

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Evaluación de biofungicidas para el control de *Botrytis cinerea* en rosas (*Rosa sp.*)

Annalía Valdivieso Ochoa

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 17 de Diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Evaluación de biofungicidas para el control de *Botrytis cinerea* en
rosas (*Rosa sp.*)**

Annalía Valdivieso Ochoa

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León-Reyes, PhD

Quito, 17 de Diciembre de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Annalía Valdivieso Ochoa

Código: 00201077

Cédula de identidad: 1717433849

Lugar y fecha: Quito, 17 de Diciembre de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El cultivo y producción de rosas es de suma importancia en el Ecuador, no obstante estas flores son susceptibles a diversos patógenos que provocan el daño de los botones y que generan altas pérdidas económicas. Una de las enfermedades más comunes y devastadoras en ornamentales es el hongo gris, causado por *Botrytis cinerea*. Por lo general, los fungicidas químicos son el método más extendido para combatirlo. Sin embargo, su uso indiscriminado puede provocar la resistencia de los patógenos, la acumulación de residuos tóxicos en la flor y riesgos potenciales para el medio ambiente y la salud humana. Por este motivo, el empleo de los agentes de control biológico ofrece una alternativa en comparación con los fungicidas químicos para el manejo de *B. cinerea*. De esta manera, el objetivo de la presente investigación fue revisar exhaustivamente literatura científica relacionada al biocontrol de *Botrytis cinerea* para, posteriormente, evaluar diferentes agentes biológicos o sus derivados en la prevención o curación del moho gris en las rosas. Mediante la revisión sistemática, se determinó que la gran mayoría de biofungicidas corresponden a microorganismos de origen bacteriano y fúngico; seguidos de extractos vegetales y compuestos biorracionales o poco tradicionales. En función de los géneros microbianos y agentes de biocontrol más predominantes, se escogieron los biofungicidas probados en la presente investigación. De estos, aquellos que tuvieron un efecto inhibitorio curativo fueron los aceites esenciales de orégano y albahaca (75 mg/ml), y *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^6 ufc/ml). Los primeros redujeron la infección en un 40% y 17%, respectivamente, mientras que *S. cerevisiae* en un 50%. Por otro lado, *B. subtilis* (1×10^7 ufc/ml) y *Arthrospira* hidrolizada (1ml/l) ofrecieron un efecto inhibitorio preventivo al disminuir el diámetro de la lesión en un 65% y 25% significativamente.

Palabras clave: biocontrol, *Botrytis cinerea*, moho gris, esporas, rosas, agente biológico, biofungicida, aceite esencial.

ABSTRACT

The cultivation and production of roses is of utmost importance in Ecuador. However, these flowers are susceptible to various pathogens that cause damage to the rose buds and generate high economic losses. One of the most common and devastating diseases in ornamentals crops is the gray mold, caused by *Botrytis cinerea*. In general, chemical fungicides are the most widespread method control such disease. Nonetheless, their indiscriminate use can lead to pathogen resistance, accumulation of toxic residues in the flower and potential risks to the environment and human health. For this reason, the use of biological control agents offers an alternative to chemical fungicides for the management of *B. cinerea*. Thus, the objective of the present research was to thoroughly review scientific literature related to the biocontrol of *Botrytis cinerea* to subsequently, evaluate different biological agents or their derivatives in the prevention or cure of gray mold on roses. Through the systematic review, it was determined that the vast majority of biofungicides correspond to microorganisms of bacterial and fungal origin, followed by plant extracts and biorational or non-traditional compounds. Based on the most predominant microbial genera and biocontrol agents, the evaluated biofungicidas of this investigation were chosen. Among those, those that had a curative inhibitory effect were essential oils of oregano and basil (75 mg/ml) and *Saccharomyces cerevisiae* (1x10⁶ cfu/ml). The former reduced infection by 40% and 17%, respectively, while *S. cerevisiae* did it by 50%. On the other hand, *B.subtilis* (1x10⁷ cfu/ml) and hydrolyzed *Arthrospira* (1ml/l) offered a preventive inhibitory effect by decreasing lesion diameter by 65% and 25% significantly.

Key words: biocontrol, *Botrytis cinerea*, gray mold, spores, roses, biological agent, biofungicide, essential oil.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	11
Métodos.....	14
Revisión sistemática.....	14
Material Vegetal.....	14
Preparación del Inóculo	14
Preparación de la cámara húmeda.....	15
Inoculación de pétalos de rosa y aplicación de tratamientos	15
Toma de datos y análisis estadístico	16
Resultados	17
Revisión sistemática.....	17
Prueba de eficacia de biofungicidas.....	18
Discusión.....	20
Revisión sistemática.....	20
Pruebas de eficacia de biofungicidas	21
Conclusiones	24
Tablas	25
Figuras.....	26
Referencias bibliográficas.....	31
Anexos	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosis evaluadas para los biofungicidas durante los bioensayos.....	25
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de los pasos realizados en el protocolo optimizado de los bioensayos....	26
Figura 2. Diagrama PRISMA de la revisión sistemática y sus respectivos resultados.....	26
Figura 3. Gráfico de proyección solar sobre la clasificación de los resultados de la revisión sistemática.	27
Figura 4. Resultados obtenidos de la revisión sistemática.....	28
Figura 5. Resultados de los biofungicidas de origen microbiano evaluados de forma preventiva y curativa.	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Microscopía de <i>Botrytis cinerea</i>	34
Anexo 2. Optimización de las pruebas de eficacia de biofungicidas.	35
Anexo 3. Disposición de controles y tratamientos en la cámara húmeda.....	36

INTRODUCCIÓN

El cultivo y producción de flores es de suma importancia en el Ecuador dado que, según el reporte estadístico de expoflores, este sector corresponde al 5.5% del total de las exportaciones no petroleras del país y se sitúa en el 5 puesto dentro del ranking de los 10 productos más exportados, aportando alrededor de 827 millones de dólares a la economía nacional. Sin embargo, en el último año, 2020, por las condiciones de pandemia, sus exportaciones se vieron reducidas en un 6% (Expoflores, 2020). Del sector florícola, la rosa es una de las principales flores ornamentales comercializadas nacional e internacionalmente. Esta ocupa aproximadamente el 60% de las hectáreas florícolas y representa el 68% de su producción (Corporación Financiera Nacional, 2017). Cabe destacar que, el Ecuador y especialmente la sierra ecuatoriana, poseen condiciones ambientales adecuadas para el cultivo de rosas. Es así que, en los Andes, ciertos microclimas permiten que estas puedan crecer más lento y por lo tanto obtener flores más grandes con tallos gruesos, largos y verticales, con hojas más robustas y sus colores son más intensos que en otras áreas de cultivo. Dichas condiciones han provisto de prestigio a las rosas producidas en el Ecuador, razón por la cual son altamente demandadas por países de la Unión Europea, Estados Unidos, China y Rusia entre otras (Franze & Ciroth y 2011).

Sin embargo estas flores son susceptibles a diversos patógenos que provocan el daño de los botones de las rosas y que generan altas pérdidas económicas dada la disminución de su valor comercial para la exportación (Herrera-Romero et al., 2017). Una de las enfermedades más comunes en estas flores es el moho gris, causado por *Botrytis cinerea*. Este se desarrolla en ambientes húmedos y con temperaturas superiores a 20 °C. La infección por este patógeno se da a través de heridas y es más común en plantas envejecidas (Bulger et al., 1987). La

enfermedad se manifiesta como manchas pardas en hojas y pétalos, impide que los botones se abran y causa una pérdida de su coloración natural así como la caída de hojas y desecamiento (Hammer et al., 1990). El mecanismo de infección de este patógeno necrotrófico inicia con la germinación de una conidia transportada hasta la superficie del tejido vegetal, fenómeno que ocurre bajo condiciones de elevada humedad. A continuación, el tubo germinal se transforma en un apresorio, lo que le permite la conseguir penetración de huésped. Este proceso genera una lesión en la planta, provocando necrosis y la activación de ciertos mecanismos de defensa. En ciertos casos, dependiendo del tejido y del estado de madurez de la planta, el hongo puede permanecer en una especie de estado de latencia, sin embargo, al cambiar las condiciones este inicia una proliferación vigorosa y la producción de esporas para continuar con el ciclo de infección (Van Kan, 2005).

