ayuda de las claves taxonómicas de Barnett y Hunter, (1998).

Identificación molecular

Para corroborar la identificación, se secuenció un aislamiento puro de 3 d de edad en el laboratorio de diagnósticos del Colegio de Postgraduados. La extracción del ADN se realizó por el método de bromuro de cetil trimetil amonio (BCTA), posteriormente la muestra de ADN se mandó al Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Autónoma de México (UNAM), donde se realizó la secuenciación. Los iniciadores universales para la amplificación de la región ITS fueron Forward (9351.113BM.ITS4ab1) y Reverse (9352.113BM.ITS5ab1) éstos se limpiaron y ensamblaron con el software FinchTV® 1.4.0 y una vez obtenida la secuencia consenso, se comparó con la base de datos del GeneBank® [National Center for Biotechnology Information (NCBI)], con el software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®).

Preservación de *Botrytis cinerea* para su posterior manejo

Se realizó la preservación de cinco aislamientos por punta de hifa en tubos inclinados con PDA, en donde se colocó fragmentos de micelio. Una vez que se observó la formación de esporas se procedió a colocar 5 mL de aceite mineral estéril, hasta cubrir el medio de cultivo. Los tubos fueron sellados y colocados a temperatura ambiente.

Prueba de Patogenicidad (Postulados de Koch)

En la prueba de patogenicidad se utilizó una solución de esporas de la cepa de *Botrytis cinerea* en agua destilada estéril con formación de conidióforos y conidios, y se ajustó a una concentración de 1×10^4 conidios por ml, el conteo se realizó en cámara de Neubauer.

Para corroborar el desarrollo de la enfermedad se inocularon tallos florales de rosa que fueron asperjados con la solución de esporas (5 mL/ tallo floral), posteriormente se cubrieron con una bolsa de plástico, colocando al pie de las macetas un nebulizador de 5L VUH-5 VITALLYS®, y manteniendo condiciones de 20-25°C y 100% de HR. Se observaron diariamente los pétalos inoculados hasta la aparición de síntomas (Figura 6).

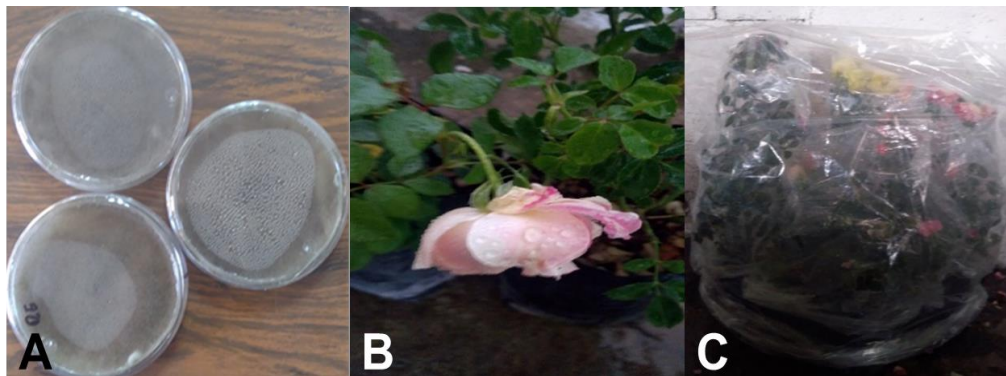


Figura 6. A) Cajas Petri con conidióforos en esporulación. B). Flor de rosa inoculada con conidios de *Botrytis* sp. C). Cámara húmeda para el desarrollo de la enfermedad.

Material vegetal

Se utilizaron dos cultivares blancos de rosa: Polar Star® y Proud® (Figura 7). Los tallos de “Polar Star®” son de longitud promedio del tallo de 50 a 80 cm, número de pétalos promedio de 26 a 40, productividad de tallos por planta por mes de 1.3, vida en florero de 12 a 14 días y dimensión de la flor de 5 a 7 cm (Rosen Tantau®, 2018). Para el cultivar Proud® la longitud de la flor es de 50 a 55 mm, número promedio de pétalos de 40 a 45, tallo de 50 a 70 cm, moderada presencia de espinas, vida en florero de 9 a 11 días, producción por m² por año de 180 a 120 tallos (DeRuiter®, 2018). A fin de evaluar la efectividad de la luz UV-C sobre el crecimiento e infección de *Botrytis* sp. en rosa, la investigación se dividió en tres fases.



Figura 7. Cultivares de rosa evaluados A) Polar Star® y B) cultivar Proud®

FASE I

Aplicación de luz UV-C *in vitro* sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*

Los aislamientos mantenidos en aceite mineral se reactivaron tomando una porción de PDA con micelio, se lavaron repetidas veces con agua destilada estéril, después se sembraron en medio de cultivo PDA y posteriormente se resembraron para eliminar los residuos de aceite.

De cultivos de *Botrytis cinerea* de cuatro días de edad, se tomaron discos de 5 mm de diámetro y se colocaron en cajas Petri (90 mm) con medio de cultivo PDA para su posterior irradiación (Figura 9) con un total de 96 cajas.

La irradiación con UV-C se realizó dentro de una cámara de acero inoxidable de 100 x 60 x 60 cm, con seis lámparas lineales Philips® (TUV 8WG8 T5) con un pico de emisión de 254 nm colocadas en la parte superior y una rejilla de acero inoxidable a una distancia de 18.3 cm de las lámparas. Los tratamientos fueron los siguientes: T0 = 0 kJ m⁻²; T1= ~ 1 kJ m⁻²; T2= ~1.5 kJ m⁻² y T3= ~ 2 kJ m⁻² (el signo ~ significa aproximadamente). Por cada tratamiento se colocaron 8 cajas realizando el experimento por triplicado.

Para alcanzar la dosis adecuada y uniforme las lámparas se encendieron 10 min antes de iniciar el experimento (Janisiewicz *et al.*, 2016). Las cajas Petri se colocaron de manera equidistante; la dosis de irradiación se midió con un radiómetro Lutron (Model UVC-245™).

Las cajas Petri se irradiaron sin tapa a la dosis correspondiente e inmediatamente se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron en obscuridad a una temperatura de 21 ± 2°C.

Posteriormente cada 24 h se midió el crecimiento radial micelial con la ayuda de un vernier digital midiendo dos diámetros representativos de la circunferencia formada por el crecimiento del micelio. El experimento se repitió dos veces. Los datos generados se graficaron para su análisis con ayuda del software Graph Pad Prism®, versión 5.03. La tasa de crecimiento se calculó de acuerdo con fórmula utilizada por Benítez *et al.* (2007):

$$Tc = \frac{Cf - Ci}{Tf - Ti}$$

Dónde:

Tc: Tasa de crecimiento

Cf: Diámetro final expresado en cm

Ci: Diámetro inicial (día uno) expresado en cm

Tf: Día en que termina el crecimiento fúngico

Ti: Día uno

Aplicación de radiación UV-C *in vitro* durante la germinación de *Botrytis cinerea*

Se preparó una suspensión de 1×10^4 conidios por mL de *Botrytis cinerea* de 28 d de edad. Se tomaron 25 mL y se colocaron en una caja Petri de 180 x 15 mm de vidrio y se irradió con UV-C para cada una de las siguientes dosis: 0 kJ m^{-2} , 1.0 kJ m^{-2} , 1.5 kJ m^{-2} y 2.0 kJ m^{-2} . De la suspensión irradiada (Figura 10) se tomaron tres alícuotas de 10 μL y se colocaron en una caja Petri (60 x 15 mm) con medio de cultivo PDA, dejando secar por 10 min. A fin de determinar el efecto de la irradiación con UV-C en la germinación de los conidios, se seleccionaron 100 conidios por alícuota y se observaron en microscopio compuesto, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la caracterización morfológica del patógeno. La evaluación se realizó por duplicado. Los datos generados se graficaron para su análisis con ayuda del software Graph PadPrism®, versión 5.03.

FASE II

Inoculación de rosa con suspensión de *Botrytis cinerea* irradiada

Se preparó una suspensión de *Botrytis cinerea* a una concentración de 1×10^4 conidios por mL de 28 d de edad y se tomaron 250 mL, que se dividió en 4 partes iguales y se colocaron en cajas Petri de vidrio para irradiarse a la dosis correspondiente.

Por otro lado, en la mañana (7:00 am) se cosecharon 25 tallos florales de cada cultivar de rosa en punto de cosecha AA (al menos 2 a 3 pétalos parcialmente separados), e inmediatamente se llevaron al laboratorio, los tallos se cortaron a una longitud de 31.5 cm desde el punto de unión del pedúnculo con el botón floral y se colocaron en botellas de vidrio de 355 mL previamente desinfectadas con cloro al 5 %, conteniendo 300 mL de agua destilada cada una (Figura 8 A).

La suspensión de conidios de cada dosis de irradiación con UV-C se colocó en un aerógrafo BADGER® 250-2 fijo y centrado en una base de madera colocado a una distancia de 28 cm del botón floral. Con el fin de realizar una inoculación homogénea (Figura 8 C) la botella con el tallo floral se colocó en una base giratoria fija con una velocidad de 54 rpm (Figura 8 B). La inoculación se realizó a una presión constante de 13.3 psi durante 30 s con un gasto de 5 ml por flor

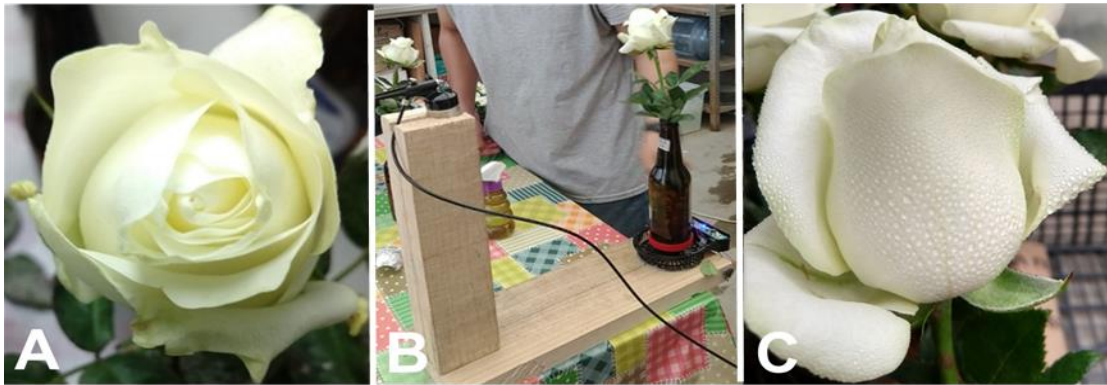


Figura 8. Punto de corte (AA 1/2) en las rosas de ambos cultivares (A), inoculación de las flores (B) y homogeneidad de la aspersion (C).

Una vez inoculados los tallos, se colocaron en una cuarto a 85-90 % HR (Elad, 2016) de 23 a 26 °C y con fotoperiodo de 12-12 h con dos lámparas lineales fluorescentes General Electric® de 75 W. Con el fin de determinar el grado infección se realizó una escala diagramática de la enfermedad con base al estudio de Bautista *et al.* (2016). La evaluación se realizó por duplicado. Los datos generados se graficaron para su análisis con ayuda del software Graph Pad Prism®, versión. 5.03 (Figura 9).



Figura 9. Escala diagramática de severidad de la infección de *Botrytis cinerea* sobre los pétalos de los cultivares de rosa (*Rosa hybrida* L.) Polar Star® y Proud®.

El índice de severidad fue calculado mediante la fórmula desarrollada por Dick *et al.* (1999) y citado por Bautista *et al.* (2016):

$$IS = \frac{0(n_0) + 1(n_1) + 2(n_2) + 3(n_3) + 4(n_4)}{n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4}$$

De donde:

IS = Índice de Severidad

n0 = Número de flores afectadas en el Nivel 0 de severidad

n1 = Número de flores afectadas en el Nivel 1 de severidad

n2 = Número de flores afectadas en el Nivel 2 de severidad

n3 = Número de flores afectadas en el Nivel 3 de severidad

n4 = Número de flores afectadas en el Nivel 4 de severidad

FASE III

Irradiación de tallos de rosa con luz UV-C e inoculadas con *Botrytis cinerea*

Siguiendo el procedimiento de irradiación previamente descrito, se tomaron cinco tallos florales de ambos cultivares y se irradiaron para cada dosis (0, 1, 1,5, 2.0 kJ m⁻²), posteriormente se inocularon con conidios viables de *Botrytis cinerea* (1x10⁴ conidios por mL) de 28 d de edad. El índice de corte fue el mismo que la evaluación anterior (Figura 13).

