



Evaluación de tres desinfectantes contra el moho gris causado por *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosa

Evaluation of three disinfectant cleaners against gray mould caused by *Botrytis cinerea* in rose cultivation

Paulo Germán García Murillo¹

Para citar: García, G. (2018). Evaluación de tres desinfectantes contra el moho gris causado por *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosa. *Redes de Ingeniería*, 9(1), 39-45, doi: <https://doi.org/10.14483/2248762X.13882>.

Recibido: 28-septiembre-2018 / **Aprobado:** 21-noviembre-2018

Resumen

El agente causal del moho gris *Botrytis cinerea* es uno de los principales hongos fitopatógenos limitantes en la producción del cultivo de rosa, por lo cual es necesaria la aplicación de productos para una adecuada desinfección de herramientas, enseres, equipos y superficies, evitando de esta forma su diseminación. El objetivo de la presente investigación es evaluar tres desinfectantes comerciales —Désogerme Végétaux[®], Désogerme Microserre[®] y Pursue[™]— contra *B. cinerea* en el cultivo de rosa. En la evaluación *in vitro* se determinó que los tres productos reducen significativamente el crecimiento del fitopatógeno, los dos primeros productos retardan el crecimiento hasta las 120 horas y 72 horas respectivamente. Con respecto a la evaluación *in vivo* realizada en tallos de rosa, se observó que el producto Désogerme Microserre[®] presenta una eficacia del 95% a las seis horas contra *B. cinerea*, por lo cual fue el que brindó un mejor control del moho gris en el cultivo de rosa.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, desinfectantes, moho gris, rosa.

Abstract

The causal agent of gray mould *Botrytis cinerea* is one of the main phytopathogenic fungi limitations in the production of roses. Therefore, it is necessary to apply cleaner products for an adequate disinfection of tools, appliances, equipment and surfaces and thus avoid its dissemination. The aim of this research is to evaluate three commercial disinfectant cleaners: Désogerme_Végétaux[®], Désogerme_Microserre[®] and Pursue[™] against *B. cinerea* in the production of roses. An *in vitro* assessment conducted determined that the three commercial disinfectant cleaners significantly reduce the growth of the phytopathogen. In fact, the first two disinfectant cleaners retard the growth of mould up to 120 hours and 72 hours respectively. An *in vivo* assessment conducted in rose stems determined that the product Désogerme_Microserre[®] presents an 95% efficiency against *B. cinerea* up to 6 hours after the product application consequently it was the best gray mould control in rose cultivation.

Keywords: *Botrytis cinerea*, disinfectants, gray mold, rose.

1. Magíster en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Docente de Tiempo Completo, Universidad Santo Tomas. Correo electrónico: pggarciam@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

Colombia es el segundo país exportador de flores de corte en el mundo, aportando un 4% de las rosas consumidas a nivel mundial [1]; sin embargo, la producción de rosas se ve constantemente limita por plagas y enfermedades. Dentro de las más representativas por causar grandes pérdidas en la producción de flores, y en especial de la rosa, se encuentra el moho gris, causado por el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., con amplia distribución geográfica y con capacidad de atacar más de 200 especies vegetales entre ornamentales, frutas y hortalizas [2].

En el cultivo de la rosa, la ausencia o poca periodicidad de podas sanitarias pueden predisponer la acumulación de material senescente, que son fuente potencial del inóculo de *B. cinerea* [3]; igualmente, al no retirar los restos de material vegetal de las camas de cultivo de rosa se predispone la formación de esclerocios de *B. cinerea*, los cuales posteriormente pueden infectar diferentes órganos de la planta [4]. En los procesos de la cosecha, transporte y el almacenamiento en la poscosecha, se pueden causar daños mecánicos que también favorecen la entrada de este fitopatógeno, por lo que se requieren medidas de tratamiento en los sitios de corte, almacenamiento y para los enseres propios de los procesos de clasificación y empaque de la rosa [4].

En algunos casos se han empleado fungicidas de origen sintético en tratamientos poscosecha mediante la inmersión o microaspersión de la flor, pero estos productos generan residualidad, acompañados del riesgo sobre la salud humana [5]. Ante tal problemática se pueden utilizar alternativas para el tratamiento de las rosas en la poscosecha y la desinfección de herramientas, superficies, herramientas y equipos como los desinfectantes con amonios cuaternarios, los cuales son menos contaminantes y representan un riesgo bajo para la salud humana en comparación con los fungicidas tradicionales [6].