Los fungicidas químicos son el método más extendido para combatir la enfermedad del moho gris. Estos suelen ser utilizados en grandes cantidades para asegurar que el producto final goce de la mejor calidad y no posea imperfecciones. Esto, combinado con la carencia de sindicatos florícolas organizados y la escasa información disponible sobre este tipo de productos para la población, dificultan la caracterización de los fungicidas y su uso adecuado (Handal et al., 2015). Además, el uso indiscriminado de estos agentes químicos puede generar problemas como: el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos, la acumulación de residuos tóxicos en la flor y riesgos potenciales para el medio ambiente (Herrera-Romero et al., 2017). En consecuencia, a largo plazo, los biofungicidas ofrecen un tratamiento más eficaz en comparación con los fungicidas químicos y una alternativa prometedora para el manejo de *B. cinerea* tanto antes como después de la cosecha.

Los biofungicidas corresponden a un amplio grupo de agentes biológicos, subproductos o metabolitos de los mismos, e incluso productos inorgánicos análogos a aquellos de la

naturaleza. Varios agentes biológicos han sido identificados y empleados hasta la actualidad. Varios corresponden a especies microbianas de diferentes grupos taxonómicos como, por ejemplo, bacterias, algas, hongos y levaduras, que presentan efectos antagónicos contra una amplia gama de fitopatógenos. Por lo general, estos antagonistas suelen hallarse y aislarse de varios tejidos de diversos cultivos vegetales y del suelo (Chen et al., 2020). Adicionalmente, extractos o aceites esenciales de plantas también suelen ser usados como biocontroladores, dado que estas sustancias poseen diferentes principios activos que ayudan a inhibir el crecimiento de algunos hongos (Ranasinghe et al., 2002; Zambonelli et al., 2004). Esto ocurre también con ciertos compuestos no orgánicos cuyo efecto representa una baja toxicidad para el ser humano y el medio ambiente, estos productos se conocen como biorracionales (Knight et al., 1997). Dada la gran cantidad de agentes y compuestos biocontroladores, se plantea como objetivo del presente proyecto, evaluar biofungicidas para el control de *Botrytis cinerea* en rosas.

MÉTODOS

Revisión sistemática

Para la revisión sistemática, se empleó la pregunta de investigación: ¿Cuáles son los biofungicidas para el manejo del patógeno *Botrytis cinerea*? Los términos de búsqueda se dividieron en dos principales categorías: *Botrytis cinerea* y Biocontrol. Para la categoría de búsqueda de artículos sobre *Botrytis cinerea*, se utilizaron los términos: "Botrytis cinerea", "gray mold", "grey mould", "grey mold", "Botrytis" y "B. cinerea". Por otro lado, para vincular la búsqueda de artículos del hongo relacionados con biocontrol, se usaron los términos: "biocontrol", " bio-control", "biological control", "disease control", "metabolite*", "antigunfal*", "biofungicide*", "fungicidal", "fungistatic" y "extract*". Por último, para limitar la búsqueda solo a los agentes y productos utilizados como biofungicidas, se excluyeron términos como "gene*" y "genome", así como documentos de tipo revisión. De igual forma, se limitó la búsqueda al rango de años entre el 2011 y 2021. La misma búsqueda se realizó en las bases de datos Scopus y Web of Science.

Material Vegetal

Para la realización de los bioensayos, se emplearon rosas de la variedad Vendela, por ser estas las más susceptibles a la infección por el moho gris. Estas se obtuvieron de la provincia de Pichincha en el cantón Cayambe por medio de la finca Josarflor. Las flores empleadas no fueron sometidas a tratamientos antifúngicos en la post-cosecha.

Preparación del Inóculo

Para llevar a cabo las infecciones controladas, se llevó a cabo la preparación de una suspensión de conidios de *Botrytis cinerea*. Con este propósito, se tomaron pétalos de una rosa infectada y con síntomas de moho gris y se lavó uno de los pétalos con 15 ml de medio PDB en una caja Petri. Con la ayuda de una pinza y un asa de Digralski, se raspó el moho visible

con el objetivo de desprender el micelio con esporas de la superficie del pétalo. La suspensión obtenida se filtró con un algodón para eliminar los micelios y se obtuvo una solución únicamente con esporas. A continuación, 10 µL de esta solución se observaron en la cámara de Neubauer para poder ajustarla a una concentración de 1×10^5 conidios/ml. Finalmente, esta se dejó reposar por dos horas.

Preparación de la cámara húmeda

A manera de cámaras húmedas se emplearon cajas plásticas de 70 x 30 cm de base a las cuales se les colocó papel absorbente para humedecerlas con 100 ml de agua. Se colocaron pétalos aleatorizados provenientes de diferentes rosas blancas de la variedad Vendela, por ser esta la más susceptible a la enfermedad del moho gris. Para esto, durante el despétalo, se descartaron los tres primeros pétalos de cada flor y se seleccionaron los 10 siguientes. Este protocolo se empleó según los resultados de la optimización indicados en el Anexo 1.

Inoculación de pétalos de rosa y aplicación de tratamientos

Después, se procedió a la evaluación de biofungicidas. Para esto, se probaron diferentes dosis de manera curativa y preventiva. En función de estos dos modos de empleo, se determinó el orden de la inoculación y la aplicación de los agentes de biocontrol. De esta forma, para los ensayos curativos se llevó a cabo primero la inoculación de la suspensión de conidios y, después de 24 h, se colocaron las dosis de los tratamientos por aspersion. Por el contrario, para los tratamientos preventivos primero se realizó la aplicación de los tratamientos y luego de 24 horas se realizó la inoculación con el hongo.

En el presente estudio se evaluaron 3 controles que fueron, control positivo, negativo e interno. Por otro lado, los tratamientos evaluados correspondieron a biofungicidas de cuatro principales categorías. Como agentes de biocontrol bacteriano se probaron *Bacillus subtilis* (Rhapsody®) y *Bacillus amyloliquefaciens* (Vitanica RZO). De igual forma, se empleó a

Trichoderma spp. (Trichoplus) y *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan®) como agentes de origen fúngico. Todos los microorganismos se obtuvieron productos comerciales, mismos que se detallan en los paréntesis. Como biofungicidas de origen vegetal, se probaron: aceite esencial de orégano y aceite esencial de albahaca, ambos de la marca DoTerra. Finalmente, se emplearon diluciones de ácido acético al 15% (Apercid) como un biofungicida biorracional y varias concentraciones de *Arthrospira* spp. hidrolizada (SpiraGrow®).

Con respecto a la inoculación, se colocaron 5 µL de la suspensión preparada, tanto para el control positivo como para el interno. Por el contrario, el control negativo contuvo únicamente 5 µL del medio de cultivo PDB libre de esporas. Para los tratamientos también se usó una dosis de 5 µL de la suspensión de conidios. Todas las inoculaciones se hicieron en la parte central de pétalo. Las dosis aplicadas de cada uno de los tratamientos se indican en la Tabla 1, estas se prepararon por medio de diluciones en agua destilada con Tween (0.05% v/v). Todos fueron aplicados por aspersion, lo que correspondió a dos disparos de la solución por medio de atomizadores. Al terminarse el proceso de inoculación y aplicación de tratamientos, se humedeció la tapa de la caja con agua, cerró la cámara húmeda y se inició el período de incubación en condiciones de oscuridad.

Toma de datos y análisis estadístico

Después de 3 días de incubación a oscuras, se realizó la toma de datos mediante la medición de los diámetros verticales y horizontales de la lesión generada por el hongo. Este proceso se realizó con ayuda de una regla, aunque se demostró que el software ImageJ también estima este parámetro de forma similar, como lo indica el Anexo 2. Una vez recolectados los valores del diámetro de cada uno de los tratamientos y controles, se evaluó si existieron diferencias significativas por medio de pruebas ANOVA y Tukey considerando $p < 0.05$. Los análisis estadísticos mencionados se llevaron a cabo en el software Minitab 19.