Posteriormente se comprobó si las dosis de irradiación afectaban el contenido de compuestos fenólicos, para ello se tomaron 12 tallos florales de “Polar Star” y se irradiaron a una dosis de 1 kJ m⁻² y posteriormente se inocularon con *Botrytis cinerea* (1x10⁴ conidios mL⁻¹). Los tratamientos fueron: T0₁ (Tallos florales sin irradiar y sin inocular), T0₂ (Tallos florales sin irradiar, pero inoculados), T1 (Tallos irradiados e inmediatamente inoculados), T2 (Tallos irradiados e inoculados 6 h después) y T3 (Tallos irradiados e inoculados 12 h después). De los 12 tallos irradiados por tratamiento, se seleccionaron 4 tallos sin inocular para medir la concentración de fenoles después de la irradiación. Los datos generados se graficaron para su análisis con ayuda del software Graph Pad Prism®, v. 5.03.

Cuantificación de fenoles

Se tomaron tres muestras de 0.5 g de pétalos (Figura 14) por tratamiento y se maceraron en un mortero agregando gradualmente 10 mL de metanol (80 %) y se colocaron en tubos de ensayo, se mantuvieron a 4°C por 24 h, y después se

centrifugaron por 5 min a 5000 rpm. Posteriormente en tubos de ensayo nuevos se colocaron por tubo, 40 μ L de extracto más 1.56 ml de agua bidestilada y 100 μ L de FolinCicalteu (1 N) y se agitó. Después de 3 min, se agregaron 300 μ L de Na_2CO_3 (20 %), se agitaron y se dejaron reposar por una hora. Después de la reacción la solución se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro (Génesis 10 UV) a 765 nm. Los datos generados se graficaron para su análisis con ayuda del software Graph Pad Prism®, v. 5.03.

Análisis histológico de los pétalos de ambos cultivares

Pétalos sanos recién cosechados de “Proud” y “Polar Star”, se enviaron al laboratorio de Histopatología del Colegio de Postgraduados para realizar cortes histológicos transversales permanentes (Figura 15). Para ello se tomaron porciones de pétalo que se fijaron en solución de FAA (formaldehído: ácido acético: etanol: agua). Posteriormente se deshidrataron, incluyeron en parafina y se montaron en trozos de madera para cortarse en el micrótopo. Los cortes realizados se colocaron en un portaobjetos. Después de secarse, los portaobjetos se colocaron en una estufa de 50 a 52 °C por 24 h para poder desparafinarse con concentraciones ascendentes de xilol y alcohol. Finalmente, los cortes se tiñeron con safranina verde rápido y se observaron al microscopio óptico. Para esto se seleccionaron tres botones florales por cada cultivar, tomando 3 pétalos exteriores de cada botón, y por cada pétalo se realizaron 4 laminillas, con 4 cortes cada uno, en el cual se visualizaron 2 campos, haciendo un total de 288 campos para cada cultivar. De cada campo seleccionado se realizaron 3 mediciones de grosor, 3 de aerénquima y se midieron 20 células de la parta adaxial y 20 de la abaxial del corte. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y separación de medias de Tukey (P, 0.05; con el programa SAS® versión 9.0 (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización e identificación morfológica del patógeno

El micelio mostró un crecimiento ramificado, septado, hialino hasta los 8 d, posteriormente se tornó blanco, después gris claro y finalmente (18 d) a marrón oscuro. El crecimiento en el medio de cultivo fue concéntrico. Los conidióforos se desarrollaron directamente a partir del micelio, eran rectos septados y ramificados en el ápice en forma de racimo de uvas. El micelio aéreo era algodonoso. Algunas colonias formaron microesclerocios cerca de la periferia de caja Petri después de 30 d de crecimiento. Los conidios midieron 9.1 μm de longitud y 5.5 μm de ancho con forma de ovoide y hialinos. Cuyas características se identifican como *Botrytis cinerea* de acuerdo con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) (Figuras 10, 11 y 12).

Estas características coinciden con las descritas por Polat *et al.* (2018), que estudiando cincuenta cepas de *Botrytis* sp. colectadas en plantas de pimiento de diferentes zonas de Turquía y comparadas con el aislamiento estándar B05.10 observaron que éstas presentaron micelio ramificado, septado, color hialino a marrón. Los conidióforos surgían directamente de los micelios o de los esclerocios, eran rectos, septados y a menudo ramificados en el ápice de forma dicotómica o tricotómica. Los conidióforos y conidios se observaron en forma de racimo de uva. La estructura de los conidios fue celularizada con forma de huevo hialino. Las condiciones en las que crecieron las colonias fueron en medio de cultivo PDA a 20 °C bajo luz. El micelio aéreo era algodonoso, polvoriento con patrón tanto compacto como radial. Las colonias se caracterizaron por un color blanco, blanco sucio, grisáceo o hialino, que se volvió gris claro o gris oscuro a marrón oscuro después de una semana, estas características determinaron que se trataba de *Botrytis cinerea*.

Apolonio *et al.* (2017) mencionan que cepas aisladas de *Botrytis* sp. en pimiento morrón cultivadas en medio avena agar (MCAvA) acidificado, con ácido láctico al 25 % (v/v), y pH 4.5 incubadas a 26 ± 2 °C durante 8 d, tuvieron un crecimiento micelial concéntrico, de consistencia afelpada y color blanco que siete días después, se tornó color gris. Observaron conidióforos largos, septados, pigmentados, con pared lisa, ramificados apicalmente y con racimo de conidios. Los conidios fueron unicelulares, ovoides, lisos, hialinos y de $8-15 \times 6-9$ μm correspondiendo todas las características al patógeno *Botrytis cinerea* de acuerdo con la descripción de Ellis (1971).

Plasencia *et al.* (2012), incubaron cepas de *Botrytis cinerea*, colectadas de frutos de fresa infectados, en medio de cultivo PDA a 18 °C durante 48 h, reportando micelio gris, con crecimiento al ras del medio de cultivo, presentando también esclerocios de forma irregular y de color negro en cultivos con un tiempo de dos semanas de desarrollo. La velocidad de crecimiento fue de 96 h de incubación para cubrir toda la placa Petri. El micelio presentó conidióforos altos, septados, hialinos y ramificados, sobre los cuales se desarrollaron los conidios con forma ovoide generalmente y agrupados con aspecto de racimo de uvas.

Ferrada *et al.* (2016) aislaron cepas de *Botrytis cinerea* de flores de ciruela japonesa en plena floración en Chile, y las incubaron a 20° C por 5 d en obscuridad en medio de cultivo PDA (2 %) y observaron micelio color blanco a gris, con micelios aéreos esponjosos, y creció a un ritmo de 27.4 ± 1.1 mm por día a 25 °C. La producción de esclerocios se observó de 5° a 20 °C. Los conidios eran en su mayoría ovoides, hialinos a ligeramente coloreados, lisos, con un hilio ligeramente protuberante, su longitud (media) fue de 9.6 ± 1.1 μm en un rango de 7.4-12.8 μm , mientras que su ancho (media) fue de 7.3 ± 0.7 μm en un rango de 5.2-10.0 μm con una relación longitud/anchura de, 1.3 a 0.003 μm .

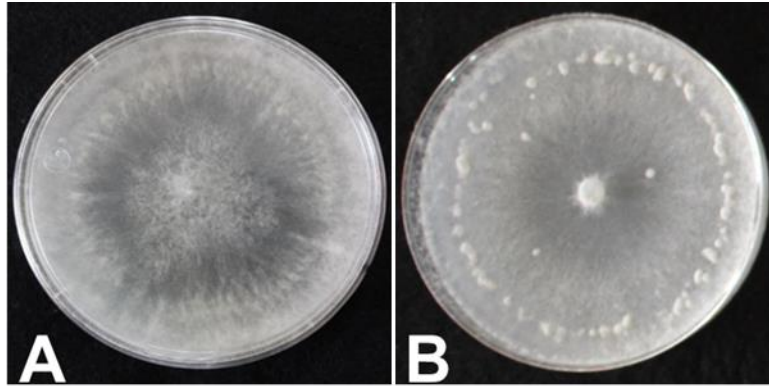


Figura 10. Cepa pura de 4 días de edad a partir del método punta de hifa (A) y crecimiento concéntrico de micelio que formó esclerocios negros (B).

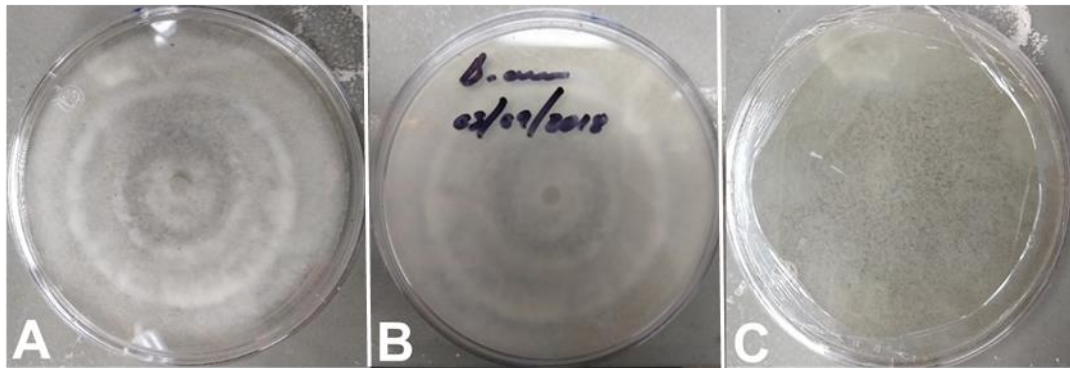


Figura 11. Colonia de 15 días de edad (A cara superior, B cara inferior) y C, colonia de más de un mes de edad.

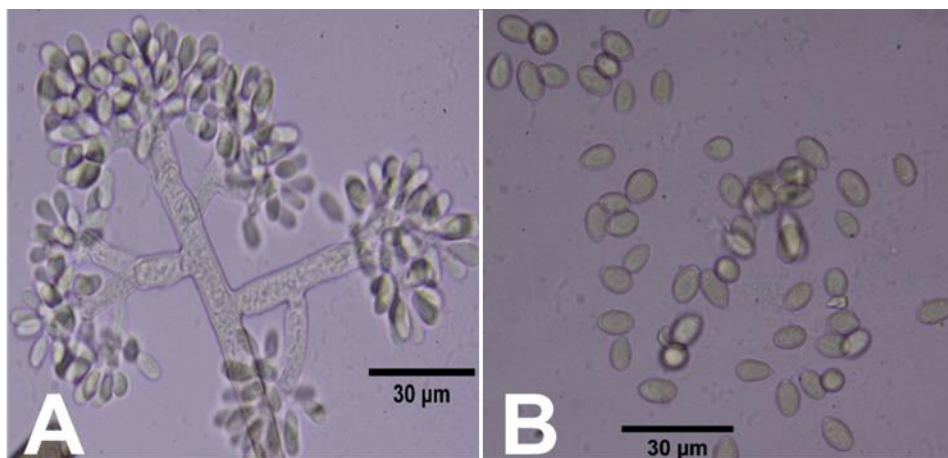


Figura 12. Conidióforo ramificado con conidios (A) y conidios con forma ovoide (B).

Identificación molecular

De acuerdo con las secuencias ITS obtenidas a partir de un aislamiento puro, y comparadas con otras secuencias de la base de datos en NCBI con el BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se identificó como *Botrytis cinerea*, con lo cual se obtuvo el número de acceso: MK064242.

Prueba de Patogenicidad (Postulados de Koch)

En la prueba de patogenicidad los síntomas se hicieron evidentes a los 6 días después de la inoculación, como manchas marrón, formación de micelio gris y conidióforos en los pétalos, síntomas característicos de *Botrytis cinerea*. Se obtuvo el aislamiento a partir de estos síntomas, por lo que consideró que la prueba de patogenicidad fue positiva para *Botrytis cinerea* en rosa.