El objetivo principal de la presente investigación es la evaluación de tres productos desinfectantes, Désogerme Végétaux® y Désogerme Microserre® y Pursue™, contra *B. cinerea* en el cultivo de rosa en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

La eficacia de los tres productos contra *B. cinerea*, fue realizada para todos *in vitro*, e *in vivo* únicamente para los productos Désogerme Végétaux® y Désogerme Microserre® (Tabla 1); las dos pruebas fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Santo Tomas en la sede principal ubicada en Bogotá D.C.

Tabla 1. Productos a base de amonios cuaternarios evaluados *in vitro* e *in vivo* contra *B. cinerea*.

Producto	Ingrediente Activo	Dosis ml*l ⁻¹
Pursue™	Cloruro Dimonio Dicaprilil, Cloruro de benzalconio, Metasilicato de sodio, Alcohol	1,0
Désogerme Végétaux®	Cloruro de amonio benzil dimetil alquil, Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB)	1,5
Désogerme Microserre®	Cloruro de amonio benzil dimetil alquil, Glutaraldehido,	1,0

Fuente: elaboración propia.

Los desinfectantes fueron preparados en agua destilada estéril, en las dosis recomendadas por sus respectivas fichas técnicas (Tabla 1). Para la realización de las pruebas *in vivo* se prepararon 20 ml de cada producto, lo anterior con el fin de su posterior aplicación a los tallos de rosa de la variedad Forever Young.

Microrganismo causante del moho gris

El aislamiento utilizado tanto en la prueba *in vitro* como *in vivo* fue suministrado por la colección de microorganismos del programa de Administración Ambiental y de los Recursos Naturales, adscrito a la Facultad de Ciencias y Tecnologías de la

Universidad Santo Tomas; este patógeno se mantuvo en cajas de Petri con medio Sabouraud Dextrosa Agar (Oxoid), hasta el momento del montaje de los mencionados ensayos.

Material vegetal

Las rosas de la variedad mencionada (tipo exportación), fueron obtenidas en la plaza de Paloquemado en Bogotá D.C., Colombia.

Se utilizaron tallos tiernos de rosa de la variedad Forever Young con botones florales, 15 cm de longitud aproximadamente, para la realización de las pruebas de eficacia de los desinfectantes *in vivo*, seleccionados previamente en la prueba *in vitro* contra *B. cinerea*. Antes de la realización de las pruebas, los tallos fueron lavados con detergente y el exceso se lavó con abundante agua; posteriormente fueron depositados en una solución de hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) al 1,0 % y nuevamente enjuagados con abundante agua destilada estéril, esto para eliminar posibles residuos de hipoclorito. Luego de lo anterior, se cortaron los primeros 5 cm de los tallos a partir de botón floral, estos fueron inmediatamente puestos en láminas de poliestireno (10cm x 20 cm x 1,0 cm) con la parte más tierna hacia arriba, siendo colocadas en contenedores de plástico (24 cm x 24 cm x 10 cm) a manera de cámara húmeda. A estos contenedores previamente se les adicionó agua destilada estéril hasta completar 1 cm de profundidad, las cámaras húmedas fueron almacenadas en el laboratorio a 20 °C hasta el momento del montaje del ensayo.

Elaboración de inóculo de *B. cinerea*

Se tomaron cajas Petri con *B. cinerea* creciendo en medio de Sabouraud Dextrosa Agar (Oxoid) con doce días, a las cuales se les adicionó 12 ml de agua destilada estéril más Tween 80 (0,01%). Se preparó una suspensión de 20 ml de conidios previamente filtrada a través de una tela de algodón estéril, lo que permitió la separación de los

conidios del micelio, cuya concentración se determinó mediante una cámara de Neubauer, ajustándose está a 1×10^4 conidios* ml^{-1} , estandarizada en una prueba de patogenicidad previamente hecha en tallos de rosa (variedad Forever Young).