RESULTADOS

Revisión sistemática

Los resultados de la revisión sistemática se detallan en la Figura 1, correspondiente al esquema PRISMA. El resultado final del número de artículos de fue de 215. De estos, como lo expone la Figura 2, 81 fueron de origen fúngico, 52 de origen bacteriano, 57 de origen vegetal y 25 de otro tipo como, por ejemplo, los biorracionales. De cada categoría, los géneros más predominantes fueron *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thymus* y *Origanum*. Dada su prevalencia, algunos de estos se emplearon en la evaluación de los biofungicidas. Por otro lado, la revisión destacó que una gran mayoría de las investigaciones sobre agentes de biocontrol se evalúan en cultivos de tomate, fresa, uva y manzana que corresponden al 56%, 45%, 45% y 34% de los artículos evaluados respectivamente. No obstante, muy poca investigación se ha realizado en cultivos de flores ornamentales, como se demuestra en la Figura 3A. Adicionalmente, se evidenció una tendencia por el uso de los biofungicidas de manera preventiva. Como lo indica la Figura 3B, aproximadamente el 60% de los artículos revisados utilizaron modos de empleo preventivos, mientras que solo un 20% evaluó el uso curativo. Cabe destacar que, aproximadamente otro 20% de los artículos probó la aplicación de los biofungicidas de forma simultánea al desarrollo de la infección. De igual forma, se evidencia que, en más del 50% de los artículos, los biocontroladores tienen efectos inhibitorios satisfactorios.

Con respecto a los géneros principales de cada categoría, la Figura 3C establece que especies de *Aureobasidium*, *Candida*, *Clonostachys*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Pichia*, *Rhodotula*, *Saccharomyces*, *Streptomyces* y *Trichoderma* fueron las más predominantes dentro de la categoría de biofungicidas fúngicos. De estos, *Candida*, *Cryptococcus* y *Pichia* funcionaron el 100% de las veces mientras que el resto de géneros tuvieron porcentajes de éxito de al menos el 50%. En el caso de los agentes bacterianos, cuatro géneros fueron los más

destacados (Figura 3D) *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*. Todos los géneros funcionaron en más del 60% de las veces, siendo *Lactobacillus* el más satisfactorio y *Bacillus* el más evaluado. Con respecto al uso de extractos o aceites esenciales vegetales, hubo una amplia diversidad de especies exploradas. Sin embargo, las presentadas en la Figura 3E, son aquellas que se repitieron en más de dos ocasiones en toda la revisión sistemática. Dicho géneros fueron los géneros *Allium*, *Baccharis*, *Carum*, *Cinnamomum*, *Citrus*, *Eucalyptus*, *Laurus*, *Mentha*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymus* y *Tulbaghia*. Se evidenció que, casi todos los extractos funcionaron el 100% de las veces, a excepción de *Thymus*, que logró inhibir a *Botrytis cinerea* el en 67% de artículos, y *Tulbaghia* que no funcionó. Finalmente, de la categoría de “otros”, expuesta en la Figura 3F, se destaca el uso de los compuestos biorracionales, alga o microalgas, efluentes o compost y el quitosano. Todos tuvieron un elevado porcentaje de efectividad, al haber funcionado en más del 60% de los artículos.

Prueba de eficacia de biofungicidas

Los biofungicidas de origen bacteriano fueron *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. En primer lugar, sí bien *Bacillus subtilis* es una bacteria ampliamente utilizada para el biocontrol de patógenos como *Botrytis*, se evidenció que en la rosas el único efecto inhibitorio se da al emplear 1×10^7 ufc/ml de forma preventiva, como se indica en la Figura 5A. Con este tratamiento, el diámetro de lesión se redujo en más de un 65%. A diferencia de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* evidenció que ninguna de las dosis empleadas fueron significativamente diferentes a controles (Figura 5B), indicando que su uso como preventivo y curativo no es eficiente en la inhibición.

Por otro lado, los biofungicidas fúngicos probados fueron *Trichoderma* spp. y *Saccharomyces cerevisiae*. Se evidenció que las concentraciones evaluadas de *Trichoderma* presentaron diámetros de lesión superiores a aquellas observadas en los controles positivos,

como lo demuestran la Figura 5C. Esta diferencia fue significativa en los tratamientos curativos pero no en los preventivos. De ese modo, en la evaluación curativa, se incrementó en tamaño de la infección en aproximadamente un 15% al usar las dos dosis. Por esta tendencia observada, se establece que este microorganismo no es viable para el biocontrol de *Botrytis cinerea* en las rosas. En cuanto a *Saccharomyces cerevisiae*, cuyos resultados se indican en la Figura 5D, se destacó que el uso de 1×10^6 ufc/ml tuvo una tendencia a reducir el diámetro de la lesión, aunque esta diferencia sólo fue significativa en el tratamiento curativo, reduciendo el diámetro cerca de un 50%.

De igual forma, se probaron dos tipos de aceites esenciales. El primero fue el aceite esencial de orégano (Figura 6A), para el cual se estableció que, únicamente la concentración de 75 mg/L de uso curativo, tuvo un efecto inhibitorio significativo cercano al 40%. Sin embargo, esto no se observó en el ensayo de uso preventivo. En el caso del aceite esencial de albahaca, en la Figura 6B, se observó el mismo patrón aunque el porcentaje de inhibición fue apenas del 17%.

Finalmente, se evaluaron dos tipos de biofungicidas no clasificados en las tres principales categorías, estos fueron la *Arthrospira* spp. hidrolizada y el ácido acético, como compuesto biorracional. En el caso del extracto hidrolizado, se evidenció que el único efecto inhibitorio significativo, correspondiente a una reducción del 25% de la lesión, se dio al emplear 1 mL del producto de manera preventiva (Figura 6C). Por otra parte, el uso preventivo y curativo del ácido acético tampoco resultó ser una alternativa de biocontrol, como lo demuestra la Figura 6D, ya que los tratamientos fueron estadísticamente iguales a los controles positivos.

DISCUSIÓN

Revisión sistemática

Según los resultados obtenidos de la revisión sistemática se destaca la predominancia de agentes microbianos como bacterias y hongos, seguido de los productos vegetales y finalmente, los biorracionales. La prevalencia de los microorganismos se debe a la su amplia diversidad tanto como flora endógena y exógena de planta, así como parte de la microbiota del suelo (Chen et al., 2020). Dada la gran abundancia de este tipo de agentes de biocontrol, es de esperarse que haya un sinnúmero de posibilidades por explorar. Por otro lado, se sabe que las plantas producen una extensa variedad de metabolitos secundarios cuya función, entre muchas otras, es ofrecer una barrera de protección contra fitopatógenos. Es así, que también se justifica la evaluación de diferentes extractos vegetales en diferentes solventes o en forma de aceites esenciales (Raveau et al., 2020). Finalmente, en menor medida, se ha observado el empleo de compuestos producidos de forma natural, análogos biológicos o sintéticos idénticos a aquellos de origen natural (Horowitz et al., 2009). La investigación, relativamente escasa de esta categoría, puede deberse a una menor disponibilidad de tipo de productos en comparación con los anteriores.

Otro resultado de gran importancia, es la predominancia de cultivos como el tomate, la fresa, la uva y la manzana, probablemente por ser unos de los principales productos alimenticios afectados por *Botrytis cinerea*. Por este motivo, se resalta la importancia de mejorar y de hacer sustentables diferentes tipos de producciones agrícolas de alimentos, considerando que la población mundial se encuentra en constante crecimiento (Pereira, 1993). Finalmente, uno de los resultados más importantes es la preferencia y elevada efectividad del uso preventivo de estos biofungicidas. Se sugiere que la causa de este fenómeno corresponde a una adaptación previa por parte de los agentes de biocontrol a las condiciones de la planta o

al requerimiento de un tiempo previos para que estos eliciten alguna ruta de defensa en el cultivo (Rana et al., 2020).