FASE I

Aplicación de radiación UV-C *in vitro* sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*

De acuerdo con la Figura 13, la aplicación de radiación UV-C (254 nm) tuvo un efecto fungicida sobre el micelio, ya que, en todas las dosis aplicadas (1.0, 1.5, y 2 kJ m⁻²), no se observó crecimiento alguno hasta el cuarto día, en comparación, con el tratamiento testigo cuyo crecimiento del micelio fue de 24.3 mm por día, cubriendo la caja Petri en 96 h (4 d) (Figura 15 A). Hosen *et al.* (2010), observaron el crecimiento de 10 cepas de *Botrytis cinerea* aisladas en garbanzos en Bangladesh, en PDA con crecimiento promedio de 25.3 mm por día, similar al crecimiento observado en esta investigación. Las condiciones de crecimiento fueron de 23 ± 2 °C y pH del medio de 6.0. Hosen *et al.*, (2010), observaron que el pH del medio del cultivo es determinante en el crecimiento, siendo el pH óptimo 4.5, mientras que las cepas no crecieron a pH de = 6.5. La temperatura óptima de crecimiento de las

cepas evaluadas por esos autores, fue 20 °C, mientras que el crecimiento a 5 °C se redujo significativamente, mientras que a 35 °C se inhibió.

En todas las cajas que se sometieron a irradiación UV-C, independientemente de las dosis evaluadas, no se presentó crecimiento, aun 15 d después de cambiarlas a un medio nuevo de PDA (Figura 14 A y B), lo que demuestra su efecto sobre la división celular afectando su reproducción. De acuerdo con Gonzales *et al.* (2009) y Kielbassa *et al.* (1997) la radiación UV, al ser absorbida por los ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos (triptófano y la tirosina), NADH, y quinonas, entre otras moléculas cromóforas, desencadena una cascada de reacciones que daña a los organismos produciendo efectos citotóxicos y genotóxicos.

Por ejemplo, como respuesta a la radiación UV-C se generan especies reactivas al oxígeno (ROS) que pueden dañar las proteínas lípidos y carbohidratos de las células. También la producción de especies reactivas genera exceso de radicales libres, desencadenando el deterioro progresivo de las estructuras y funciones celulares, por lo que se inhibe el crecimiento micelial.

Akgün y Ünlütürk (2017) mencionan que el efecto germicida de la radiación UV-C (200-280 nm) se basa en la formación de dímeros que inhiben la transcripción y replicación de la célula, afectando la replicación y transcripción del ADN con la producción de dímeros de dipirimidina, hidratos de pirimidina o enlaces cruzados entre proteínas y ADN, lo cual afecta la capacidad de reproducción de los organismos, a pesar que esta puede repararse, por ejemplo, por la enzima fotoliasa entre otros mecanismos (Gonzales *et al.*, 2009 y Kielbassa *et al.*, 1997).

Darras *et al.* (2012), mencionan un retraso significativo ($P < 0.05$) del crecimiento radial del micelio de una cepa de *Botrytis cinerea* aislada de gerberas (*Gerbera jasmonii*), e irradiadas a dosis de 0.5, 1.0, 2.5 o 5.0 kJ m⁻² en medio PDA comparado con el testigo, que llenó la caja Petri a los 3 d.

Como se muestra en la Figura 15 B, en los tratamientos con irradiación (0.5, 1.5 y 2.0 kJ m⁻²) se observó que algunas cajas tuvieron crecimiento del micelio a partir de los 8 d después de la irradiación, en menos del 5% del total de las cajas,

posiblemente atribuido a un micelio aglomerado que protegió zonas profundas en las cuales parte del micelio sobrevivió así como una posible homogeneidad en la incidencia de la irradiación, además de una resistencia natural de la especie.

Bokhari *et al.* (2013), al evaluar el efecto de la aplicación de UV-C (254 nm) sobre el crecimiento del micelio de *Colletotrichum musaea* con tiempos de exposición de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 min, observaron que a partir de 45 min y hasta los 120 min, el crecimiento del micelio se inhibió por completo en comparación con la exposición a UV-A y UV-B donde las colonias sobrevivieron, mostrando que la luz UV-C tuvo mayor efecto fungicida desde los 45 min.

Por otro lado, Canale *et al.* (2011), observaron una reducción significativa en el crecimiento micelial de *Guignardia citricarpa* a dosis de 3.13 y 15.66 kJ m⁻². Sin embargo, ningún tratamiento logró inhibir por completo el crecimiento de las cepas después de tres días de incubación.

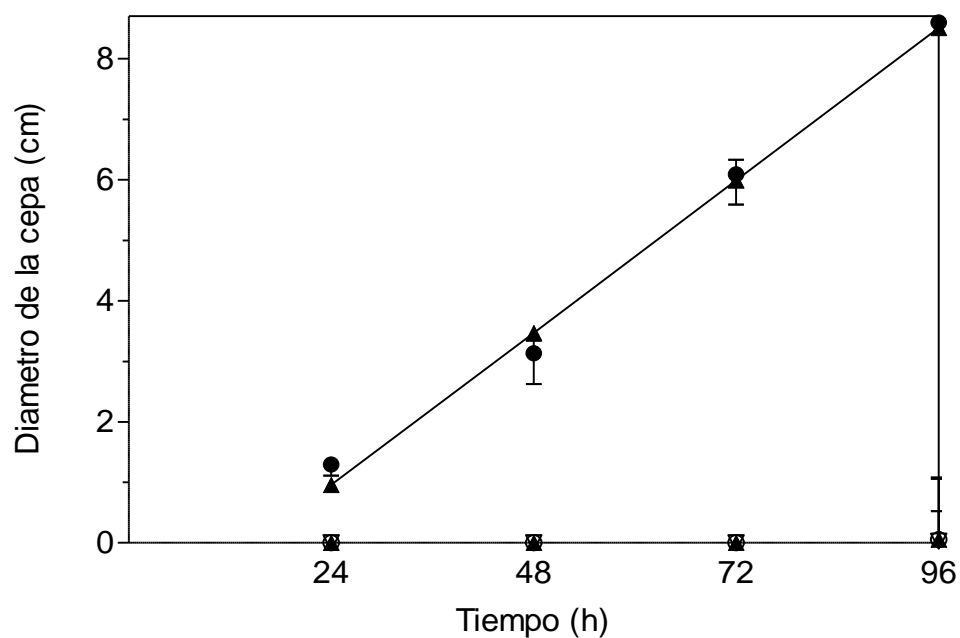


Figura 13. Diámetro de la cepa del micelio de *Botrytis cinerea* cultivado *in vitro*, después de irradiarlos con UV-C (254 nm) a las dosis de 0.0 kJ m⁻² (T0, ●), 1.0 kJ m⁻² (T1, ○), 1.5 kJ m⁻² (T2, ▲) y 2.0 kJ m⁻² (T3, ▽). La barra en cada punto

representa la desviación estándar. Modelo líneal para T0: $y = 0.1049x - 1.56$ ($n = 48$, $R^2 = 0.99$). “x” es el tiempo (h); “y” es el diámetro de la cepa (cm).

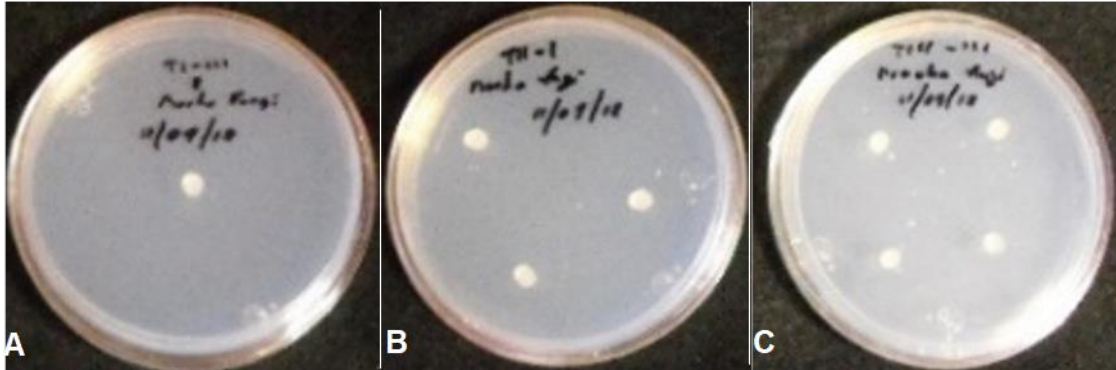


Figura 14. Prueba fungicida de discos de PDA con micelio de *Botrytis cinerea* irradiado A) $\sim 1.0 \text{ kJ m}^{-2}$, B) $\sim 1.5 \text{ kJ m}^{-2}$ y C) $\sim 2.0 \text{ kJ m}^{-2}$ y colocados en nuevo PDA.

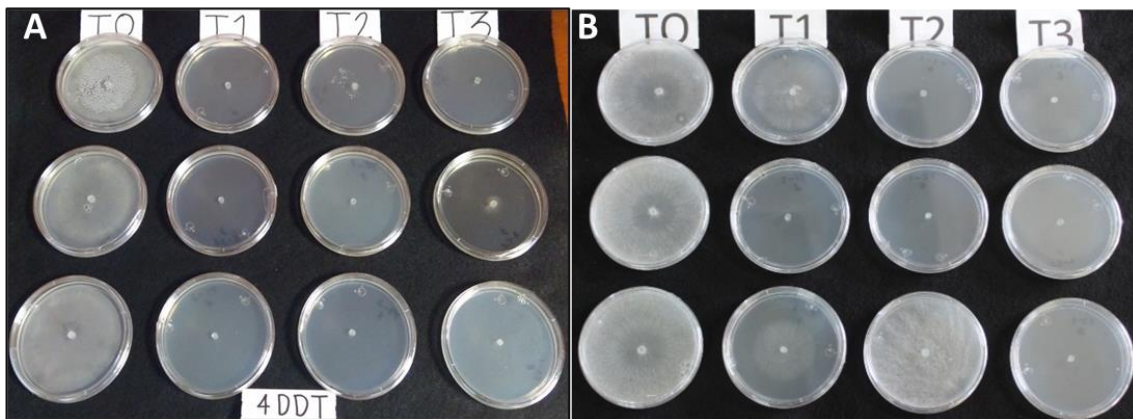


Figura 15. Crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* a: T0 = 0 kJ m^{-2} ; T1= $\sim 1.0 \text{ kJ m}^{-2}$; T2= $\sim 1.5 \text{ kJ m}^{-2}$ y T3= $\sim 2.0 \text{ kJ m}^{-2}$, A) Crecimiento de micelio a los 4 d después de irradiación, y B) Crecimiento del micelio a los 8 d.

Aplicación de radiación UV-C *in vitro* durante la germinación de *Botrytis cinerea*

El efecto de la radiación UV-C sobre la germinación de los conidios a las dosis indicadas, se inhibió el 94 % a una dosis de 1 kJ m⁻², 96 % a 1.5 kJ m⁻² y 98 % a 2.0 kJ m⁻² comparados con el testigo que mostró un porcentaje de germinación del 4 % después de 60 min, 30 % a los 90 min, 86 % a los 180 min, hasta los 270 min cuando logró el germinar el 99 % (Figura 16).

Veinticuatro horas mas tarde, se observaron los campos de visión con 100 conidios en cada tratamiento, en donde se encontró que los pocos conidios que lograron germinar se inhibieron por completo ya que no se observó crecimiento del tubo germinativo, en contraste con los conidios del tratamiento testigo que ya formaba micelio abundante (Figura 17). Darras *et al.* (2012), observaron que los porcentajes de germinación de conidios de *Botrytis cinerea* aislada de *Gerberas jasmonii*, se afectó significativamente ($P < 0.05$) cuando éstos fueron irradiados con UV-C a 0.5, 1.0, 2.5, o 5.0 kJ m⁻² comparado con los conidios no irradiados. El porcentaje de germinación conidial de los cultivos fue 10 veces menor a la dosis de 2.5 kJ m⁻² en comparación con el tratamiento no irradiado.

Marquenie *et al.* (2003), al evaluar pulsos de radiación UV-C en aumento, sobre conidios de *Botrytis cinerea*, observaron que tiempos menores a 40 s no produjeron inactivación. Sin embargo, el aumento de 40 y 100 s resultó en incremento de la inactivación en 2 unidades logarítmicas, y a más de 100 s, solo lograron pequeños cambios en la inactivación. Así mismo, Marquenie *et al.* (2002), observaron que la inactivación conidial de *Botrytis cinerea* aumentó de manera gradual al incrementar las dosis de UV-C de 0.01 a 1.5 kJ m⁻², inhibiendo por completo su sobrevivencia a la dosis de 1 kJ m⁻².