Prueba de eficacia *in vitro*

Para esta prueba se tomaron diez cajas de Petri con medio Sabouraud Dextrosa Agar (Oxoid), pero con adición de los desinfectantes en las dosis mencionadas en la Tabla 1; se establece entonces un tratamiento control con cajas, con el medio de cultivo, pero sin adición de ningún producto. Cada una de las cajas petri, con y sin adición de los desinfectantes, se inocularon con un disco de 5,0 mm del aislamiento de *B. cinerea* para su posterior incubación a 20°C, registrándose el diámetro de colonia del hongo cada veinticuatro horas hasta las 144 horas, momento en que *B. cinerea* cubrió el 100% de las cajas de Petri en el tratamiento control.

Para este ensayo se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado, con diez repeticiones para cada tratamiento (desinfectante) y el control. A partir los registros de los diámetros de colonia obtenidos a las 144 horas se realizó un análisis de varianza para, posteriormente, hacer una comparación de medias mediante la prueba de diferencia mínima significativa DMS ($p \leq 0,05$). En la realización del análisis estadístico se empleó *software* Statgraphics® Centurion XVI.

Prueba de antagonismo *in vivo*

A los tallos puestos en los contenedores plásticos se les aplicó la prueba desde una micropipeta 25 μl con los desinfectantes (D. Végétaux® y D. Microserre®), además de agua destilada estéril para el caso del control. Para cada tratamiento y control se utilizaron treinta tallos (diez por cada repetición) de rosa de la variedad Forever Young; todos los tallos tratados fueron nuevamente colocados en las cámaras húmedas por 48 horas y almacenados a 20 °C.

Después de cumplido el periodo de tiempo señalado todos los tallos fueron inoculados con una suspensión de 25 μ l *B. cinérea*, posteriormente fueron puestos de nuevo en las cámaras húmedas a la misma temperatura, observándose estos cada veinticuatro horas mientras se registraba la longitud de lesión (síntomas) y la longitud de esporulación de *B. cinerea* (signos) en los dos tratamientos y el control desde su aparición. Se empleó un diseño completamente aleatorizado. Para el análisis correspondiente a los promedios en todos los tallos de rosa de la longitud de lesión, como de la esporulación observados desde el día cinco al doce, se calculó el área bajo la curva del progreso enfermedad (ABCPE) de acuerdo con (1) [7].

$$ABCPE = \sum \left[\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right] * (t_{i+1} - t_i) \quad (1)$$

Siendo y_i la medida de la longitud de lesión o esporulación de la enfermedad (severidad) en la $i^{\text{ésima}}$ observación, t es la unidad de tiempo (días) y n el total de observaciones para cada tratamiento (desinfectantes) y el control; lo anterior con el propósito de determinar el avance de la enfermedad (síntomas y signos) en todos los tallos de rosa producida por la inoculación de *B. cinerea*.

A partir de los resultados de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), de la longitud de lesión como de la esporulación producidos por *B. cinérea*, se realizó un análisis de varianza, comparando los promedios de los tratamientos y el control mediante la prueba de medias de diferencia mínima significativa (DMS, $p \leq 0,05$). En esta prueba también se utilizó para el análisis estadístico la ayuda del software Statgraphics® Centurion XVI.

Adicionalmente se calculó el porcentaje de eficacia a los seis y doce días a partir de los promedios de las longitudes de lesión producidas por *B. cinerea*, obtenidos para cada uno de los desinfectantes preseleccionados en la prueba *in vitro*, basados en la fórmula (2) [8].

$$\text{Porcentaje_d_eficacia} = ((A - B) / A) * 100 \quad (2)$$

Donde A es la longitud de lesión de *B. cinerea* en los tallos del control a los seis y doce días, y B es la longitud de lesión de *B. cinerea* para los tallos de cada tratamiento (desinfectantes) a los seis y doce días.

RESULTADOS

En la evaluación *in vitro* se evidenció que a las 144 horas hubo una reducción estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) de los diámetros de colonia de *B. cinerea*, por efecto de los tres desinfectantes, en comparación con el control (Tabla 2). Siendo el tratamiento correspondiente al producto Pursue el que presentó el mayor de diámetro del hongo, seguido del producto Désogerme Microserre. El producto Désogerme Végétaux fue el que presentó los menores valores de promedios de diámetros, los cuales fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Tabla 2. Crecimiento *in vitro* a las 144 horas de *B. cinerea*.

Producto	Crecimiento (cm)
Control	8,4 a
Pursue	3,5 b
D. Microserre	2,6 c
D. Végétaux	1,5 d

Fuente: elaboración propia.

