Universidad Politécnica de Madrid

Escuela Superior Técnica de Ingenieros Agrónomos

Estudio de la diversidad genética de *Botrytis* sp en orquídeas y la
resistencia al ataque del hongo

TESIS DOCTORAL

Jacqueline Elizabeth Rojas Rojas

Ingeniero Agrónomo

2016

Universidad Politécnica de Madrid

Escuela Técnica Superior de Ingeniero Agrónomos

Departamento de Biología

Tesis Doctoral:

Estudio de la diversidad genética de *Botrytis* sp en orquídeas y la resistencia al ataque del hongo.

Autor:

Jacqueline Elizabeth Rojas Rojas

Directores:

Dr. Cesar Pérez Ruiz
Doctor en Ciencias Biológicas

Dra. María Luisa Tello Mariscal
Doctor en Ingeniería Agronómica

RECONOCIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis se ha realizado en los laboratorios de Sanidad Vegetal y Biología Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja-Ecuador; y en el laboratorio de patología vegetal del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA).

Quisiera agradecer a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo:

Dra. María Luisa Tello, por su acertada ayuda en el desarrollo de la presente investigación.

Dr. Cesar Pérez Ruiz, por su dirección y constante apoyo en la formación.

Dr. Roland Kirschner, por ceder una muestra de *Botrytis* obtenida en Jardín botánico de Tailandia.

A la empresa Ecuagenera por permitirme realizar los muestreos en sus invernaderos.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Cesar Pérez Ruiz y María Luisa Tello, quienes han sido el pilar científico de este trabajo; investigar con ustedes ha sido un gran privilegio, Marisa, muchas gracias por toda tu ayuda, por tu tiempo, paciencia y por tus enseñanzas; no solo que he aprendido temas científicos sino también a saber expresar literalmente mis conocimientos, ideas, reflexiones.

Al Dr. Cesar Pérez, por su apoyo incondicional como director de tesis por sus aportes muy valiosos y como director del programa doctoral deposito su confianza en quienes somos parte de la Universidad Técnica Particular de Loja y su constante apoyo.

A las autoridades de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), por impulsar la formación doctoral de quienes somos parte de dicha institución y por emprender la investigación para el desarrollo ecuatoriano; en especial al Dr. Luis Miguel Romero, ex Rector-Canciller de la UTPL quien me incentivó para iniciar con este proceso y ha sido el pilar fundamental para el desarrollo investigativo en la UTPL.

A mis compañeros del Departamento de Ciencias Agropecuarias y de Alimentos de la UTPL, quienes me han apoyado incondicionalmente durante todo el tiempo que ha tomado el desarrollo de este trabajo, especialmente por su valiosa ayuda en la fase de campo. Al Departamento de Ciencias Naturales (UTPL), de manera especial a Darío Cruz por su paciencia para enseñarme el campo de la Biología molecular. A Vivian y Karina, por ser parte importante en el desarrollo de este trabajo. A Lucia y Leticia por estar siempre a mi lado en los momentos bueno y malos de este camino.

Un agradecimiento muy especial a mi familia, mis padres por ser mis mentores y por su gran amor, a mis hijos Joseph y Sofía por ser el motor que me impulsa

seguir día a día, mi esposo por su paciencia y amor, mi incondicional hermano (Manuel) uno de los pilares fundamental en la realización de este trabajo, por su paciencia y apoyo constante.

A la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de Ecuador (SENESCYT), por el apoyo económico brindado a mi persona mediante una beca parcial de doctorado.