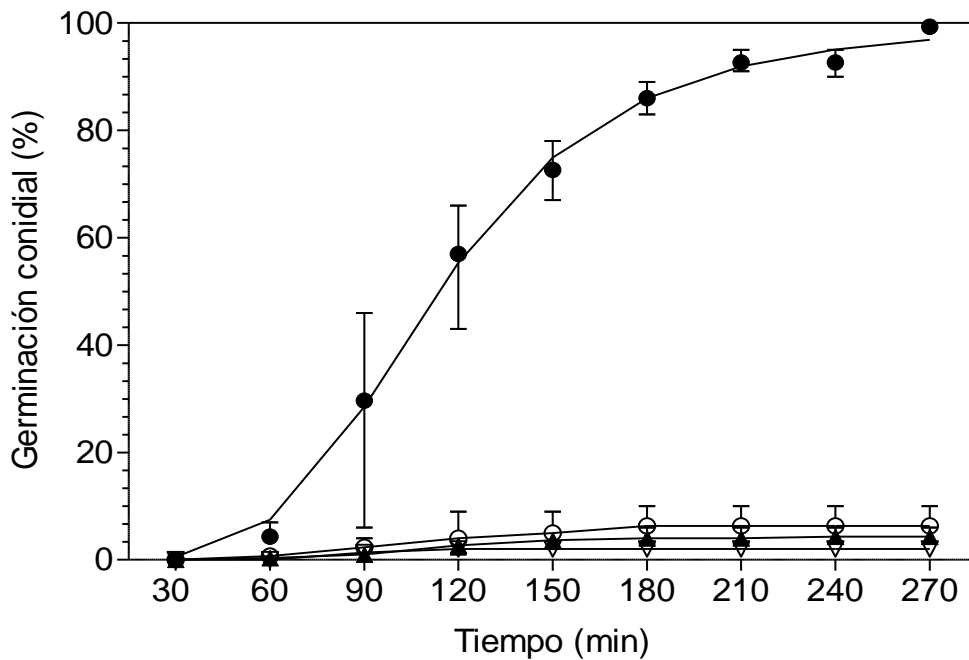


Figura 16. Porcentaje de germinación conidial de *Botrytis cinerea* cultivados *in vitro* (10^4 conidios / mL), después de irradiarlos con UV-C (254 nm) a las dosis de 0.0 kJ m^{-2} (T0, ●), 1.0 kJ m^{-2} (T1, ○), 1.5 kJ m^{-2} (T2, ▲) y 2.0 kJ m^{-2} (T3, ▽). La barra en cada punto representa la desviación estándar. Modelo de regresión (DR-Hill-Zerobackground) para T0: $y = 100.076 * x^{3.9437} / (113.660^{3.9437} + x^{3.9437})$ ($n = 300$, $R^2 = 0.96$). “x” es el tiempo (min); “y” es el porcentaje de conidios germinados.

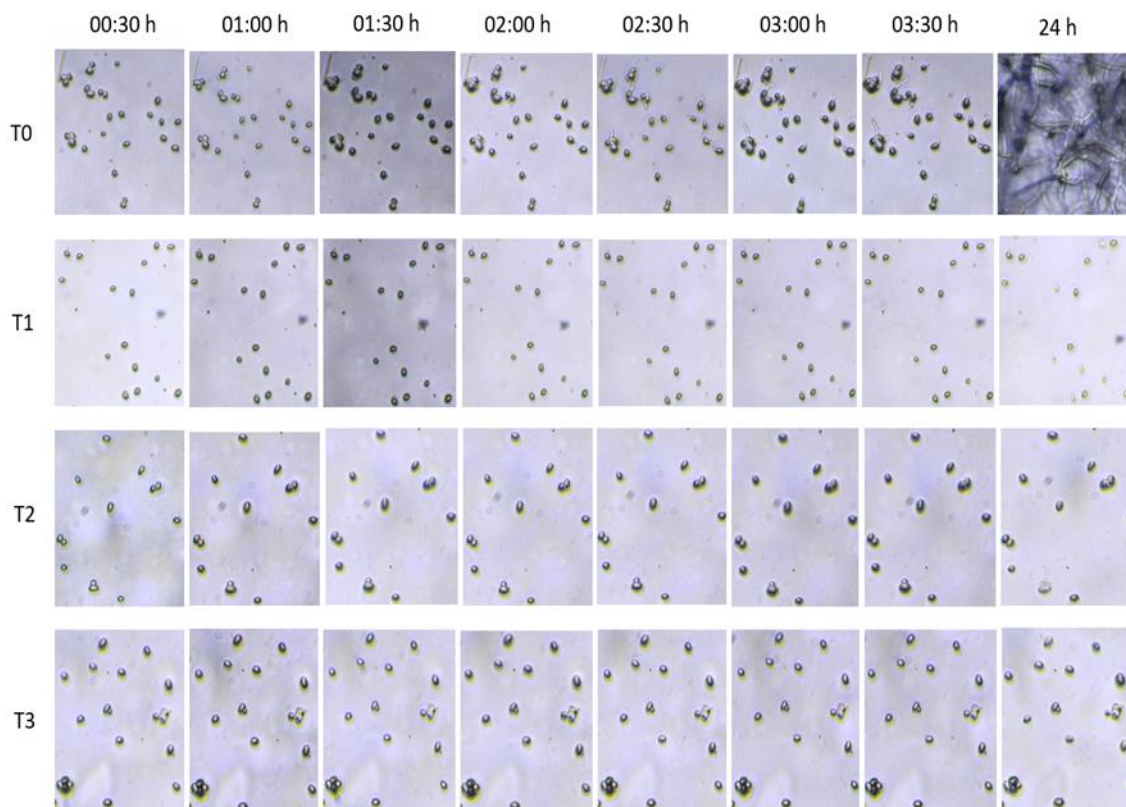


Figura 17. Germinación de conidios *B. cinerea*, con diferentes tiempos y dosis de irradiación de luz UV-C (T0 = 0 kJ m⁻²; T1= ~ 1.0 kJ m⁻²; T2= ~1.5 kJ m⁻² y T3= ~ 2.0 kJ m⁻²).

FASE II

Inoculación de flores de rosa con suspensión de *Botrytis cinerea* irradiada

El efecto de la luz UV-C sobre los conidios y posteriormente asperjados en los cultivares *in vivo* de “Polar Star”, mostró un retraso en el grado de infección en el tallos floral. En el tratamiento inoculado con conidios viables, alcanzó un grado de severidad de 2 al cuarto día, mientras que los tallos inoculados con conidios irradiados a 2 kJ m² el mismo daño se presentó al día 7 de vida de florero, un día menos que los tallos sin inocular (Figura 18).

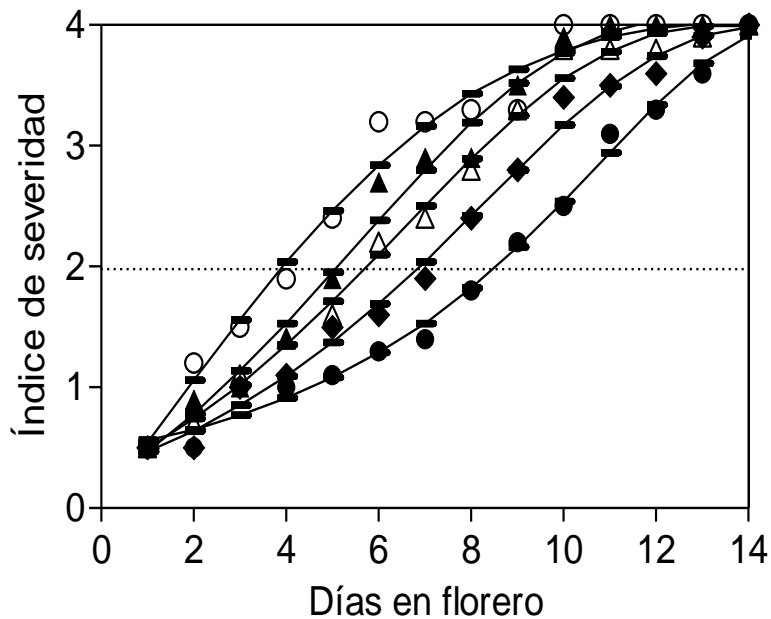


Figura 18. Índice de severidad del daño en flores de “Polar Star” después de inocularlas con 10^4 conidios mL^{-1} de *Botrytis cinerea* irradiados con UV-C a las dosis de 0.0 kJ m^{-2} (T02, ○), 1.0 kJ m^{-2} (T1, ▲), 1.5 kJ m^{-2} (T2, △) y 2.0 kJ m^{-2} (T3, ◆). El tratamiento T01 (●) representa el testigo relativo (severidad del daño natural causado por las esporas de *Botrytis cinerea* en el invernadero). Modelo racional para T01, T02, T1, T2 y T3: $y = (a+b*x) / (1 + c*x + d*x^2)$ ($n = 10$). “x” es el tiempo en florero (d); “y” es el índice de severidad de acuerdo con la escala de severidad descrita.

Al día siguiente de la aplicación de los conidios sobre los tallos florales del cultivar “Proud”, se observó grado 1 de severidad hasta el segundo día con excepción del tratamiento T1, que alcanzó más del 1 de severidad al segundo día, del tercer al quinto día la mayoría de los tratamientos permanecieron por debajo de 1, excepto T1 y el testigo T02 (conidios viables). Posteriormente este comportamiento permanece por debajo del índice 2 para estos tratamientos hasta el onceavo día, mientras que T1 y T02 aumenta hasta el índice 3, alcanzando estos últimos la categoría 4 a los 15 días (Figura 19). Los botones florales de “Polar Star”

presentaron una mayor severidad en menor tiempo en comparación con “Proud”. Todos los tratamientos en “Polar Star” alcanzaron finalmente la categoría 4 mientras que “Proud” se mantuvo por debajo del índice 3, con excepción, del tratamiento T1 y testigo T02. En general se observa que el cultivar Proud mostró mayor resistencia a la infección.

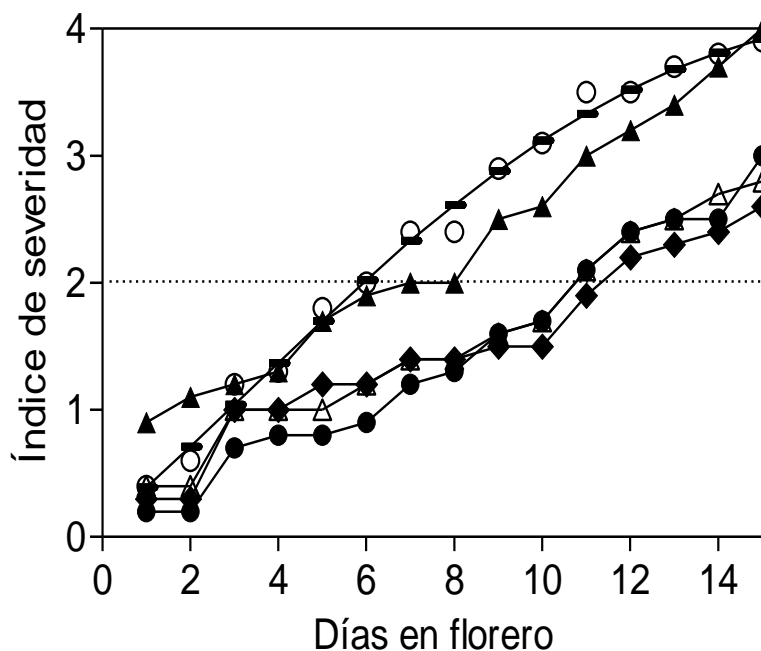


Figura 19. Índice de severidad del daño en flores de “Proud” después de inocularlas con 10^4 conidios mL^{-1} de *Botrytis cinerea* irradiados con UV-C a las dosis de 0.0 kJ m^{-2} (T02, ○), 1.0 kJ m^{-2} (T1, ▲), 1.5 kJ m^{-2} (T2, △) y 2.0 kJ m^{-2} (T3, ◆). T01 (●) representa el testigo relativo (severidad del daño natural causado por las esporas de *Botrytis cinerea* en el invernadero). Modelo racional para T02: $y = (0.07808 + 0.3031 * x) / (1 + (-0.02545 * x + 0.002494 * x^2))$ ($n = 10$, $R^2 = 0.87$). “x” es el tiempo en florero (d); “y” es el índice de severidad de acuerdo con la escala de severidad descrita.

Darras *et al.* (2012) evaluaron el desarrollo de la lesión de *Botrytis cinerea* aplicada sobre los flósculos de flores de gerbera (*Gerbera jamesonii*) cvs. Helado y Ecco midiendo los diámetros de las lesiones, y observaron que, después de inocular con *B. cinerea* ($10 \mu\text{L}$; 10^6 conidios por mL) previamente irradiados (dosis de 0.5 y 5.0

kJ m⁻²) en el cv Helado redujo en un 55 % y 48 % el diámetro de las lesiones, en comparación con los flósculos inoculados con suspensiones de colonias no irradiadas, mientras que en el cultivar Ecco, se redujeron hasta en un 70 %, lo que muestra las diferencias en susceptibilidad entre cultivares.