Nota: letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de comparación de media de diferencia mínima significativa DMS ($p \leq 0,05$).

Los cultivos correspondientes al tratamiento Pursue presentaron valores de diámetro promedio de colonia de 1.66 cm a las 48 horas; en contraste, los cultivos del hongo fitopatógeno correspondiente a la adición del producto D. Microserre solo presentaron un crecimiento promedio 1.40 cm de diámetro de colonia del hongo hasta las 72 horas. Para el caso de D. Végétaux se presentaron valores promedio de 1.50 cm hasta las 120 horas, razón por la cual se seleccionaron los dos últimos dos productos para la realización de las pruebas en tallos de rosa (Figura 1).

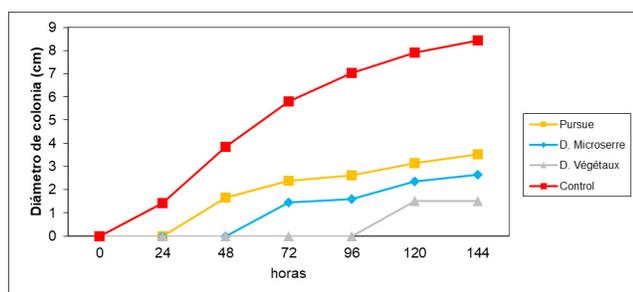


Figura 1. Crecimiento de *B. cinerea* a través del tiempo en un modelo de evaluación *in vitro* en presencia de tres desinfectantes.

Fuente: elaboración propia.

Al observar los resultados, los dos desinfectantes evaluados reducen claramente la longitud de lesión, los cuales alcanzan en el día doce valores para el caso de D. Microserre de 0.64 cm y de 1.42 cm para el producto D. Végétaux, en contraste con los valores promedio alcanzados en el día doce para el control, siendo estos de 3,0 cm (Figura 2).

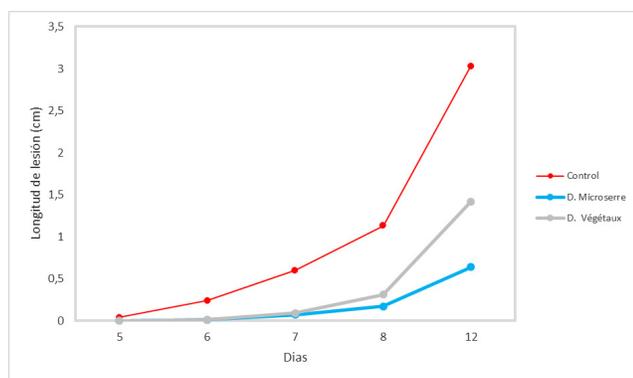


Figura 2. Longitud de lesión producida por *B. cinerea* a través de tiempo en una prueba *in vivo* en presencia de dos desinfectantes.

Fuente: elaboración propia.

Esta tendencia también se observa en los resultados de los promedios de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) producidos por *B. cinerea*, en la cual los valores de ABCPE son significativamente mayores para el control al ser comparados con los obtenidos de los productos D. Microserre y D. Végétaux, los cuales no presentaron diferencias

estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) como se observa en la Figura 3.

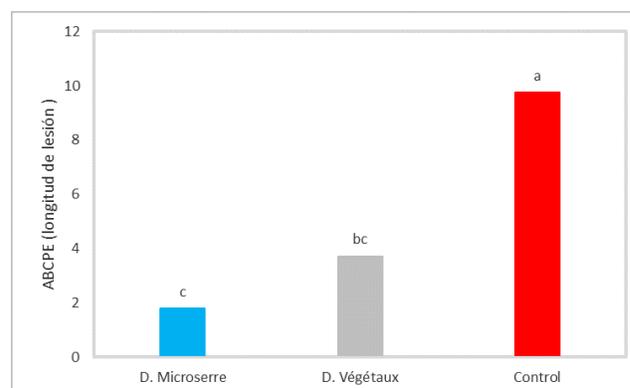


Figura 3. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), correspondiente a la longitud de lesión (cm).

Fuente: elaboración propia.

Nota: Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (DMS, $p \leq 0,05$).

Al evaluar la longitud de esporulación causada por *B. cinerea* se puede observar que a los doce días el tratamiento control presenta valores promedio de 2.3 cm, los cuales son superiores a los obtenidos con los productos D. Végétaux y D. Microserre que alcanzaron valores de 0,70 y 0,40 cm respectivamente (Figura 4).