Pruebas de eficacia de biofungicidas

El efecto inhibitorio de *Bacillus subtilis* observado en Figura 5^a se atribuye a la producción de metabolitos que impiden el desarrollo del *Botrytis cinerea* mediante un modo de acción antibiótico (Calvo-Garrido et al., 2019). Se ha demostrado que esta especie bacteriana produce un compuesto biosurfactante que permite disminuir la severidad de infección de este fitopatógeno en una proporción dependiente de su concentración (Ben et al., 2020). En presente caso, el porcentaje de inhibición fue de aproximadamente un 71%, lo que, según, sugeriría que la cantidad de biosurfactante producida por el microorganismo en una concentración de 1×10^7 ufc/ml es cercano a los 0.8 mg/L. Además, se demostró el uso de este compuesta fue menos efectivo de forma curativa, patrón que también se observó en la presente investigación. Por otro lado, el efecto controlador de *B. subtilis* en la dosis más alta empleada puede relacionarse también con el efecto antifúngico de ciertos lipopéptidos característicos de este género bacteriano (Ben et al., 2020). Adicionalmente, se ha demostrado también que estos pueden inducir resistencia por parte de la planta (Wahab et al., 2020).

Con respecto a *B. amyloliquefaciens* (Figura 5B), se determinó que la ausencia de inhibición tanto de forma curativa como preventiva difiere con los ejemplos encontrados en la literatura. No obstante, cabe destacar que el uso de este agente de biocontrol, como muchos otros, ha sido probado únicamente en cultivos no ornamentales y en tejidos como frutos y hojas. Por ejemplo, Maung y colaboradores, hallaron que el empleo de este microorganismo y sus metabolitos permiten reducir la infección por *B. cinerea* al aplicarlo de manera foliar y en el suelo de las plantas de tomate, sugiriendo que este tiene un efecto de inducción de resistencia (2021). Por otro lado, esta bacteria también se caracteriza por la producción de lipopéptidos con

efecto antifúngico, sin embargo, la efectividad de estos compuestos es menor en comparación con aquellos obtenidos de *B. subtilis* (Ben et al., 2020).

Al evaluar el efecto de una cepa comercial de *Trichoderma* se evidenció que, de forma preventiva este no presentó ninguna diferencia significativa en comparación con el control positivo, como se indica en la Figura 5C. Sin embargo, de forma curativa, esta incrementó el tamaño de la lesión. Las causas de estos resultados son poco semejantes a otros casos de la literatura, donde este hongo se presenta como uno de los agentes de biocontrol más predominantes y efectivos. No obstante, existe evidencia de que algunas combinaciones de cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma atroviride* no presentaron ninguna eficiencia en el control de *B. cinerea* en flores de fresa (Xu et al., 2010). Asimismo, cabe la posibilidad de que *Trichoderma* actúe como un patógeno oportunista en tejidos sensibles como los pétalos de rosa. Este caso, aunque poco probable, se ha dado en cultivos de maíz donde han existido algunos reportes de incidencia (Pfordt et al., 2020). De igual forma, se plantea que la inducción de ciertas vías de defensa en la rosa, puede generar la susceptibilidad en los pétalos. Por ejemplo, se ha determinado que el ácido salicílico induce la susceptibilidad de las rosas ante patógenos necrotróficos (Spoel et al., 2007) y, que *Trichoderma* activa la ruta del ácido salicílico (Leonetti et al., 2017). Por último, se sigue que el patógeno se nutre a partir de las células del microorganismo, incrementando su proliferación.

En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5D), la reducción del diámetro de la lesión utilizando la concentración de 1×10^6 ufc/ml preventiva se asemeja a aquellas conseguidas en otras investigaciones que emplean la misma levadura. El efecto antifúngico, en este caso, se asocia a la producción de compuestos volátiles y difusibles de este especie (Chen et al., 2018). Sin embargo, aunque se requiere más investigación al respecto, las toxinas de los tipos K1, K2, K3 y K28 de *S. cerevisiae* podrían cumplir algún rol inhibitorio (Marquina et al., 2002).

Para el uso de *Arthrospira* spp. hidrolizada, cuyos resultados se exponen en la Figura 6C, se sugiere que el efecto controlador observado en el tratamiento 1mL/L se deba a ciertas proteínas producidas por las algas, las ficobiliproteínas. Según Righini y colaboradores (2020), el empleo de estos metabolitos ha demostrado ser efectivo en el control de *Botrytis cinerea* en el tomate. En el estudio realizado por estos investigadores, se demostró que la severidad de la enfermedad por moho gris disminuyó de forma lineal al aumentar la concentración de ficobiliproteínas. A diferencia de los resultados obtenidos en la literatura expuesta, en el presente estudio no se observa una reducción progresiva de la gravedad de la infección al incrementar la concentración del hidrolizado. Esto puede deber a que el producto usado, por ser un hidrolizado, posee otro tipo de sustancias nutritivas como proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales que podrían promover el crecimiento del hongo (Großhagauer et al., 2020).

Con respecto al uso de los dos aceites esenciales, de orégano y de albahaca, presentados en las Figuras A y B, se establece que su función en la dosis curativa de 75 mg/ml se debe a su acción antibiótica. Esto porque se ha demostrado que dichos aceites tienen la capacidad de limitar el crecimiento de *Botrytis* al limitar del crecimiento de micelios, suprimir la germinación de esporas e impedir el alargamiento del tubo germinativo. De este modo, la propagación del hongo se ve reducida por la presencia de una menor carga de esporas (Soylu et al., 2010). Finalmente, se destaca que los resultados obtenidos del uso de ácido acético (Figura D) también difieren de otros resultados obtenidos de otras fuentes científicas. Este ácido orgánico ha sido descrito como un compuesto antifúngico y se ha evidenciado que este limita el crecimiento de los micelios (Ruiz-Moyano et al., 2020). En el caso de la presente investigación, sin embargo, se observó que las dosis de ácido acético generaban un deterioro en el tejido del pétalo, lo que pudo haber facilitado la infección por parte de *Botrytis*.

CONCLUSIONES

Con respecto a la revisión sistemática, se determinó que los principales biofungicidas son de origen fúngico, bacteriano y vegetal. Además, los principales géneros de cada categoría indicaron un alto porcentaje de efectividad, tendiendo superar el 50% en la mayoría de los casos. Por otro lado, se hizo evidente que el modo de empleo con resultados de biocontrol más satisfactorios fue el uso preventivo. Además, se resalta la importancia de la presente investigación en rosas, dado que la revisión sistemática indicó que muy poca investigación es realizada en cultivos de flores ornamentales como la rosa.

Finalmente, por medio de los bioensayos, se determinó que *Saccharomyces cerevisiae* y los aceites esenciales de orégano y albahaca funcionaron al aplicarse de forma curativa en las dosis de 1×10^6 ufc/ml y 75 mg/ml respectivamente. Por otro lado, *Bacillus subtilis* y el hidrolizado de *Arthrospira* spp. funcionaron de forma preventiva en las concentraciones de 1×10^7 ufc/ml y 1 ml/l. De este modo, se concluye que el modo de empleo, ya sea curativo o preventivo, depende del tipo de biofungicida y de la dosis usada. Asimismo, se resalta que ninguno de los biofungicidas alcanzó la eficiencia del fungicida comercial, por lo que se recomienda probar combinaciones de los diferentes tratamientos exitosos.

TABLAS

Tabla 1. Dosis evaluadas para los biofungicidas durante los bioensayos.

Categoría	Biofungicida	Dosis evaluadas
Bacteriano	<i>Bacillus subtilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 2.5×10^6 ufc/ml • 5×10^6 ufc/ml • 1×10^7 ufc/ml Dosis agrícolas recomendadas
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 2×10^6 ufc/ml • 4×10^6 ufc/ml Dosis agrícolas recomendadas
Fúngico	<i>Trichoderma</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • 2.5×10^6 ufc/ml • 1×10^7 ufc/ml Dosis agrícolas recomendadas
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 1×10^5 ufc/ml • 1×10^6 ufc/ml • 1×10^7 ufc/ml (Soylu et al., 2010)
Vegetal	Aceite esencial de orégano	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mg/L • 50 mg/L • 75 mg/L (Soylu et al., 2010)
	Aceite esencial de albahaca	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mg/L • 50 mg/L • 75 mg/L (Rapsor et al., 2010)
Otros	<i>Arthrospira</i> spp. hidrolizada	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml/L • 2.5 ml/L • 5 ml/L Dosis agrícolas recomendadas
	Ácido acético	<ul style="list-style-type: none"> • 1% • 2.5% • 5% • 10% Dosis agrícolas recomendadas

Descripción: La tabla indica los biofungicidas según su clasificación con las respectivas dosis que se emplearon para los bioensayos.