De manera natural los tallos de rosa tienen una vida de florero de más de 10 días a pesar de estar infectados, los tallos de “Proud” mostraron 99 % de las flores turgentes durante el periodo de evaluación mientras que “Polar Star” el 95 % a los 10 días, siendo los tratamientos más afectados el T02, T1 y T2 a partir del onceavo día mientras que los tallos de T3 permanecieron turgentes. Después de 15 días, las flores se marchitaron o el pedúnculo se rompió de forma drástica con excepción de T01 en “Proud” mientras que en “Polar Star” T01 ya tenía categoría 4 de severidad entre los 12 y 14 días de vida de florero.

FASE III

Irradiación con UV-C de flores de rosa e inoculadas con *Botrytis cinerea*

En esta fase del experimento, tallos florales de rosa de ambos cultivares se irradiaron y posteriormente se inocularon con conidios viables a la misma concentración de 1×10^4 conidios por mL. Los tallos florales de “Polar Star” se cosecharon (día uno), se irradiaron al segundo día y al tercer día se inocularon. Se observó que al día siguiente de la inoculación, la mayoría de los tratamientos alcanzaron la categoría 1 con excepción del testigo T01. Al segundo día de inoculación o quinto día después de cosecha, la mayoría de los tratamientos alcanzaron el índice 2. Al quinto día después de la inoculación la mayoría de los tratamientos han alcanzado la categoría 4, mientras que el tratamiento T1 tuvo un índice de severidad de 3 (Figura 22).

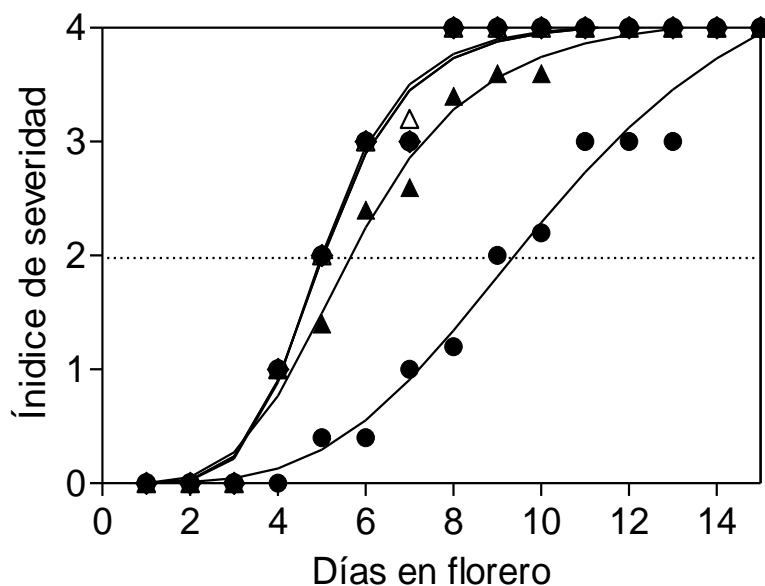


Figura 20. Índice de severidad del daño en flores de “Polar Star” irradiadas con UV-C a las dosis de 0.0 kJ m⁻² (T02, ○), 1.0 kJ m⁻² (T1, ▲), 1.5 kJ m⁻² (T2, △) y 2.0 kJ m⁻² (T3, ◆), posteriormente inoculadas con 10⁴ conidios / mL de *Botrytis cinerea*. T01 (●) representa el testigo relativo (severidad del daño natural causado por las esporas de *Botrytis cinerea* en el invernadero). Modelo de regresión (DR-Hill-Zerobackground) para T01, T02, T1, T2 y T3: $y = \theta \cdot x^\eta / (\kappa^\eta + x^\eta)$ (n = 10). “x” es el tiempo en florero (d); “y” es el índice de severidad de acuerdo con la escala de severidad descrita.

Para “Proud” los tallos se mantuvieron por 2 días la categoría 1 de severidad después de la inoculación, con excepción del testigo T01, con nivel 0 de severidad hasta el día 9 de vida de florero (Figura 21, 22). Los tallos de “Proud” mostraron mayor resistencia al ataque de *Botrytis cinerea* que los de “Polar Star”.

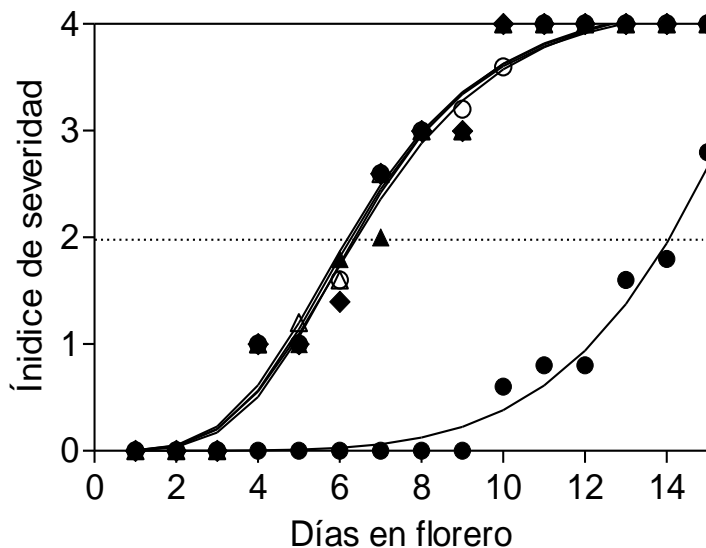


Figura 21. Índice de severidad del daño en flores de “Proud” irradiadas con UV-C a las dosis de 0.0 kJ m⁻² (T02,○), 1.0 kJ m⁻² (T1,▲), 1.5 kJ m⁻² (T2,△) y 2.0 kJ m⁻² (T3, ◆), posteriormente inoculadas con 10⁴ conidios mL⁻¹ de *Botrytis cinerea*. T01 (●) representa el testigo relativo (severidad del daño natural causado por las esporas de *Botrytis cinerea* en el invernadero). Modelo de regresión (DR-Hill-Zerobackground) para T01, T02, T1, T2 y T3: $y = \theta \cdot x^\eta / (\kappa^\eta + x^\eta)$ (n = 10). “x” es el tiempo en florero (d); “y” es el índice de severidad de acuerdo con la escala de severidad descrita.

Urban *et al.* (2016), mencionan que a altas dosis de irradiación de luz UV-C pueden afectar las células de los tejidos vegetales a nivel de los cloroplastos y mitocondrias y de manera general las membranas. Por ejemplo, dosis excesivas de luz UV-C destruye directamente las plastoquinonas en los cloroplastos además de dañar la integridad de los tilacoides y la membrana lamelar afectando gravemente el transporte de electrones durante la fotosíntesis, debido al daño en la membrana y la producción asociada de ROS y radicales peroxilo, ROO[•]. Debido a esto los tejidos vegetales quedan expuestos a la infección del patógeno. Sin embargo, al irradiar a ciertas dosis sobre las plantas, se produce un estrés oxidativo y de señalización que

ayuda, a la producción de metabolitos secundarios que defienden a la planta de los patógenos.

En la evaluación de vida en florero, el número de flores turgentes no fue afectado durante el periodo de evaluación. Menos del 5 % presentaron ruptura o doblez del pedúnculo floral independientemente del valor en el índice de severidad de daño, ya que aun con categorías altas (2, 3 o 4), los tallos florales estaban turgentes y erectos. Sin embargo, la vida de florero de algunos tallos florales de “Polar Star” en la categoría 4 fue afectada severamente en contraste con lo observado en tallos florales de “Proud”. Se observó que solo el 20 % de los tallos de “Polar Star” en T2 quedaron turgentes a los 10 d de vida de florero. Solo uno o dos tallos florales en T02 y T1 a los 12 d estaban turgentes (20 %), mientras que en T3, el 100 % de los tallos florales estaban turgentes pero bajo la categoría 4, mientras que los tallos florales a los 14 d en T1 permanecían turgentes aunque presentaban la categoría 4 de severidad.

En el cultivar “Proud”, solo 20 % de los tallos florales en T01 presentaban la categoría 4 de severidad a los 15 d de evaluación. En comparación con T01, los tallos florales más dañados y con menor vida de florero (hasta solo por 4 d) con 50 % de tallos florales no turgentes fueron: T02 y los irradiados T1 y T2. Los tallos florales a los 10 d de florero en T3 presentaban la categoría 4 de severidad aunque el 80 % de los tallos florales estaban turgentes. Se debe notar que la vida de florero fue mayor en los tallos florales cosechados que no fueron irradiados con UV-C e inmediatamente colocados en agua destilada e inoculados, que en los tallos cosechados colocados en agua destilada, al segundo día irradiados y al tercer día inoculados.

Darras *et al.* (2011) observaron un efecto positivo sobre la vida en florero de flores de *Gerbera jamesonii* al irradiarlas con 1.0 kJ m⁻² en “Ice cream” y 10 kJ m⁻² para “Ecco” promoviendo mayor vida en florero de manera significativa (P <0.05) en 1.8 y 2.4 días respectivamente, más que los tallos testigo. También el rompimiento de los tallos se retrasó al irradiar los cultivares a 1.0 o 10 kJ m⁻² en 3.3 y 1.3 d respectivamente, reduciéndose en un 43 % en “Ice cream” a 1.0 kJ m⁻² y 29 % para

“Ecco” a dosis de 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 kJ m⁻², mientras que los tallos testigos ruptura a los 13 y 11.7 d respectivamente.

Sgroppo y Sosa (2009) lograron extender la vida en almacenamiento de *Cucurbita moschata* D, “Zapallo” hasta por 14 d asegurando su calidad sensorial al irradiar el fruto a 0, 2.08 y 3.14 kJ m⁻² y posteriormente almacenarlos a 5 °C, en comparación, con el testigo que perdió la calidad a los 10 d.

También Andrade *et al.* (2010) lograron aumentar la vida de carambola (*Averrhoa carambola* L.) mínimamente procesada en rebanadas hasta por 21d a dosis de 13.0 kJ m⁻² almacenada a 5 °C, en comparación con el testigo que presentó daños severos a partir de los 7 d. Además, el contenido de los compuestos fenólicos en el tratamiento testigo fue menor (1.4 mg g⁻¹ tejido) en comparación con los frutos irradiados (1.9 mg g⁻¹ hasta 2.6 mg g⁻¹) a los 21 d.

Janisiewicz *et al.* (2016), lograron extender la vida útil de *Fragaria* spp. cvs. Albion y Monterey, inoculados con *B. cinerea* y posteriormente irradiados por 60 s seguido de 4 h en oscuridad, hasta por 7 d con 0 % de daño de manera significativa (P <0.05), mientras que el control ya presentaba más del 25 % de daño a los 3 d.

En contraste con Darras *et al.* (2009) al irradiar inflorescencias de *Freesia x hybrida* Baile, ‘Cote d’ Azur’, a dosis de 0.5 1 o 2.5 kJ m⁻² la vida de florero se mantuvo aproximadamente igual que las no irradiadas. Mientras que dosis de 5 kJ m⁻² la vida en florero se redujo significativamente (P <0.05) en comparación con las no irradiadas y las expuestas a 0.5 y 1 kJ m⁻², sin embargo, la irradiación a 2.5 y 5 kJ m⁻² provocó síntomas de fitotoxicidad después de 3 d de incubación.

Nigro *et al.* (1998), observaron que al irradiar con UV-C las bayas de *Vitis viinifera* L. “Italia”, a una dosis de 1 kJ m⁻², éstas sufrieron daños al presentar una coloración marrón y formando manchas de margen irregular principalmente junto al pedicelo. Esto dio como resultado una mayor severidad al inocular las bayas con *B. cinerea* apareciendo los síntomas de 3 a 4 y de 7 a 10 d después del tratamiento con radiación UV-C almacenándolas a 21 °C y 3 °C respectivamente.