Contenido

RECONOCIMIENTOS.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	viii
 I. INTRODUCCION	 1
 1. INTRODUCCION GENERAL Y ANTECEDENTES.....	 2
1.1. LAS ORQUIDEAS COMO RECURSO FITOGENETICO.....	2
1.2. GENERO <i>BOTRYTIS</i>	6
 II. OBJETIVOS	 31
 III. MATERIALES Y METODOS GENERALES	 35
 3.1. Medios de cultivos.....	 36
3.2. Ubicación del ensayo	37
3.3. Toma de muestras	37
3.4. Aislamiento de <i>Botrytis</i>	38
3.5. Identificación del hongo	39
3.6. Caracterización molecular.....	42
3.6.1. Extracción de ADN.....	42
3.6.2. Cuantificación de ADN.....	42
3.6.2. Ampliaciones de las regiones ITS.....	43
3.6.3. Purificación de los amplicones.....	43
3.6.4. Secuenciación de los amplicones	44
3.7. Estudio de poblaciones mediante la técnica SSR.....	44
3.8. Patogenicidad de los hongos	46
3.9. Análisis estadístico	47
3.10. Análisis de resultados SSR de ADN	48

IV. RESULTADOS.....	49
4.1. Aislamiento e identificación de <i>Botrytis</i>	50
4.1.1.. Descripción de síntomas.....	51
4.2. Caracterización morfológica y fenotípica	54
4.2.1. Análisis de agrupamientos de los aislados de <i>Botrytis</i>	54
4.2.2. Micelio.....	58
4.2.3. Células conidiógenas y conidios.....	59
4.2.4. Fase teleomorfa	64
4.2.5. Esclerocios	66
4.2.6. Germinación de conidios	68
4.3. Efecto de la temperatura en el crecimiento micelar.....	72
4.3.1. Tasa diaria de crecimiento micelar.....	72
4.4. Correlación entre los caracteres morfológicos y fisiológicos con análisis de componentes principales de caracteres (ACP).....	84
4.5. Pruebas de patogenicidad	87
4.6. Identificación molecular.....	89
4.6.1. Análisis molecular con SSR de los aislados de <i>Botrytis</i>	92
4.6.1.1. Análisis de similaridad y agrupamiento.....	92
V. DISCUSION	100
VI. CONCLUSIONES	108
VII. BIBLIOGRAFIA	111
VIII. ANEXOS	121

RESUMEN

En la actualidad la mayoría de plantas sufren pérdidas debido a las enfermedades que les provocan los hongos. Uno de estos grupos amenazado por el ataque de los hongos son las especies de la familia Orchidaceae, especies que se encuentran amenazadas y con numerosas especies en peligro de extinción. Uno de los problemas sanitarios más destacados es *Botrytis cinerea*, hongo patógeno cosmopolita, causante de enfermedades importantes en muchas plantas tales como frutas, verduras, accesiones de viveros, plantas ornamentales y huertos cultivos (Jarvis 1977; Elad *et al.*, 2007). Este género es uno de los grupos de hongos más ampliamente conocido y distribuido. Contiene 22 especies (Hennebert 1973; Yohalem *et al.*, 2003) y un híbrido (*B. allii*) (Yohalem & Alabama, 2003) vinculado a las etapas sexuales y un amplio número de huéspedes específicos (Beever y Weds, 2000); infecta más de 200 especies vegetales distintas (Williamson *et al.*, 2007).

Dada la importancia de este patógeno se realiza un estudio de caracterización morfológica y molecular del hongo, aislado de plantas de orquídeas cultivadas en condiciones de invernadero, de hortalizas y plantas frutales, con síntomas de necrosis, atizonamientos y pudriciones. El análisis de las características morfológicas (presencia de esclerocios, tamaño de conidios, presencia de estructuras sexuales *in vitro*) y fenotípicas (crecimiento micelial a diferentes temperaturas, germinación de esporas), nos permitió determinar características importantes del comportamiento del hongo y establecer cuáles son las mejores condiciones para su patogenicidad.

Se afianzo este trabajo con estudios moleculares a través del análisis de la región ribosomal ITS1-ITS4. Entre los aislados estudiados se identificaron dos especies diferentes, *Botrytis cinerea* y *B. fabiopsis*, esta última conocida como específica de *Vicia faba*, se lo aisló de una planta de *Pelargonium sp.* Se hizo un análisis filogenético para comparar estas dos especies, encontrándose que *B. fabiopsis*

está estrechamente relacionada con *B. cinerea* y *B. elliptica*, pero lejanamente relacionado con *B. fabae*.