FIGURAS



Figura 1. Diagrama de los pasos realizados en el protocolo optimizado de los bioensayos.

Descripción: La ilustración corresponde a una descripción gráfica de la metodología de preparación de suspensión de conidios, evaluación de tratamientos y análisis de resultados.

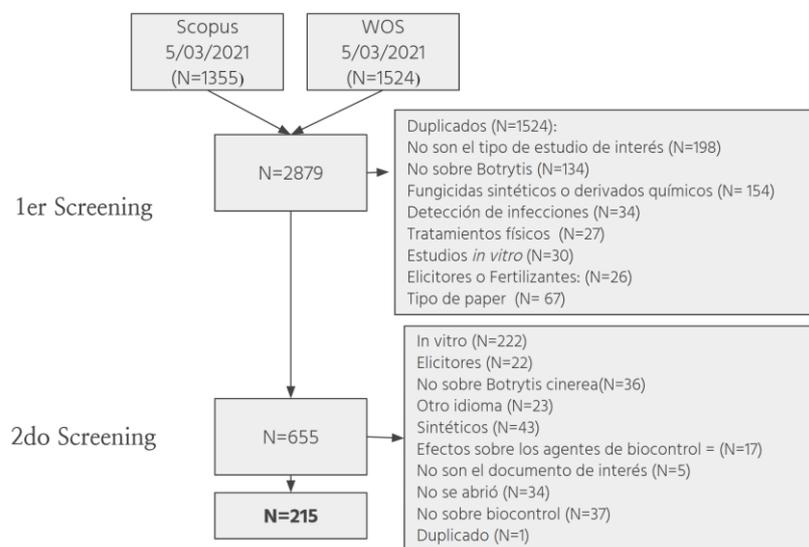


Figura 2. Diagrama PRISMA de la revisión sistemática y sus respectivos resultados.

Descripción: Se detalla el progreso de cada avance en la revisión sistemática en función del número de artículos. Se detalla también los términos de exclusión empleados en cada screening.

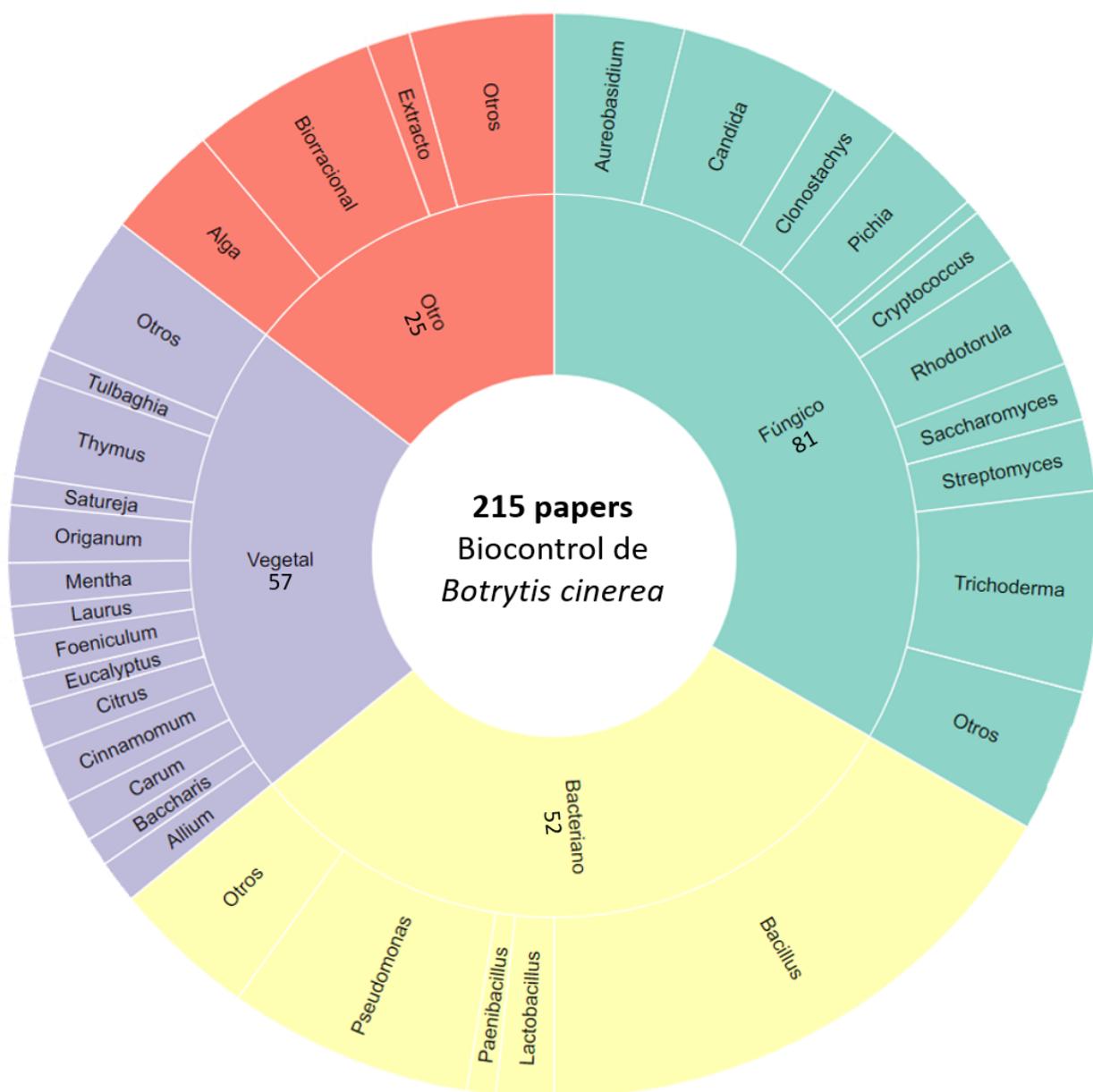


Figura 3. Gráfico de proyección solar sobre la clasificación de los resultados de la revisión sistemática.

Descripción: La gráfica indica las principales categorías de biofungicidas empleados en los últimos once años así como los géneros de especie y productos predominantes de cada clasificación. De igual manera, se detalla el número de artículos por categoría.