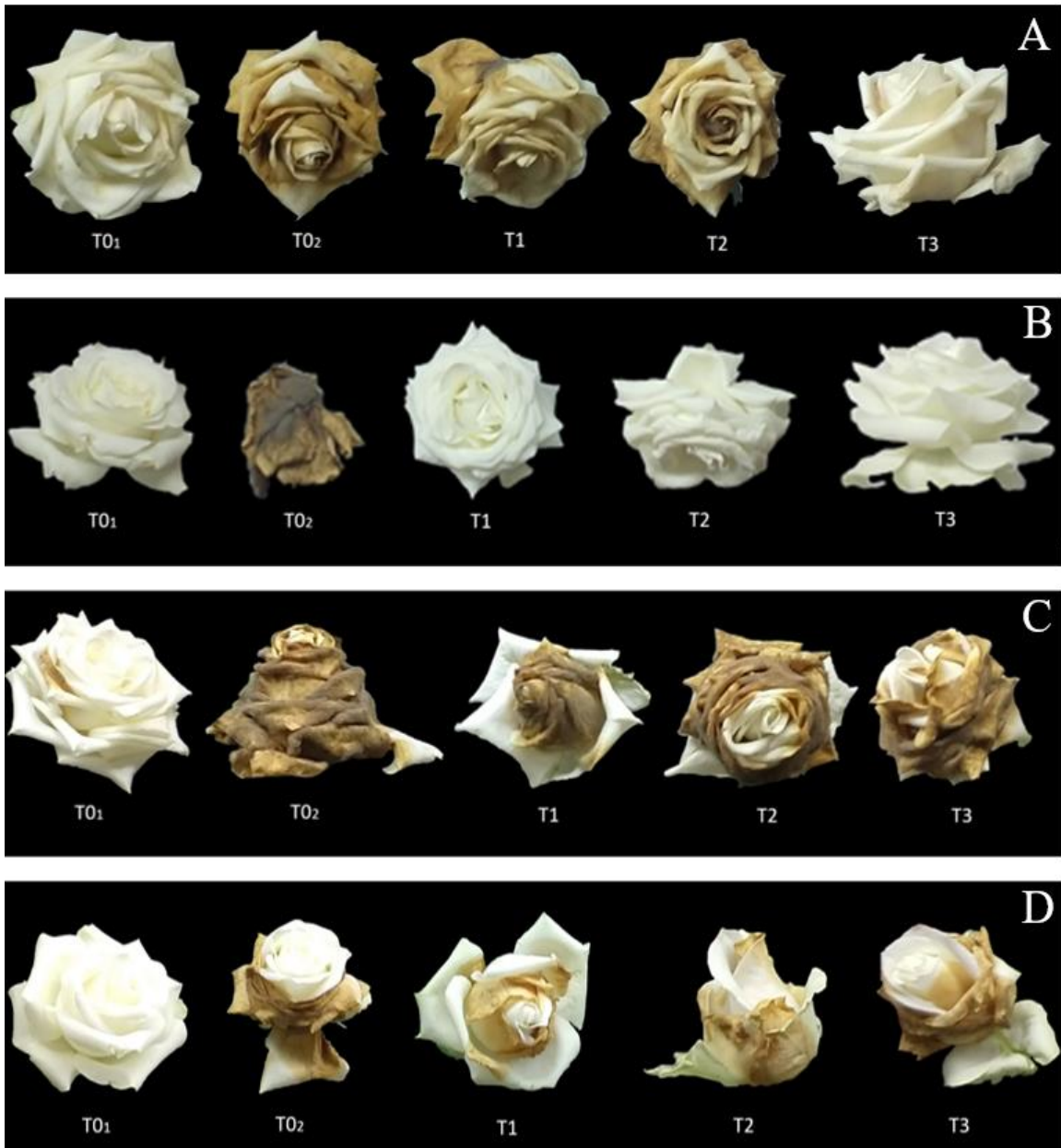


Figura 22. Grado de severidad en botones florales de rosa “Polar Star” (A) y “Proud” (B) 8 d después de la inoculación con conidios *B. cinerea* irradiados a diferentes dosis. Y grado de severidad de botones florales irradiados de “Polar Star” (C) y “Proud” (D) y posteriormente inoculados con conidios viables de *B. cinerea*, 8 d después de tratamiento.

Efecto del tiempo de irradiación de los tallos de rosa y su respuesta a la infección con *Botrytis cinerea*

Después de irradiar los tallos de “Polar star” (Figura 23), con 1.0 kJ m^{-2} e inoculados, se observó que al segundo día no mostraron ningún síntoma, sin embargo, al tercer día la mayoría había alcanzado el nivel 1.0 de severidad manteniéndose hasta el cuarto día. Al quinto día los tallos alcanzaron el nivel 2 de severidad y a partir de este día hasta el séptimo, siendo el más afectado el tratamiento T3. La velocidad de severidad fue más lenta en comparación con las pruebas anteriores. Cabe mencionar que pasado los tiempos de evaluación en todos los experimentos, la enfermedad sigue progresivamente afectando los tejidos vegetales necrosando todos los pétalos de la flor para ambos cultivares.

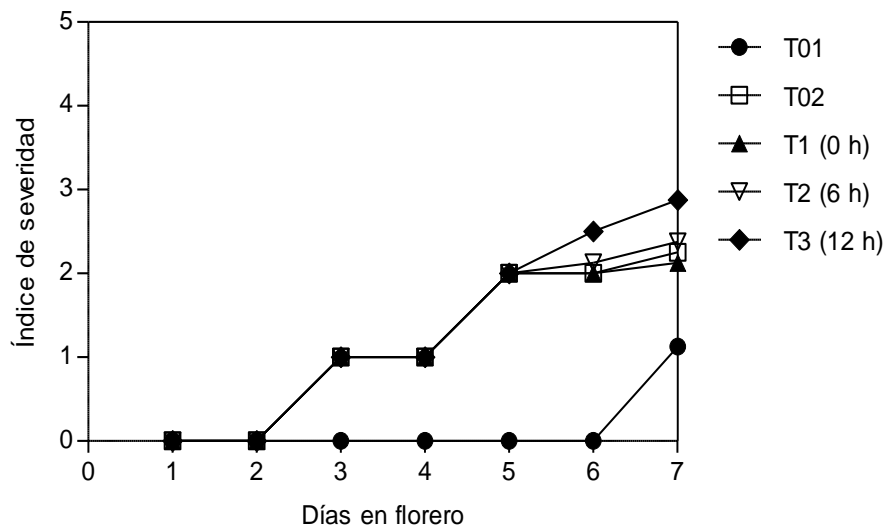


Figura 23. Índice de severidad del daño en flores de “Proud” irradiadas con UV-C a $\sim 1 \text{ kJ m}^{-2}$ y posteriormente inoculadas con conidios viables de *Botrytis cinerea* 0, 6 y 12 horas después de la irradiación. T01 es el testigo relativo y T02 el testigo absoluto.

Darras *et al.*, (2009) mencionan que la aplicación de radiación UV-C (0.5, 1, 2.5 o 5 kJ m^{-2}) seguida de la inoculación con *B. cinerea* (10^4 conidios mL^{-1}), redujo la severidad de la infección comparada con la irradiación antes de la inoculación en inflorescencias de *Freesia hybrida* L. La irradiación después de la inoculación, la gravedad de la infección y el número de lesiones en las inflorescencias se redujeron en un 44, 70, 74, and 59 % en comparación con la irradiación antes de la inoculación por 37, 62, 68, and 60 % respectivamente. Sin embargo, en algunos casos al irradiar las inflorescencias de freesia con 0.5 o 1 kJ m^{-2} de UV-C antes de la inoculación con *Botrytis*, se observó menor número de lesiones significativamente ($P < 0.05$) en comparación con el tratamiento testigo. Así mismo observaron que inocular *Botrytis* después de irradiar UV-C a las dosis de 2.5 y 5 kJ m^{-2} , la severidad del daño fue mayor en comparación con los testigos, probablemente debido a que las células de los pétalos se dañaron a estas dosis.

Por otra parte Darras *et al.* (2012) probaron diferentes dosis de 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 kJ m^{-2} de UV-C sobre flores de gerbera y posteriormente inoculadas con *B. cinerea* a dosis de 5×10^6 conidios mL^{-1} , y observaron que las lesiones fueron menores en 40, 42, 27 y 34 %, respectivamente para cada dosis.

Darras *et al.* (2014), en plantas de *Pelargonium x hortorum* en los cultivares “Victory” y “Glacis”, justifica el uso de la luz UV-C para el control del patógeno *B. cinerea* al reducir significativamente ($P < 0.05$) los diámetros de las lesiones en ambos cultivares, a las dosis de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 or 10.0 kJ m^{-2} , en donde “Victory” respondió mejor a las dosis, las lesiones en las hojas se redujeron en un 50 %, mientras que para “Glacis” la reducción fue del 38 %.

Latorre *et al.* (2012) muestran la efectividad de la luz UV-C en patógenos como: *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum* y *Pestalotiopsis clavispora*, en arándano (*Vaccinium corymbosum*), las dosis evaluadas fueron 0.0, 40, 80 y 110 mJ cm^{-2} , los resultados mostraron cierta resistencia de los patógenos. *C. cladosporioides* y *C. herbarum* pues tuvieron 78 % y 80 % de supervivencia entre dosis de 40 y 110 mJ cm^{-2} para ambos patógenos, mientras que en *B. cinerea*, fue del 19 % logrando una inhibición completa a dosis de 80 y 110 mJ cm^{-2} , mientras

que para *P. clavispora* fue del 34 %. La resistencia de *Cladosporium* spp. a la radiación UV-C se atribuye a que sus conidios tienen naturalmente coloración oscura debido a los altos contenidos de melanina, la cual absorbe la radiación UV y protege a los conidios, mientras que *B. cinerea* presenta conidios hialinos y no melanizados lo cual los hace susceptibles a la irradiación con UV-C.

Cuantificación de fenoles

Las plantas de manera natural producen metabolitos secundarios para defenderse del ataque de microorganismos como *Botrytis cinerea*, lo cual se observó entre los cultivares, mostrando diferencias significativas en el contenido de fenoles totales (“Polar star” = 10.905 mg g⁻¹ y “Proud” = 8.058 mg g⁻¹). Sin embargo, a pesar de que las flores de “Polar star” tienen mayor contenido de fenoles son más susceptibles al ataque de *Botrytis cinerea*. Además puede observarse que la irradiación con UV-C estimuló un incremento en el contenido de compuestos fenólicos en los pétalos de “Polar Star”, 0, 6 y 12 horas después de la irradiación con UV-C, con un incremento del 16.9 % (Figura 24).

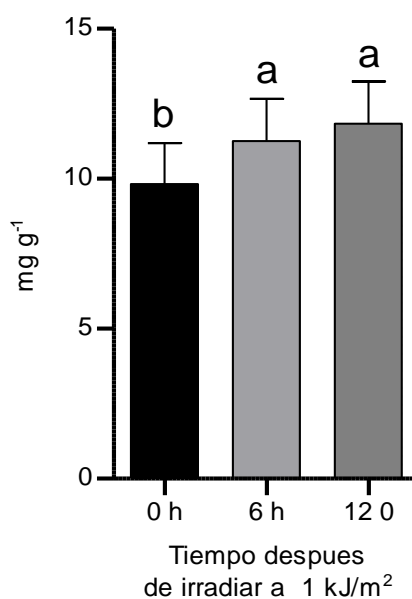


Figura 24. Contenido de fenoles totales (mg g^{-1}) en pétalos de “Polar Star” después de 0, 6 y 12 h de irradiar las flores con luz UV-C a 1 kJ m^{-2} .

Por lo tanto, se puede apreciar que el contenido de compuestos fenólicos no fueron un factor determinante en incrementar la resistencia del tejido vegetal y reducir la infección de *Botrytis cinerea*, puesto que los tallos de “Polar Star” siempre presentaron un mayor índice de severidad de daño con relación a “Proud” (Figura 22).

Urban *et al.* (2016) mencionan los efectos benéficos de irradiar ciertas dosis de UV-C en diferentes órganos vegetales, como por ejemplo la producción de compuestos fenólicos por la inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonialiasa (PAL) a nivel postranscripcional, lo cual protege a la planta de la radiación UV, y además provee de propiedades antioxidantes. Este estrés abiótico provocado en las plantas estimula la producción de ROS quienes también participan en las defensas de las plantas contra las plagas y enfermedades debido a que se acumulan en el sitio de ataque del patógeno, y son compuestos tóxicos para el patógeno, como las fitoalexinas, pudiendo activar otras vías de señalización responsables de la activación de otros mecanismos de defensa.