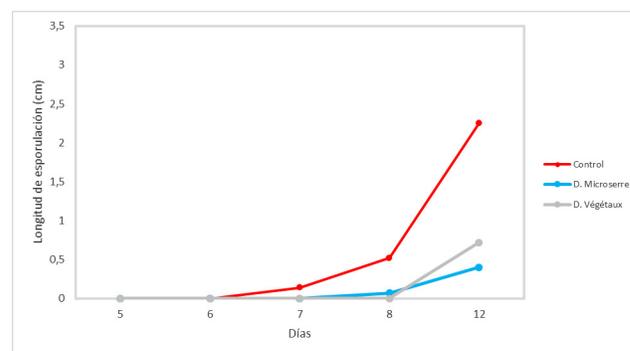


Figura 4. Longitud de la esporulación producida por *B. cinerea* a través de tiempo en tallos de rosas.

Fuente: elaboración propia.

Los valores de ABCPE correspondientes a la longitud de esporulación presentan, acorde con lo anteriormente presentado, valores significativamente mayores en el control, en comparación con los

observados de los dos desinfectantes; sin embargo, estos productos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí en cuanto a sus valores promedios de ABCPE (Figura 5).

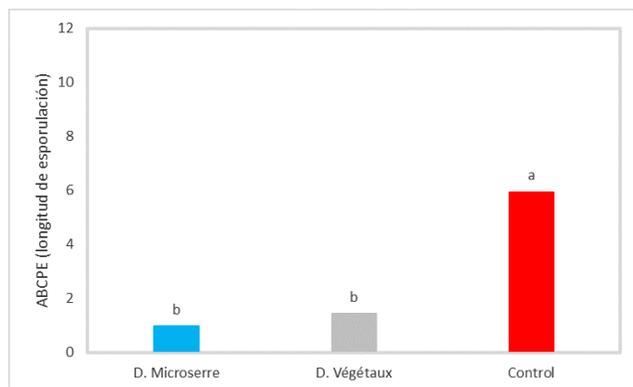


Figura 5. Área baja la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), correspondiente a la longitud de la esporulación (cm).

Fuente: elaboración propia.

Nota: Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (DMS, $p \leq 0,05$).

En la Tabla 3 se observan los valores de eficacia para los dos desinfectantes evaluados a los seis días, los cuales son altos y restringen la manifestación de síntomas y signos del moho gris en los tallos de rosa; sin embargo, a los doce días la eficacia de los productos evaluados empezó a disminuir de forma importante, en especial para el producto Désogerme Végétaux.

Tabla 3. Porcentajes de eficacia in vivo de dos desinfectantes contra *B. cinerea*.

Producto	Seis días	Doce días
Désogerme Végétaux	95,0	53,1
Désogerme Microserre	95,0	79,0

Fuente: elaboración propia.

DISCUSIÓN

Los tres desinfectantes utilizados en las pruebas *in vitro* reducen significativamente el crecimiento de *B. cinerea*, ya que estos son a base de amonios cuaternarios, los cuales son comúnmente utilizados como fungicidas, bactericidas y viricidas; pueden desnaturalizar las proteínas constitutivas de los

microorganismos mencionados, afectan la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo energético y desestabilizan algunas moléculas de la membrana celular [9]. Sin embargo, los desinfectantes Désogerme Microserre y Désogerme Végétaux, fueron los que más retrasaron el crecimiento de *B. cinerea* en el ensayo *in vitro*, esto se puede explicar debido a que resisten cargas proteínicas altas, las cuales estaban presentes en el medio Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid); este último presenta dentro de su composición peptona, compuesto rico de estas moléculas, siendo esta condición la que pudo interferir con el cloruro de benzalconio, ingrediente activo del producto Purseu [6].

En las pruebas con tallos de rosas los dos desinfectantes presentaron a los seis días altos valores de eficacia que decayeron a los doce días, especialmente con el desinfectante Désogerme Végétaux, a pesar de que ambos desinfectantes presentaban como ingrediente activo el amonio cuaternario de cuarta generación, cloruro de amonio benzil dime til alquil; sin embargo, el producto Désogerme Microserre posee además la molécula glutaraldehído, la cual permite una desinfección profunda y actúa especialmente sobre la viabilidad de los conidios de los hongos [10], como se pudo establecer en el crecimiento de longitud de lesión correspondiente al avance en esporulación de *B. cinerea* en el día doce, el cual fue inferior al observado con el producto Désogerme Végétaux en el mismo periodo de tiempo.