Además, se analizó las poblaciones de los aislados de *Botrytis*, para ello se seleccionaron tres parejas de cebadores microsatelites con altos porcentajes de polimorfismo. Al analizar la similaridad entre los aislados se determinaron tres grupos de poblaciones de *B. cinerea* entre los cuales *Botrytis fabiopsis* comparte un grupo grande con *B. cinerea*.

La diferenciación genética no fue significativa entre la población de aislados de orquídeas y hortalizas, la diferencia génica que fue muy baja, lo que sugiere que la especificidad de *Botrytis* no está dada por los hospederos, aunque la posibilidad de la especificidad con algún cultivo no puede descartarse.

ABSTRACT

Most plants suffer diseases caused by fungi. Orchidaceae is one of the threatened groups with many endangered species. Included into the most important problems in plant health is *Botrytis cinerea*, a cosmopolitan pathogen which causes major diseases in many plants of agronomic interest such as fruits, vegetables, planthouses accessions and ornamental plants (Jarvis, 1977; Elad *et al*, 2007). The genus *Botrytis* is one of the most widely and disseminated fungi. The genus contains 22 species (Hennebert 1973; Yohalem *et al*, 2003) and a hybrid (*B. allii*) (Yohalem & Alabama, 2003) linked to the sexual stages of a large number of specific hosts (Beever & Weds, 2000); infects over 200 different plant species (Williamson *et al.*, 2007).

Due to the importance of this pathogen, a study of morphological and molecular characterization of the fungus was carried out. Fungi samples were isolated from orchid plants grown in greenhouse conditions, vegetables and fruits with signs of necrosis, blight and rotting. To establish the best conditions for pathogenicity, behavioral characteristics of the fungus were studied through the analysis of morphological characteristics (presence of sclerotia, conidia size, sexual structures in vitro) and mycelial growth at different temperatures.

To complete the characterization of the fungi, a molecular study was performed via the analysis of ribosomal ITS1-ITS4 region. Two different species were identified: *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabiopsis* (known by specificity to *Vicia faba*). *B. fabiopsis* was isolated from a plant of the genus *Pelargonium*. A phylogenetic analysis was carried out to compare these two species leading to the conclusion that *B. fabiopsis* is closely related to *B. cinerea* and *B. elliptica*, but distantly related to *B. fabae*.

The populations of *Botrytis* isolates were also analyzed. Three pairs of microsatellite primers with high percentages of polymorphism were selected. A similarity analysis showed three groups of populations of *B. cinerea*, including *Botrytis fabiopsis*.

The genetic differentiation was not significant among the populations of isolates from orchids and vegetables; genetic differences were very low, suggesting that the specificity of *Botrytis* species is not given by the hosts.

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION GENERAL Y ANTECEDENTES

1.1- LAS ORQUIDEAS COMO RECURSO FITOGENETICO

Figura 1. Flor de *Cattleya* luteola x *Sophrocattleya* Beauforty *Cattleya* lueddemannianna.

La república de Ecuador está considerada como uno de los sitios megadiverso, que, con un espacio pequeño de territorio reúne las condiciones geográficas y climáticas más importantes del planeta. Estos factores contribuyen a que la

capacidad de interacción entre organismos sea más grande. Es por esta razón que, como regla general, la riqueza de especies se incrementa conforme se aproxima desde el norte o el sur hasta la línea ecuatorial (Finding, 2010)

En el Ecuador se han registrado 148 familias y 744 géneros de plantas vasculares que incluyen especies endémicas, en el año 2000 se reportaron 4 011 especies de plantas endémicas en el país; doce años más tarde se reconocen 4500, representando el 58,3% de todas las familias y el 35% de todos los géneros nativos del país. El Ecuador posee 22 géneros de plantas endémicas, de los cuales 8 pertenecen a la familia Orquidaceae (Valencia *et al.*, 2000). La familia orquidaceae junto a otras 8 familias posee el más alto endemismo en el país junto a los helechos y representan casi el 70% de todas las especies endémicas del país (Valencia *et al.*, 2000).

El Ecuador posee probablemente la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial, debido principalmente a que nuestro país cuenta con una extensa variedad de microclimas que circunscriben especies en áreas muy restringidas, con características peculiares y muy específicas (Meisel y Woodward, 2005).