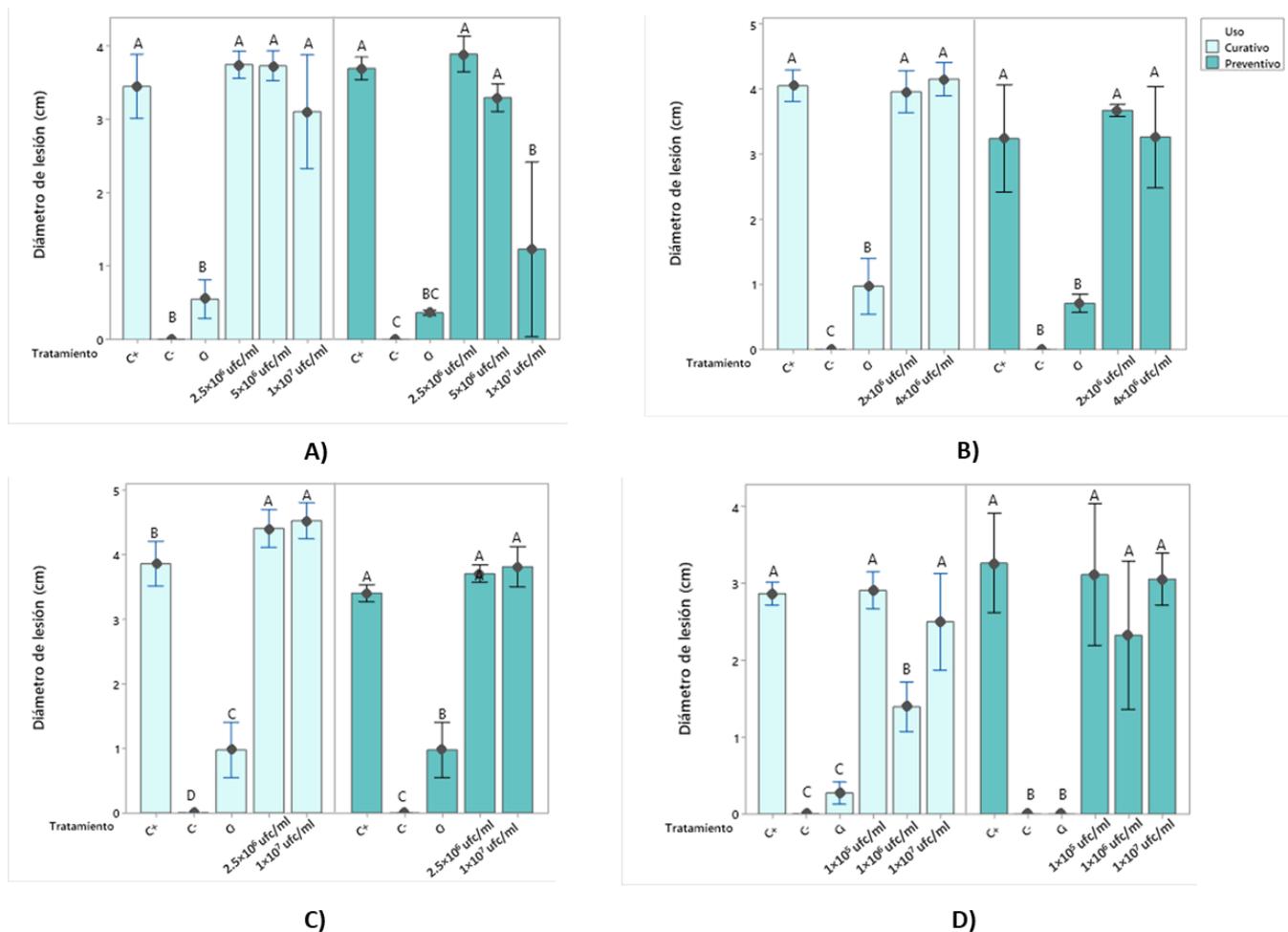


Figura 5. Resultados de los biofungicidas de origen microbiano evaluados de forma preventiva y curativa.

Descripción: Los dos primeros gráficos corresponden a los biofungicidas bacterianos, siendo A) *Bacillus subtilis* y B) *Bacillus amyloliquefaciens*. Por otro lado, las dos gráficas inferiores representan los tratamientos de los agentes fúngicos. De esta manera, C), indica los resultados de *Trichoderma* spp. y D), aquellos de *Saccharomyces cerevisiae*. Las letras iguales indican que hubo diferencia significativa entre tratamiento considerando $p \geq 0.05$.

Para cada ensayo el número de réplicas fue de $n = 10$.

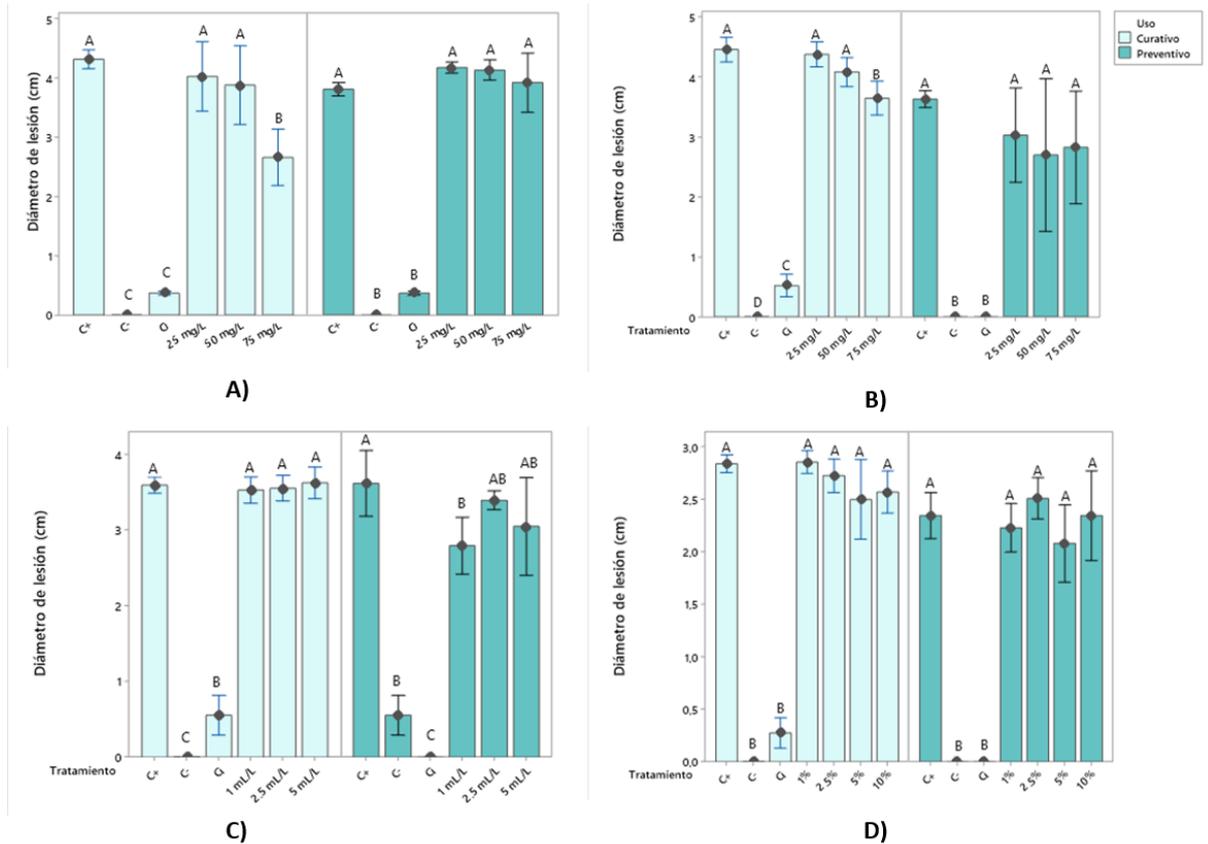


Figura 6. Resultados de los biofungicidas de origen vegetal y productos adicionales evaluados de forma preventiva y curativa.