Darras *et al.*, (2012), probaron la irradiación de flores de *Gerbera jamesonii* “Ice cream” y “Ecco” a dosis de 0.5, 1.0, 2.5 or 5.0 kJ m^{-2} , y observaron que el contenido de los fenoles totales del tratamiento testigo en “Ice cream” fue de 530 g kg^{-1} durante 48 h hora en almacenamiento a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que el tratamiento con 0.5 kJ m^{-2} indujo un ligero aumento a las 48 h. Sin embargo, en las flores no irradiadas de “Ecco”, los fenoles totales disminuyeron de manera rápida de $1,050$ a 700 g kg^{-1} durante las primeras 12 h, posteriormente se estabilizaron. Además la irradiación aumentó la actividad de la enzima polifenol oxidasa en todos los tratamientos en comparación con las flores no irradiadas, con 188 Unidades g^{-1} pf aproximadamente para el cultivar Ice cream y 265 Unidades g^{-1} pf para “Ecco” a las 48 h, mientras que los testigos fueron de 232 y 240 Unidades g^{-1} pf respectivamente.

Andrade *et al.* (2010) observaron que al irradiar frutos de *Averrhoa carambola* L. en rebanadas a la dosis de 13 kJ m^{-2} , el desarrollo de microorganismos fúngicos se presentó a los 21 d de almacenamiento a $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que en los frutos del tratamiento testigo se observó a los 14 d. Además, el contenido de fenoles totales (FT) aumentó gradualmente a partir de séptimo día hasta el día 21 de almacenamiento de 1.9 mg g^{-1} a 2.7 mg g^{-1} , respectivamente, a diferencia de lo que se observó en el tratamiento testigo con el cual se mantuvo constante y en menor concentración (menos de 1.5 mg g^{-1}) el contenido de FT de los frutos. Además, se indujo la actividad del sistema enzimático antioxidante al evaluar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la peroxidasa (POX).

Sgroppo y Sosa (2009) reportan que la aplicación de luz UV-C sobre trozos de *Cucurbita moschata* irradiados a 2.08 y 3.14 kJ m^{-2} no produjo variabilidad alguna en el contenido de carotenoides totales con rangos entre 31.57 ± 7.65 a $51.61 \pm 0.35 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno g}^{-1}$ pf, en los frutos irradiados y testigo. Además con base al recuento inicial de hongos y levaduras de $2.68 \text{ log UFC g}^{-1}$, los trozos irradiados a 3.14 kJ m^{-2} mostraron una reducción de más de 1 log UFC g^{-1} , mientras dosis de 2.04 kJ m^{-2} sólo redujeron el 10 % de la población microbiana inicial ($2.59 \text{ log UFC g}^{-1}$). Estos ejemplos muestran que la radiación UV-C (254 nm) afecta diferentes procesos fisiológicos en los tejidos vegetales que a dosis adecuadas pueden inducir tolerancia al ataque de diferentes patógenos a través del estímulo de biosíntesis de compuestos fenólicos, tóxicos para los patógenos (González *et al.*, 2005). Los metabolitos secundarios fenólicos son formados a partir del ácido shiquímico y el ácido malónico derivados del metabolismo primario, su estructura se basa en un anillo aromático unido en al menos un grupo oxhidrilo formando por ejemplo el ácido benzoico o de manera más compleja el ácido cumárico, los cuales tienen propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

Pataro *et al.* (2015), al evaluar la aplicación de luz UV-C a 2 y 4 J cm^{-2} (1 y 2 h), sobre tomates verdes cosechados y posteriormente almacenados por 0, 7, 14 y 21 d a $20 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, observaron que la cantidad de fenoles totales mostró una tendencia creciente para todos los tratamientos con valores iniciales de $266.3 \pm 37.5 \text{ mg GAE}$

/ kg pf, con incrementos hasta 408 mg GAE / kg pf en el tejido tratado con UV-C a 2 J cm^{-2} , 1.3 veces mayor que el control. Los autores concluyeron que la irradiación favoreció la acumulación de compuestos fenólicos. Estos ejemplos muestran que el estímulo que puede dar la luz UV-C en la producción de compuestos de defensa puede tomar un periodo de tiempo considerable, sin embargo, en el caso de las flores la germinación de los conidios toma minutos, y debido a que no tienen estructuras de defensa, como los frutos, la infección se propaga rápidamente.

Análisis histológico de los pétalos de ambos cultivares

La infección del patógeno sobre el tejido vegetal depende de muchos factores ambientales, metabólicos, genéticos y físicos naturales durante la relación patógeno-hospedante, entre las cuales, la epidermis adaxial y abaxial como barreras físicas protegen al tejido del ataque de patógenos (Holz *et al.*, 2007). Al medir la longitud de cortes transversales (Figura 25) se observó un grosor total del pétalo semejante en ambos cultivares sin diferencias significativas.

El espesor del parénquima también fue similar, observando más espacios de aire en los pétalos de “Polar Star” que en los de “Proud”. Sin embargo, al analizar los grosores de la epidermis adaxial y abaxial, se observaron diferencias significativas, ya que el cv Proud generalmente fue de mayor grosor, con una epidermis adaxial con numerosas papilas en forma de cono alargadas de diferentes formas, mientras que en los pétalos de “Polar Star” se observó una epidermis adaxial plana (Cuadro 1; Figura 25).

De acuerdo con Zuraw *et al.* (2015), el grosor de los pétalos de las especies de rosa *R. canina* L., *R. gallica* L., *R. rugosa* Thunb., and *R. x damascena* Mill varió de 120 a 374 μm . Los pétalos de *R. x damascena* fueron más gruesos mientras que las papilas más grandes se observaron en *R. gallica* con 28 μm de altura. Las papilas están comprendidas en la epidermis adaxial del pétalo, capa que es normalmente más delgada que la epidermis abaxial, y pueden presentar diferentes tamaños y producir compuestos volátiles.

Feng *et al.* (2008), reportan que los pétalos *Red rosea* tienen una longitud de la papila de 7 μm , esta superficie es super hidrofóbica con una gran fuerza adhesiva al agua, que muestra un inusual estado de impregnación, debido a que poseen micro y nanoestructuras jerárquicas que le proporcionan cierta rugosidad y gran fuerza adhesiva con el agua. Una gota de agua en la superficie de estos pétalos es de forma esférica, que no puede rodar incluso cuando el pétalo se da vuelta.

Bergougnoux *et al.*, (2007), menciona que las células de ambas capas epidérmicas de pétalos de rosa tienen morfologías distintas; con forma cónica papilada en la epidermis adaxial, y en contraste con la epidermis abaxial la cual tiene una cutícula altamente estriada. Cuando la flor aún estaba en botón, se observó que las células epidérmicas eran más o menos rectangulares, la parte central del pétalo estaba comprendido por un parénquima esponjoso, formado por células unidas holgadamente con grandes espacios intercelulares. Las células de la epidermis abaxial generalmente son más grandes y rodeadas por una pared celular y una cutícula más gruesa que las células de la epidermis adaxial.

Cuadro 1. Características histológicas de dos cultivares de rosa

| Cultivar | Grosor pétalo (μm) | Grosor parénquima (μm) | Epidermis abaxial (μm) | Epidermis adaxial (μm) |
|-----------------|---|---|---|---|
| Proud | 494.864 a* | 411.282 a | 42.0913 a | 24.4836 a |
| Polar Star | 482.546 a | 401.842 a | 40.5181 b | 21.1172 b |

*Medias (Tukey $P \leq 0.05$) con la misma letra no son significativamente diferentes

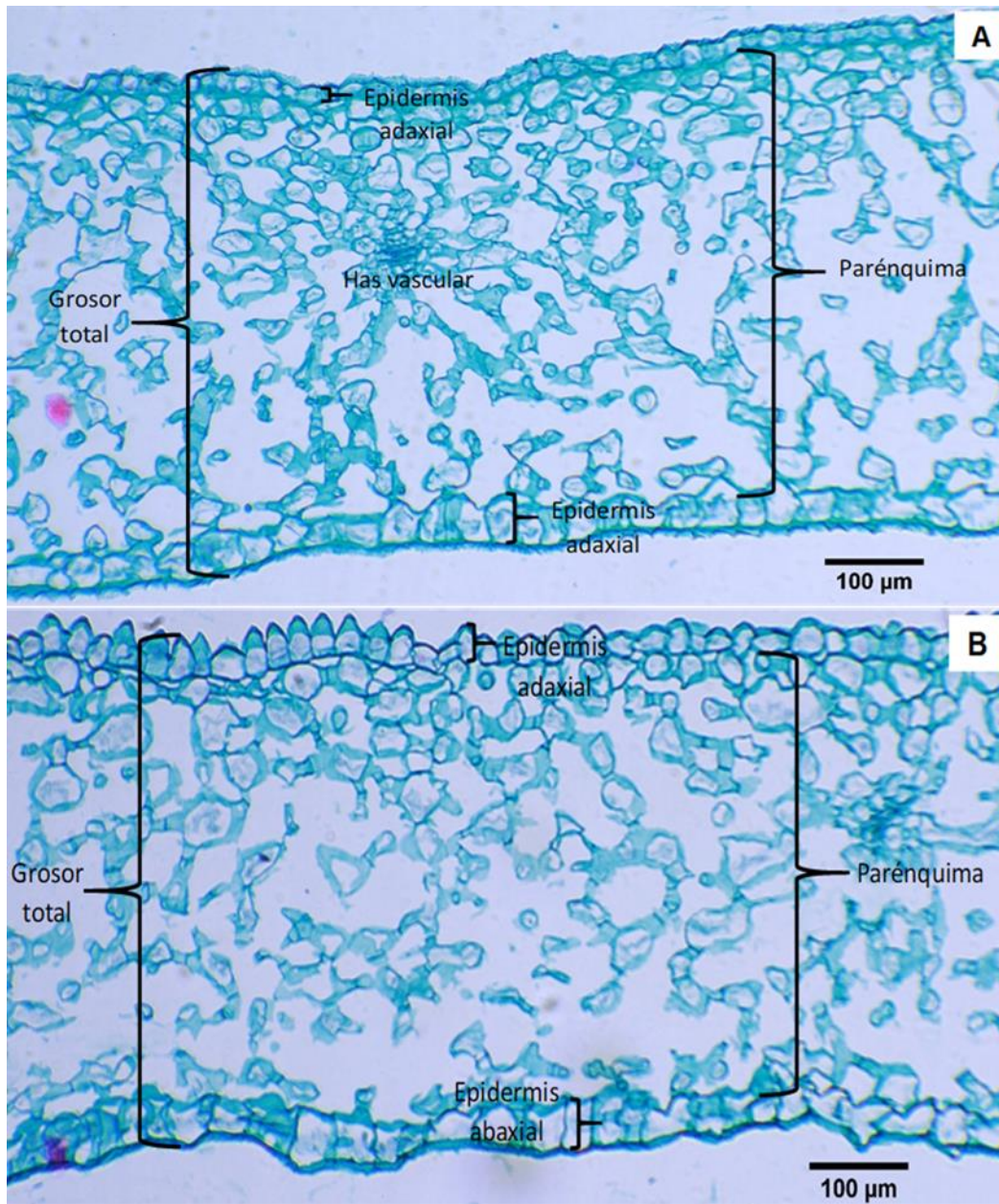


Figura 25. Cortes histológicos de pétalos externos de flores de “Polar Star” (A) y “Proud” (B)

Por lo anterior, posiblemente las características morfológicas de los tallos de “Proud” contribuyeron más a proteger al pétalo de la infección por *B. cinerea*, a pesar de que en el cultivar Polar Star, tuvo mayor contenido de fenoles.

CONCLUSIONES

La irradiación con luz UV-C (254 nm) a dosis de $\sim 1.0 \text{ kJ m}^{-2}$; $\sim 1.5 \text{ kJ m}^{-2}$ y $\sim 2.0 \text{ kJ m}^{-2}$ afectó significativamente el crecimiento micelial y el porcentaje de germinación de conidios de *Botrytis cinerea* aislados de tallos de rosa de corte, al inhibir 100 % del crecimiento del micelio hasta los 4 d así como la germinación de los conidios durante las 4 h y 24 h de evaluación respectivamente. En las pruebas *in vivo* se observó que al asperjar conidios irradiados en las mismas dosis sobre los pétalos, la infección se presentó pero de forma más lenta. Por otro lado, al irradiar los pétalos en las mismas dosis, éstos sufrieron daño en los pétalos a $\sim 1.5 \text{ kJ m}^{-2}$ y $\sim 2.0 \text{ kJ m}^{-2}$ debido a que alcanzaron grados más altos de severidad, con diferencias significativas entre cultivares, mostrando mayor resistencia los pétalos de "Proud". El efecto de hormesis aumentó levemente los niveles de fenoles totales en un 16.9 % en "Polar Star", pero no suficiente para generar resistencia a la infección. Por lo que el estímulo de la luz UV-C para la producción de más compuestos fenólicos, no es suficiente. Finalmente se concluye que las diferencias en la resistencia de los cultivares de rosa a la infección de *B. cinerea*, se atribuye a sus características morfológicas. Por lo anterior, el uso de luz UV-C en postcosecha para el control de enfermedades tiene limitaciones en flores de corte debido a que solo se requiere un porcentaje muy bajo para provocar la infección, además que el estímulo para la producción de compuestos fenólicos requiere de tiempos prolongados que una flor de corte no puede alcanzar dada su corta vida de florero.