Las orquídeas son miembros de la familia Orchidaceae, probablemente es la familia más grande de las angiospermas (Dressler, 1993). Por años la gran diversidad y especialización en la morfología floral de las orquídeas ha fascinado a botánicos y coleccionistas (Zomlefer, 1994), considerado como uno de los grupos más grandes de plantas con flor. Se estima que hay entre 20.000 y 25.000 especies de orquídeas, que ocupan una amplia gama de hábitats ecológicos y de descubrimientos altamente especializados tanto morfológico, como estructural, así como las características fisiológicas (Dressler, 1990). Su distribución es amplia, pero su mayor diversidad, incluyendo las epífitas, se encuentra en los trópicos y especialmente en las montañas tropicales. Se estima una cantidad de 19.500 especies repartidas en 775 géneros, siendo el 73% epífitas (Hamer, 2001). Las

orquídeas son consideradas generalmente para responder a las variaciones en los procesos de los ecosistemas y los cambios.

Particularmente las orquídeas muestran una espectacular muestra de evolución, a través de la biología reproductiva. La producción de la columna (estructura fusionada de estambres y estilos) para facilitar la polinización está muy bien documentada y, la co-evolución de las flores de las orquídeas y sus polinizadores es bien conocida (Van der Pijil y Dodsons, 1956)

Actualmente, la familia Orchidaceae se encuentra amenazada y con numerosas especies en peligro de extinción, principalmente debido a dos factores: a) la depredación selectiva de especies por parte de colectores comerciales, la cual es influenciada por la exportación y la comercialización que deriva en extinciones a nivel local; y b) la destrucción masiva de hábitats, producto de la invasión intensiva de tierras debido a la extracción de madera, el pastoreo, quema, tala de bosques, proyectos hidroeléctricos, extracción minera y a la agricultura migratoria, que deforestan unas 30 000 hectáreas por año, exterminando flora y fauna nativa inclusive en áreas protegidas (Linington y Pritchard, 2001).

Considerando estos aspectos como importantes para la preservación de este grupo de plantas, en Ecuador se han iniciado con plantaciones a nivel comercial de orquídeas, y al ser este grupo, después de las rosas, uno de los productos más apreciados por su gran variedad de especies nativas, híbridos naturales e híbridos introducidos, ubicándolos como uno de los sectores más grandes de la exportación.

En la actualidad una empresa dedicada a la producción a gran escala de orquídeas para la exportación y a la conservación, sostiene que el promedio de ventas externas es de 40 mil plantas por año (El Agro, 2015), siendo Francia, Alemania, Estados Unidos y Japón los principales compradores de esta especie exótica.

Los cultivos de orquídeas en extensiones grandes en su mayoría tienden a tener problemas por los cuidados, excesos de riego y de fertilizantes que pueden convertirse en causantes de problemas sanitarios muy severos para este grupo de plantas, a diferencia de las especies de orquídeas en condiciones naturales que están adaptadas a condiciones duras y bajas fertilizaciones. Las condiciones de siembra controlada conllevan a aumentar la susceptibilidad de las plantas por los desequilibrios y desordenes que se producen en el desarrollo normal de las plantas (American Orchids Society, 2002).

Este trabajo se inició con estudios previos del ataque de los hongos a las plantas de orquídeas sembradas en invernaderos, que fue parte del trabajo de Diploma de Estudios Avanzados (DEA). Se realizó un diagnostico preliminar de los hongos que estaban causando enfermedades en las plantas de orquídeas sembradas bajo invernadero, del cual se identificó cuatro hongos importantes causando daños en las plantas: *Collectotrichum gloesporoides*, *Uredo* spp, *Alternaria* spp y *Botrytis cinerea*. Asimismo, se pudo determinar que las especies más atacadas por estos patógenos fueron las *Stanhopeas* sp, *Gongoras* sp, *Cyrtorchillum retosum* y *Draculas* (Sinchire & Rojas, 2014).