Descripción: Los dos primeros gráficos corresponden a los biofungicidas vegetales, siendo A) aceite esencial de orégano y B) aceite esencial de albahaca. Por otro lado, las dos gráficas inferiores representan los tratamientos de *Arthrospira* spp. hidrolizada (gráfico C) y ácido acético (Gráfico D) respectivamente. Las letras iguales indican que hubo diferencia significativa entre tratamiento considerando $p \geq 0.05$. Para cada ensayo el número de réplicas fue de $n = 10$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ben Khedher, S., Boukedi, H., Laarif, A., & Tounsi, S. (2020). *Biosurfactant produced by Bacillus subtilis V26: a potential biological control approach for sustainable agriculture development. Organic Agriculture*. doi:10.1007/s13165-020-00316-0
- Bulger, M. A., Ellis, M. A., & Madden, L. V. (1987). Influence of temperature and wetness duration on infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and disease incidence of fruit originating from infected flowers. *Phytopathology*, 77(8), 1225-1230.
- Calvo-Garrido, C., Roudet, J., Aveline, N., Davidou, L., Dupin, S., & Fermaud, M. (2019). *Microbial Antagonism Toward Botrytis Bunch Rot of Grapes in Multiple Field Tests Using One Bacillus ginsengihumi Strain and Formulated Biological Control Products. Frontiers in Plant Science*, 10. doi:10.3389/fpls.2019.00105
- Chen, C., Cao, Z., Li, J., Tao, C., Feng, Y., & Han, Y. (2020). *A novel endophytic strain of Lactobacillus plantarum CM-3 with antagonistic activity against Botrytis cinerea on strawberry fruit. Biological Control*, 148, 104306. doi:10.1016/j.biocontrol.2020.104
- Chen, P.-H., Chen, R.-Y., & Chou, J.-Y. (2018). *Screening and Evaluation of Yeast Antagonists for Biological Control of Botrytis cinerea on Strawberry Fruits. Mycobiology*, 46(1), 33–46. doi:10.1080/12298093.2018.1454013
- Corporación Financiera Nacional. (2017). Sector Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Pesca: Cultivo de Rosas, Subgerencia de análisis e información, <https://expoflores.com/wp-content/uploads/2021/03/Anual-Expoflores.pdf>
- Expoflores (2020). Reporte Estadístico Anual. Expoflores, <https://expoflores.com/wp-content/uploads/2021/03/Anual-Expoflores.pdf>
- Franze, J., & Ciroth, A. (2011). *A comparison of cut roses from Ecuador and the Netherlands. The International Journal of Life Cycle Assessment*, 16(4), 366–379. doi:10.1007/s11367-011-0266-x
- Großhagauer, S., Kraemer, K., & Somoza, V. (2020). *The True Value of Spirulina. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.9b08251
- Hammer, P. E., Yang, S. F., Reid, M. S., & Marois, J. J. (1990). Postharvest control of *Botrytis cinerea* infections on cut roses using fungistatic storage atmospheres. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(1), 102-107.
- Handal, A. J., Hund, L., Páez, M., Bear, S., Greenberg, C., Fenske, R. A., & Barr, D. B. (2015). *Characterization of Pesticide Exposure in a Sample of Pregnant Women in Ecuador. Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(4), 627–639. doi:10.1007/s00244-015-0217-9
- Herrera-Romero, I., Ruales, C., Caviedes, M., & Leon-Reyes, A. (2017). *Postharvest evaluation of natural coatings and antifungal agents to control Botrytis cinerea in Rosa sp. Phytoparasitica*, 45(1), 9–20. doi:10.1007/s12600-017-0565-2

- Horowitz, A. R., Ellsworth, P. C., & Ishaaya, I. (2009). *Biorational Pest Control – An Overview. Biorational Control of Arthropod Pests, 1–20*. doi:10.1007/978-90-481-2316-2_1
- Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A. J., Heaney, S. P., Murray, D. C., ... Youle, and D. (1997). *RATIONALE AND PERSPECTIVES ON THE DEVELOPMENT OF FUNGICIDES. Annual Review of Phytopathology, 35(1), 349–372*. doi:10.1146/annurev.phyto.35.1.34
- Kwon, J.-H., Cheon, M.-G., Choi, O., & Kim, J. (2011). *First Report of Botrytis cinerea as a Postharvest Pathogen of Blueberry in Korea. Mycobiology, 39(1), 52*. doi:10.4489/myco.2011.39.1.052
- Leonetti, P., Zonno, M. C., Molinari, S., & Altomare, C. (2017). *Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in Trichoderma harzianum-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode Meloidogyne incognita. Plant Cell Reports, 36(4), 621–631*. doi:10.1007/s00299-017-2109-0
- Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. (2002). *Biology of killer yeasts. International Microbiology, 5(2), 65–71*. doi:10.1007/s10123-002-0066-z
- Maung, C. E. H., Baek, W. S., Choi, T. G., & Kim, K. Y. (2021). *Control of grey mould disease on strawberry using the effective agent, Bacillus amyloliquefaciens Y1. Biocontrol Science and Technology, 31(5), 468–482*. doi:10.1080/09583157.2020.1867707
- Pereira, H. C. (1993). *Food production and population growth. Land Use Policy, 10(3), 187–190*. doi:10.1016/0264-8377(93)90013-z
- Pfordt, A., Schiwiek, S., Karlovsky, P., & von Tiedemann, A. (2020). *Trichoderma Afroharzianum Ear Rot—A New Disease on Maize in Europe. Frontiers in Agronomy, 2*. doi:10.3389/fagro.2020.547758
- Rana, K. L., Kour, D., Yadav, A. N., Yadav, N., & Saxena, A. K. (2020). *Agriculturally important microbial biofilms: Biodiversity, ecological significances, and biotechnological applications. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms, 221–265*. doi:10.1016/b978-0-444-64279-0.00016-5
- Ranasinghe, L., Jayawardena, B., & Abeywickrama, K. (2002). *Fungicidal activity of essential oils of Cinnamomum zeylanicum (L.) and Syzygium aromaticum (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. Letters in Applied Microbiology, 35(3), 208–211*. doi:10.1046/j.1472-765x.2002.01165.x
- Raspor, P., Miklič-Milek, D., Avbelj, M., & Čadež, N. (2010). *Biocontrol of Grey Mould Disease on Grape Caused by Botrytis cinerea with Autochthonous Wine Yeasts. Food Technology & Biotechnology, 48(3)*.

- Raveau, R., Fontaine, J., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods*, 9(3), 365. doi:10.3390/foods9030365
- Righini, H., Francioso, O., Di Foggia, M., Quintana, A. M., & Roberti, R. (2020). Preliminary Study on the Activity of Phycobiliproteins against *Botrytis cinerea*. *Marine Drugs*, 18(12), 600. doi:10.3390/md18120600.
- Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., Galvan, A. I., Córdoba, M. G., Casquete, R., Serradilla, M. J., & Martín, A. (2020). *Selection and application of antifungal VOCs-producing yeasts as biocontrol agents of grey mould in fruits. Food Microbiology*, 92, 103556. doi:10.1016/j.fm.2020.103556
- Soylu, E. M., Kurt, Ş., & Soyly, S. (2010). *In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent Botrytis cinerea. International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 183–189. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08
- Spoel, S. H., Johnson, J. S., & Dong, X. (2007). *Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18842–18847. doi:10.1073/pnas.0708139104
- Van Kan, J. A. L. (2005). *INFECTION STRATEGIES OF BOTRYTIS CINEREA. Acta Horticulturae*, (669), 77–90. doi:10.17660/actahortic.2005.669.
- Wahab, H. A., Malek, A., & Ghobara, M. (2020). Effects of Some Plant Extracts, Bioagents, and Organic Compounds on *Botrytis* and *Sclerotinia* Molds. *Acta Agrobotanica*, 73(2).
- Xu, X., Robinson, J., Jeger, M., & Jeffries, P. (2010). *Using combinations of biocontrol agents to control Botrytis cinerea on strawberry leaves under fluctuating temperatures. Biocontrol Science and Technology*, 20(4), 359–373. doi:10.1080/09583150903528114
- Zambonelli, A., D'Aulerio, A. Z., Severi, A., Benvenuti, S., Maggi, L., & Bianchi, A. (2004). *Chemical Composition and Fungicidal Activity of Commercial Essential Oils of Thymus vulgaris L. Journal of Essential Oil Research*, 16(1), 69–74. doi:10.1080/10412905.2004.9698653

ANEXOS

ANEXO 1. MICROSCOPIA DE BOTRYTIS CINEREA

La microscopía se llevó a cabo por el método de la cinta adhesiva. De esta forma, se colocó la cinta con micelos adheridos a un portaobjetos con un gota de azul de metileno. Varias placas se observaron con el aumento de 40X en un microscopio de la marca Leica con serie ICC50 E y se midieron las estructuras correspondientes con el programa Leica Application Suite (LAS EZ) versión 3.4.0. Como resultado, se determinó que el hongo observado poseyó los rasgos morfológicos característicos de *Botrytis spp.* Además, las dimensiones de estas estructuras fueron: $26.98 \pm 4.28 \mu\text{m}$ de largo de los conidióforos y 26.98 ± 4.28 26.98 ± 4.28 μm para el largo y ancho de los conidióforos respectivamente, lo que coincidió con los rasgos establecidos por Kwon y colaboradores (2011) para *Botrytis cinerea*.