A pesar de que en la prueba *in vivo* el producto Désogerme Végétaux no mantuvo un alto nivel de control de *B. cinerea* a las doce horas, en la prueba de evaluación *in vitro* sí presentó alta inhibición de microorganismos patógenos, debido posiblemente a que uno de sus ingredientes activos —el cloridrato de polihexametileno biguanida (PHMB)—, ha sido descrito por tener excelente actividad contra una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos filamentosos y hongos levaduriformes, siendo particularmente efectivo contra bacterias del género *Pseudomonas* que son difíciles de controlar

[11]. Por otra parte, este agente químico, además de presentar un amplio espectro de control de microorganismos en comparación con los ingredientes activos convencionales, es muy eficaz para la desinfección de infraestructuras utilizadas en los sistemas de producción cervicero y de otras bebidas [12].

CONCLUSIONES

Los desinfectantes que presentaron mayor inhibición del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*, fueron los desinfectantes Désogerme Microserre y Désogerme Végetaux, de los cuales el primero redujo por mayor tiempo los síntomas y signos producidos a raíz del moho gris en tallos de rosa a una dosis de $1.0 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, por lo que se podría emplear este producto para la desinfección de tijeras en las labores de podas especialmente relacionadas con extracción de tocones y otro material infectado en las camas de cultivo. Su uso se podría también emplear en poscosecha y labores de desinfección de superficies tales como mesas de clasificación de la rosa, cuartos fríos y enseres relacionados con este proceso.

REFERENCIAS

- [1] Cámara de Comercio de Bogotá, *Flores y follajes*. Bogotá D.C.: Cámara de Comercio, 2015.
- [2] J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W.R. Jarvis, *The biology of botrytis*. London: Academic Press, 1980.
- [3] G. S. Molina, M. C. Forero y E. Torres, "Incidencia de infecciones quiescentes de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.)," *Agronomía Colombiana*, vol. 22, no. 2, pp. 101–109, 2004.
- [4] A. E. Araújo, L. A. Maffia, E. S. G. Mizubuti, A. C. Alfenas, G. De Capdeville, and J. A. S. Grossi, "Survival of *Botrytis cinerea* as mycelium in rose crop debris and as sclerotia in soil," *Fitopatología Brasileira*, vol. 30, no. 5, pp. 516–521, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000500009>
- [5] R. Benítez, "Plaguicidas y efectos sobre la salud humana: un estado del arte". [En línea]. Disponible en: <http://www.serpajpy.org/wp-content/uploads/2014/03/Plaguicidas-y-efectos-sobre-la-salud-humana1.pdf>
- [6] A. Diomedi *et al.*, "Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología," *Revista Chilena de Infectología*, vol. 34, no. 2, pp. 156–174, 2017. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000200010>
- [7] L. V. Campbell and C. L. Madden, *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York: Wiley, 1990.
- [8] M. H. Jijakli and P. Lepoivre, "Characterization of an Exo-beta-1,3-Glucanase Produced by *Pichia anomala* Strain K, Antagonist of *Botrytis cinerea* on Apples.," *Phytopathology*, vol. 88, no. 4, pp. 335–343, 1998. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.4.335>
- [9] Secretaría Distrital de Salud, "Limpieza y desinfección de equipos y superficies ambientales en instituciones prestadoras de servicios de salud". [En línea]. Disponible en <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIH/Limpieza%20y%20Desinfecci%C3%B3n%20de%20Equipos%20y%20Superficies.pdf>
- [10] R. Vignoli, "Esterilización y desinfección". [En línea]. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2027.pdf>
- [11] European Commission, "The Scientific Committee on Consumer Safety of the European Commission, Opinion on the safety of poly(hexamethylene) biguanide hydrochloride (PHMB)". [En línea]. Disponible en: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_157.pdf
- [12] P. D. Santos and P. H. S. Fernandes, "Utilização de Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB) na desinfeção de indústrias cervejeiras", *Revista TECCEN*, vol. 3, pp. 59–67, 2010. <https://doi.org/10.21727/teccen.v3i1.242>