De los hongos anotados se identificó a *Botrytis* como el género con más ocurrencia entre las plantas hospederas, y que más daños causaba a las mismas; a partir de esto surge la necesidad de hacer un estudio sobre la diversidad poblacional de este hongo que ataca a las orquídeas y a ciertos cultivos que son de interés para la zona. *Botrytis cinerea* es conocido como hongo patógeno cosmopolita, causante de enfermedades importantes en muchas plantas tales como frutas, verduras, acciones de viveros, plantas ornamentales y huertos cultivos (Jarvis 1977; Elad *et al.*, 2007).

En Ecuador los estudios sobre *Botrytis* son pocos; se ha estudiado la interacción de genotipos de *Rosa* sp y *Botrytis cinerea* (Vinueza, 2011) y trabajos relacionados con el control biológico utilizando *Trichoderma* spp (Chimarro, 2013)

y control utilizando aceites esenciales de *Eucaliptus globulus* y *Allium sativum* (Aguirre, 2012).

1.2. GENERO *BOTRYTIS*

Figura 2. Flor de *Miltonia* sp, con síntomas de *Botrytis*

El género *Botrytis* es uno de los grupos de hongos más ampliamente conocido y distribuido. Contiene 22 especies (Hennebert 1973; Yohalem *et al.*, 2003) y un híbrido (*B. allii*) (Yohalem y Alabama, 2003) vinculado a las etapas sexuales y un amplio número de huéspedes específicos (Beever y Weds, 2000); infecta más de 200 especies vegetales distintas (Williamson *et al.*, 2007), determinando serias pérdidas económicas (Jin Wu, 2015), aunque en él también se pueden encontrar

especies que parasitan a una sola especie vegetal como *B. tulipae*, *B. squamosa* o *B. fabae*, huéspedes del tulipán, cebolla y haba respectivamente (Elad *et al.*, 2007).

Botrytis cinerea, estado anamorfo de *Botryotinia fuckeliana*, tiene un estilo de vida necrotrófico y polífago. Es un haploide filamentoso, heterotálico; patógeno importante de numerosas plantas incluyendo a las hortalizas y plantas ornamentales cultivadas, tanto en campo como en invernadero, que destruye rápidamente los tejidos. Además es un patógeno importante de productos agrícolas almacenados (Jarvis, 1977; Elad *et al.*, 2007), en los que comienza con una infección latente en el cultivo y se desarrolla posteriormente durante la recolección, transporte y almacenamiento (Coley-Smit y *et al.*, 1980).

El patógeno es un hongo que causa moho gris, capaz de atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo e infectar cualquier parte de la planta, dañando flores, hojas, tallos, frutos y otras partes de muchas plantas (Ellis, 1977, Chardonnet *et al.*, 2000) y va asociado a factores como la humedad relativa alta y la temperatura, haciendo uso de diferentes mecanismos de acción y provocando serias pérdidas económicas (Benito & Arranz, 2000). El moho gris también ha sido descrito en especies de plantas leñosas, que son particularmente susceptibles durante las primeras etapas de desarrollo (Muñoz & Campos, 2013).

Su detección en etapas tempranas es difícil, porque *Botrytis* spp se puede encontrar en estado latente en la planta hospedera, lo que dificulta hacer estudios epidemiológicos (Chardonnet *et al.*, 2000). También es un saprofito en senescencia de materiales vegetales muertos; además se reproduce con facilidad en laboratorio (Jarvis, 1980). Los conidios de *Botrytis* son los principales propágulos de dispersión entre cultivos y a distancias largas, infectando diferentes partes de la planta (Moyano *et al.*, 2003).

Las especies de *Botrytis* han evolucionado hasta desarrollar complejas estrategias para superar el sistema de defensa de la planta (Weiberg *et al.*, 2013) y para destruir la laminilla media, rica en pectina, y paredes celulares primarias del huésped, de manera que inducen la muerte celular y comprometen la integridad de los tejidos del huésped (Tiedemann *et al.*, 2004; Cantú *et al.*, 2008a; Curvers *et al.*, 2010)

La clasificación de *Botrytis* se basa principalmente en caracteres morfológicos y culturales. Algunas especies han sido nombradas en base a su asociación con el huésped (Hennebert, 1973; Jarvis, 1977). Basado en estas características Mirzaei (2007) describió morfo especies de *Botrytis*.