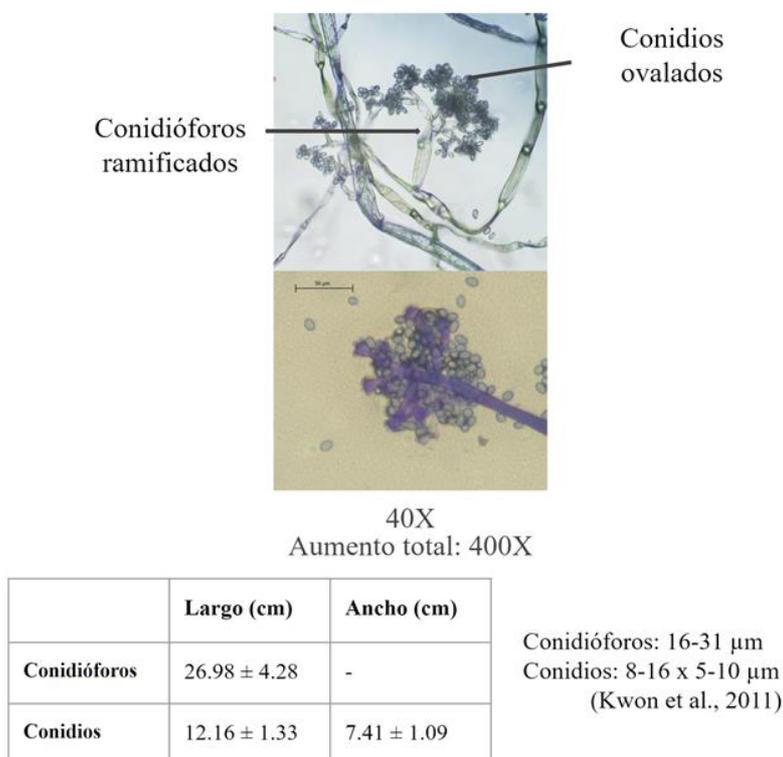


Figura A. Imágenes obtenidas de la microscopía en conjuntos con las dimensiones de las estructuras.

ANEXO 2. OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE EFICACIA DE BIOFUNGICIDAS.

Se definió que el diámetro de infección es significativamente menor en los 3 pétalos más externos de la flor. Por este motivo, se descartaron los primeros tres pétalos y se usaron los 10 siguientes para los bioensayos. Además, dado que no hubo diferencia significativa entre los pétalos de las 4 diferentes rosas, se determinó que no sería estrictamente necesaria una aleatorización de los pétalos de rosa. Sin embargo, con propósitos de estandarización si se aleatorizan los pétalos en los bioensayos de esta investigación. Por último, tanto la regla como ImageJ permiten estimar de forma similar el diámetro de la lesión.

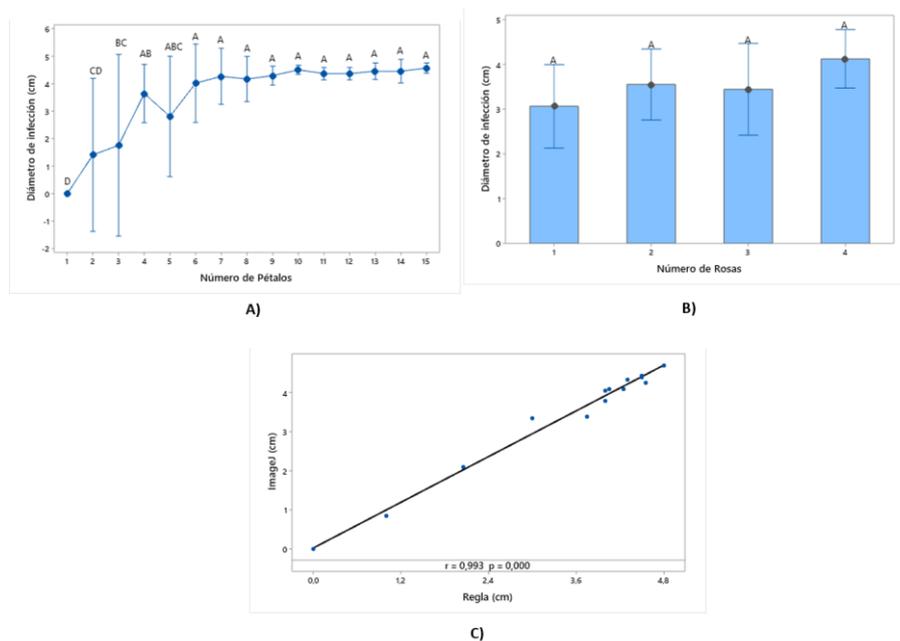


Figura A. Gráficos de análisis de optimización

Descripción: La gráfica A indica la evaluación del grado de infección según el número de pétalo en un botón de rosa. El gráfico B señala el grado de infección en diferentes botones de rosa. El gráfico C expone la correlación entre los dos métodos de medición de diámetro propuestos. Las letras iguales indican que hubo diferencia significativa entre tratamiento considerando $p \geq 0.05$. Para cada ensayo el número de réplicas fue de $n = 4$.

ANEXO 3. DISPOSICIÓN DE CONTROLES Y TRATAMIENTOS EN LA CÁMARA HÚMEDA.

Se determinó el orden de los tratamientos y controles según los resultados de la optimización. De esta manera, se colocó primero el C+, luego el C- y, a continuación, tres diferentes dosis de un tratamiento. Por último, el control interno correspondiente al fungicida comercial Switch, se probó simultáneamente en una caja separada. Así, se garantizó que los controles y los tratamientos tuvieran las mismas condiciones.

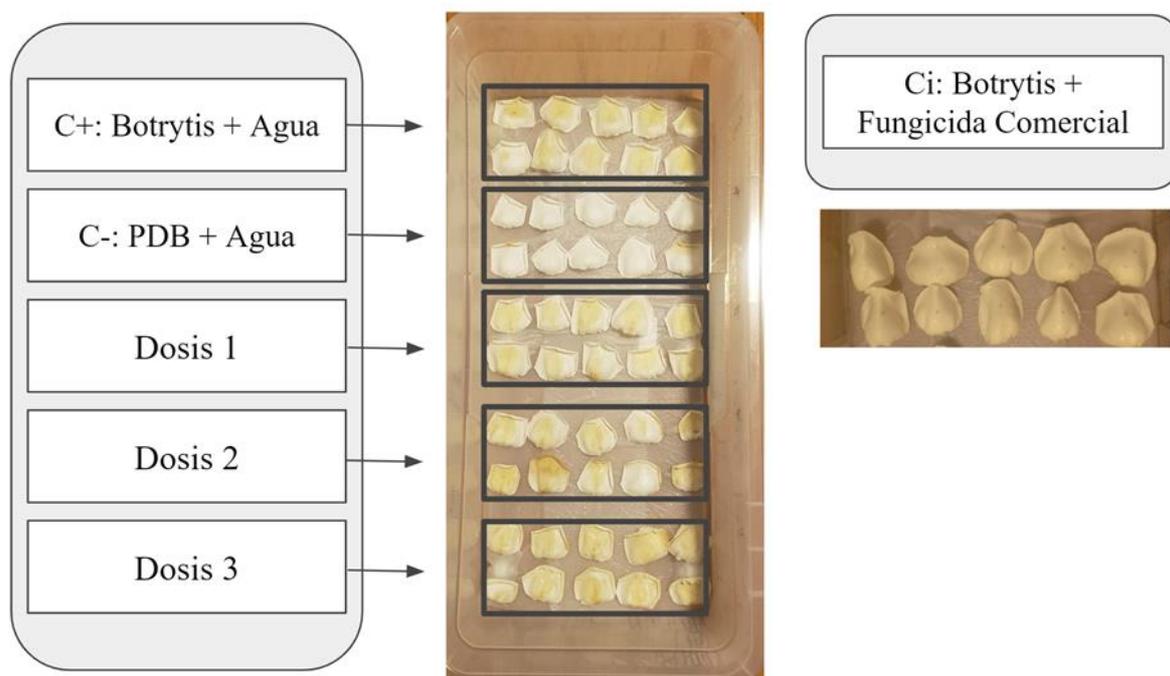


Figura B. Diagrama de la disposición de controles y tratamientos.