LITERATURA CONSULTADA

- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. 5th Edn. Academic Press, New York, USA, ISBN: 0120445654, 952 p.
- Akgün, M. P., Ünlütürk, S. 2017. Effects of ultraviolet light emitting diodes (LEDs) on microbial and enzyme inactivation of apple juice. International Journal of Food Microbiology, 260: 65-74. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.007
- Andrade, C, M. J., Moreno, G, C., Henríquez, B, A., Gómez, G, A., Concellón, A. 2010. Influencia de la radiación UV-C como tratamiento postcosecha sobre carambola (*Averrhoa carambola* L.) mínimamente procesada almacenada en refrigeración. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 11 (1).18-27 DOI: <http://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/4393>
- Apolonio R, I., Franco M, O., Salgado S, M. L., Aquino M, J. G. 2017. *In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves. Revista Mexicana de Fitopatología, 35(2). 170-185. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1611-1
- Banno, S., Fukumori, F., Ichiishi, A., Okada, K., Uekusa, H., Kimura, M., Fujimura, M. 2008. Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. Phytopathology, 98(4): 397-404. DOI: 10.1094/PHYTO-98-4-0397
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. 1998. Descriptions and illustrations of genera. Illustrated genera of imperfect fungi, 4th Ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 218 p.
- Bautista, J. P., Barbosa, H., Uribe, V, D. 2016. Formulation prototype based on *Rhodotorula mucilaginosa* for the control of *Botrytis cinerea* in roses. Revista Colombiana de Biotecnología, 18(2): 13-23. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55826
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., Rodríguez, E. 2004. Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. Acta Farmacéutica

Bonaerense, 23, 369-372. Disponible en:
http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP_23_3_2_2_5OA9K8V7K9.pdf

Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, L. C., Corrales, L. 2007. Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *Nova*, 5(8), 147-153. DOI: 10.22490/24629448.383

Bergougnoux, V., Caissard, J. C., Jullien, F., Magnard, J. L., Scalliet, G., Cock, J. M., Baudino, S. 2007. Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. *Planta*, 226(4), 853-866. DOI: 10.1007/s00425-007-0531-1

Bokhari, N. A., Siddiqui, I., Parveen, K., Siddique, I., Rizwana, H., Soliman, D. A. W. 2013. Management of anthracnose of banana by UV irradiation. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(4), 1211-1214. Disponible en: <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-23-4/40.pdf>

Canale, M. C., Benato, E. A., Cia, P., Haddad, M. L., Pascholati, S. F. 2011. In vitro effect of UV-C irradiation on *Guignardia citricarpa* and on postharvest control of citrus black spot. *Tropical Plant Pathology*, 36(6), 356-361. DOI: 10.1590/S1982-56762011000600003

Carisse, O. (2016). Epidemiology and Aerobiology of *Botrytis* spp. In *Botrytis—the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. 127-148. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-23371-0_7

Collado, I. G., Viaud, M. 2016. Secondary metabolism in *Botrytis cinerea*: combining genomic and metabolomic approaches. In *Botrytis—The Fungus, The Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*. 291-313. Springer, Cham. DOI:10.1007/978-3-319-23371-0_15

Chandran, N. K., & Sriram, S. 2017. Comparative efficacy of in vitro methods to culture rose powdery mildew *Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr.) de Bary 1870). *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 23(1).88-85.

Disponibile:

<http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:pmhe&volume=23&issue=1&article=015>

- Darras, A. I., Demopoulos, V., Kazana, E., Tiniakou, C. A. 2010. Effects of UV-C irradiation on *Botrytis cinerea* floret specking and quality of cut gerbera flowers. In XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on 937: 493-498. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.937.60
- Darras, A. I., Joyce, D. C., Terry, L. A., Vloutoglou, I. 2006. Postharvest infection of *Freesia hybrida* flowers by *Botrytis cinerea*. Australasian Plant Pathology, 35(1), 55-63. DOI: 10.1071/AP05103
- Dewey, F. M., Grant-Downton, R. 2016. Botrytis-biology, detection and quantification. In Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. 17-34. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-23371-0_2
- Dong, Q., Wang, X., Byrne, D. H., Ong, K. 2017. Characterization of partial resistance to black spot disease of *Rosa* sp. HortScience, 52(1), 49-53. DOI: 10.21273/HORTSCI11349-16
- Elad, Y., Pertot, I., Prado, A. M. C., Stewart, A. 2016. Plant hosts of *Botrytis* spp. In Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. 413-486. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-23371-0_20
- Elad, Y., Vivier, M., Fillinger, S. 2016b. Botrytis, the Good, the Bad and the Ugly. In Botrytis—the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems.1-15. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-23371-0_20
- Feng, L., Zhang, Y., Xi, J., Zhu, Y., Wang, N., Xia, F., Jiang, L. 2008. Petal effect: a super hydrophobic state with high adhesive force. Langmuir, 24(8), 4114-4119. DOI: 10.1021/la703821h

- Ferrada, E. E., Latorre, B. A., Zoffoli, J. P., Castillo, A. 2016. Identification and Characterization of Botrytis Blossom Blight of Japanese Plums Caused by *Botrytis cinerea* and *B. prunorum* sp. nov. in Chile. *Phytopathology*, 106(2), 155-165. DOI: 10.1094/PHYTO-06-15-0143-R
- Fillinger, S., Elad, Y. 2016. *Botrytis*: The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. New York, NY: Springer. 486 p. DOI: 10.1007/978-3-319-23371-0
- Fillinger, S., Walker, A. S. 2016. Chemical control and resistance management of Botrytis diseases. In *Botrytis—the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. 189-216. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-23371-0_10
- FRAC. 2018. Disponible: <http://www.frac.info/working-group/sdhi-fungicides/introduction-and-general-information>. Consultado el 17 junio del 2019.
- Gado, E. A., El-Deeb, B., Ali, E. F., Mostafa, N. Y., Bazaid, S. A. 2016. Evaluation of silver nanoparticles for the control of *Phragmidium* species *in vitro* and Taif'rose Rust Disease in Field. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 7(3), 886-896.
- González A, G. A., Ayala Z, J. F., Rivera L, J., Zavaleta G, R., Villegas O, M. A., Espinoza, W. T. 2005. Mango, durazno y nectarina utilizando irradiación ultravioleta (UV-C). *Ciencia en la frontera*, 49-57. Disponible en: <http://148.210.132.19/ojs/index.php/cienciafrontera/article/viewFile/1615/1435#page=49>
- González, C., Brito, N., Sharon, A. 2016. Infection process and fungal virulence factors. In *Botrytis—the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. 229-246. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-23371-0_12
- Helmenstine, A, M, Ph.D. 2018. Ultraviolet Radiation Definition. 3 p. Disponible en: <https://www.thoughtco.com/definition-of-ultraviolet-radiation-604675>

- Holz, G., Coertze, S., Williamson, B. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In *Botrytis: Biology, pathology and control*.9-27. Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-1-4020-2626-3_2
- Hosen, M. I., Ahmed, A. U., Islam, M. R. 2010. Physiological variability and in vitro antifungal activity against *Botrytis cinerea* causing botrytis gray mold of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(3), 750-756. DOI: 10.5424/sjar/2010083-1274
- ISO. 2018. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:21348:ed-1:v1>.
- Janisiewicz, W. J., Takeda, F., Glenn, D. M., Camp, M. J., Jurick, W. M. 2016. Dark period following UV-C treatment enhances killing of *Botrytis cinerea* conidia and controls gray mold of strawberries. *Phytopathology* 106(4):386-394. DOI: 10.1094/PHYTO-09-15-0240-R
- Kielbassa, C., Roza, L., & Epe, B. 1997. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 18(4), 811-816. DOI: 10.1093/carcin/18.4.811
- Latorre, B. A., Rojas, S., Díaz, G. A., Chuaqui, H. 2012. Efecto germinicida de luz ultravioleta sobre hongos epifíticos aislados desde arándanos. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(3), 473-480. DOI: 10.4067/S0718-16202012000300007
- Liu, X., Cao, X., Shi, S., Zhao, N., Li, D., Fang, P., Zhang, Z. 2018. Comparative RNA-Seq analysis reveals a critical role for brassinosteroids in rose (*Rosa hybrida*) petal defense against *Botrytis cinerea* infection. *BMC genetics*, 19(1), 62.10 p. DOI: 10.1186/s12863-018-0668-x
- Marquenie, D., Lammertyn, J., Geeraerd, A. H., Soontjens, C., Van Impe, J. F., Nicolai, B. M., Michiels, C. W. 2002. Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 27-35. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00719-X

- Marquenie, D., Michiels, C. W., Geeraerd, A. H., Schenk, A., Soontjens, C., Van Impe, J. F., Nicolai, B. M. 2002. Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 187-196. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00648-1
- Millán, V, D., Romero, G, L., Brito, M., Ramos V, A. Y. 2015. Luz ultravioleta: inactivación microbiana en frutas. *Saber*, 27(3), 454-469. Disponible en: <http://www.scielo.org/ve/pdf/saber/v27n3/art11.pdf>
- NCBI.2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=279129>
- Nigro, F., Ippolito, A., Lima, G. 1998. Use of UV-C light to reduce *Botrytis* storage rot of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 13(3), 171-181. DOI: 10.1016/S0925-5214(98)00009-X
- Pataro, G., Sinik, M., Capitoli, M. M., Donsí, G., Ferrari, G. 2015. The influence of post-harvest UV-C and pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of tomato fruits during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 30, 103-111. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.06.003.
- Polat, İ., Baysal, Ö., Mercati, F., Gümrükcü, E., Sülü, G., Kitapçı, A., Carimi, F. 2018. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates collected on pepper in Southern Turkey by using molecular markers, fungicide resistance genes and virulence assay. *Infection, Genetics and Evolution*, 60, 151-159. DOI:10.1016/j.meegid.2018.02.019
- Quintero, C. J. P., Bohorquez, P. Y., Valenzuela, R. C., Solanilla, D. J. F. 2013. Avances en la aplicación de luz ultravioleta de onda corta (UVC) en frutas y vegetales enteros y mínimamente procesados: revisión. *Tumbaga*, 1(8), 29-60. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5014997>
- Rodríguez, W. E., Flórez, V. J. 2006. Comportamiento fenológico de tres variedades de rosas rojas en función de la acumulación de la temperatura. *Agronomía*

- Colombiana, 24 (2),247-257. Disponible en:
<https://search.proquest.com/docview/1677587115?pq-origsite=gscholar>
- Sgroppo, S. C., Sosa, C. A. 2009. Zapallo anco (*Cucurbita moschata* D.) Fresco cortado tratado con luz UV-C. FACENA, 25,7-19. Disponible en:
<http://www.exa.unne.edu.ar/revisfacena/25/7-19.pdf>
- SIAP. 2018. Servido de Información Agroalimentaria y Pesquera. Atlas Agroalimentario 2018. SAGARPA.134-135 Disponible en:
https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018. Consultado en octubre de 2018.
- Tanović, B., Delibašić, G., Milivojević, J., Nikolić, M. 2009. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. Archives of Biological Sciences, 61(3), 419-429. DOI: 10.1.1.430.5262&rep=rep1&type=pdf
- Urban, L., Charles, F., de Miranda, M. R. A., Aarrouf, J. 2016. Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. Plant Physiology and Biochemistry, 105, 1-11. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.04.004
- Usall, J., Ippolito, A., Sisquella, M., Neri, F. 2016. Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. Postharvest Biology and Technology, 122, 30-40. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2016.05.002
- Vrind, T. A. (2003). The Botrytis problem in figures. *In*: VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants 669.99-102. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.669.11
- Wang, G. 2005. A study on the history of Chinese roses from ancient works and images. *In*: IV International Symposium on Rose Research and Cultivation 751.347-356. DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.751.44
- Yong, A. 2004. El cultivo del rosal y su propagación. Cultivos tropicales, 25(2).53-67. ID: 193217832008

Zuraw, B., Sulborska, A., Stawiarz, E., Weryszko C. E. 2015. Flowering biology and pollen production of four species of the genus *Rosa* L. *Acta Agrobotanica*, 68(3). 267-278. DOI: 10.5586/aa.2015.031