1.2.1 Morfología de *Botrytis* sp

Figura 3. Conidióforos de *Botrytis cinerea*, tomada con lente de 40X

El patógeno *Botrytis* sp produce gran cantidad de micelio gris y numerosos conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris (Jarvis, 1977). (Figura 3)

El estado asexual o imperfecto del hongo (*Botrytis cinerea*) se caracteriza por la proliferación de hifas sobre el sustrato que coloniza, hasta dar lugar a la formación de un micelio, desde donde surgen 3 estructuras básicas. Por una parte, los conidióforos o macroconidióforos en cuyos extremos se desarrollan los conidios o macroconidios los cuales, puestos en contacto con el sustrato y en condiciones adecuadas, germinan dando lugar a un nuevo micelio. Además, a partir de las hifas del micelio, se pueden originar los microconidióforos que forman los microconidios y los esclerocios (Beever & Weeds, 2007).

La reproducción sexual de *B. cinerea* fue reportada por primera vez por Groves & Drayton (1939). Los métodos de inducción *in vitro* fueron desarrollados por (Faretra & Antonacci 1987; Faretra *et al.*, 1988. Más tarde se consiguió desarrollar *in vitro* esclerocios de 77 aislamientos y macroconidias de 90 aislamientos, extraídos de campos de cultivo de Japón. Además se encontraron estructuras sexuales (apotecios, ascas, ascosporas) en cinco aislamientos de varias regiones. El estado sexual de *B. cinerea* se denomina *Botryotinia fuckeliana*.

La compatibilidad sexual de *B. cinerea* fue establecida por Faretra *et al.*, (1988), quienes, analizando la descendencia de cruzamientos realizados *in vitro* entre cepas aisladas de diferentes cultivos de Italia, establecieron que el tipo de compatibilidad sexual está controlado por un único gen con dos alelos (Faretra *et al.*, 1988a), los cuales se denominaron MAT1-1 y MAT1-2, siguiendo la nomenclatura propuesta por Yoder *et al.*, (1986).

1.2.1.1. Micelio

Las colonias de *Botrytis* son de color gris, luego se tornan de un color gris verdoso y con la edad se vuelven de un color marrón grisáceo (Karakaya y Bayraktar, 2009) (Figura 4a). Estas características pueden ser muy variables, dependiendo en gran medida de las condiciones de desarrollo del micelio (Moshin, 1990).

Figura 4. a) Micelio de *Botrytis* sp en medio de cultivo PDA. b, (40 X), c) Hifa de *Botrytis* sp, (100 X)

El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos (Figura 4b, 4c), que se multiplican vegetativamente mediante división citoplasmática, lo que da lugar a hifas cenocíticas con un elevado y variable número de núcleos (Moshin, 1990). El micelio cumple una doble función: i) como estructura de propagación de la enfermedad, causada ésta por la dispersión de restos vegetales (tallos y hojas) infectados por el micelio y, ii) como estructura de resistencia.

La supervivencia de micelio de las especies de *Botrytis* en condiciones naturales apenas ha sido investigado y, en particular, a menos que se tenga cuidado, es a menudo difícil en la práctica decidir si son microesclerocios o clamidosporas los

propágulos involucrados. Hay algunas pruebas de que el micelio de determinadas especies de *Botrytis*, y sobre todo las más especializadas en su parasitismo, puede sobrevivir durante períodos considerables en los bulbos, semillas y otras partes vegetativas (Coley-Smith, 1987 citado por Holz *et al.*, 2004).

1.2.1.2. Conidióforos

Los conidióforos o macro conidióforos que producen macroconidios (esporas por mitosis) (Staats, 2004)) se originan principalmente de la masa hifal, aunque también pueden hacerlo a partir de los esclerocios.

Figura 5. Conidióforos de *Botrytis* sp (100X)

Su estructura consta de un microfilamento más o menos recto, que se ramifica en la zona apical de forma alterna; las ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias (Figura 5). Las distintas ramificaciones poseen en su zona terminal, un engrosamiento o vesícula globosa y sobre la superficie de ésta, se disponen los conidios o macroconidios (Figura 6), los cuales están separados del conidióforo por un septo transversal, de manera que al separarse de éste se queda una herida en la región de unión. Los conidios se forman a partir de la gemación de células formadoras de conidios, las cuales se sitúan en las vesículas globosas (Espinosa, 2006).

1.2.1.3. Conidios o Macroconidios

Figura 6. Conidios de *Botrytis* sp (100 X)

Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son

diseminados por el viento. Los conidios de *Botrytis* son generalmente considerados de propagación efímera en el campo y su supervivencia, en gran medida está determinada por temperaturas extremas, la disponibilidad de humedad, actividad microbiana y exposición a la luz solar. En el suelo, las especies de *Botrytis* no son particularmente eficaces competidores y los conidios están sometidos a fungistasis (Coley-Smith, 1980 citado por Holz *et al.*, 2004).

Los conidios o macroconidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo, así como una de las estructuras de resistencia que presenta *B. cinerea*. Son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo (Elad *et al.*, 2004b). En la estructura interna de los conidios se destacan:

- Una superficie externa que vista al microscopio óptico presenta un aspecto liso e irregular, gruesa y con un pequeño cuello cuando se observa al microscopio electrónico. Esta envoltura está compuesta por grupos aminos, carboxilos y lipídicos. (Espinosa, 2006)
- La siguiente capa es la pared celular, que consiste en un armazón de microfibrillas de quitina y β -1,3-glucano ordenadas al azar (El Ghaouth *et al.*, 1997). La quitina está unida a glicoproteínas, lo que le da la forma, rigidez y resistencia física a la pared. La capa más externa de la pared celular presenta coloración, lo que puede ser debido a la presencia de melanina, pigmento capaz de proteger a los conidios de la acción enzimática, de la desecación y servirle como defensa frente a las toxinas secretadas por las plantas (Doss *et al.*, 2003).
- Y como última envoltura, una membrana plasmática con su habitual composición lípido-proteica. Se caracteriza por la presencia de dos superficies, una próxima a la pared celular y la otra hacia el citoplasma, en

las cuales aparecen unas proyecciones verrugosas de función desconocida. (Espinosa, 2006).

- En el citoplasma se encuentran los distintos orgánulos celulares, mitocondrias, pequeñas vacuolas, numerosos cuerpos de reserva (Buckley *et al.*, 1966), el retículo endoplasmático y numerosos ribosomas. También se aprecian en él, cuerpos lipídicos que se encuentran en el margen celular y otros cuerpos multivesiculares, los cuales pueden estar implicados en la formación de la pared celular o en la secreción de enzimas extracelulares.
- Y por último, un número variable y elevado de núcleos, oscilando entre los 5 y 11 observados por Vallejo *et al.*, (2003), los 3 y 18 encontrados por Hansen y Smith (1932), ó 1 y 10 según Shirane *et al.*, (1988). Cada núcleo presenta sólo una región organizadora nucleolar (NOR) (Taga y Murata, 1994).

Los conidios de *Botrytis cinerea* fueron capaces de sobrevivir en la superficie de frutos de los kiwis, manteniéndose viables e infectando la cosecha durante toda la temporada de cultivo (Walter *et al.*, 1999b citado por Holz *et al.*, 2004). Salinas *et al.*, (1989) informó de que los conidios almacenados en seco fueron capaces de sobrevivir a temperatura ambiente durante un máximo de 14 meses.

1.2.1.4. Microconidios

Los microconidióforos son estructuras caracterizadas por la formación de una pequeña vesícula de la que surge uno o más esterigmas a modo de botella de base ancha llamados fiálides, en cuyo extremo se forman los microconidios (Fig.7). Esta morfología básica puede presentarse sola o agrupada dependiendo de la estructura inicial de partida sobre la que se origina. Pueden desarrollarse de forma exógena y endógena al propio hongo (Urbasch, 1985)

Figura 7. a) Microconidio, b) microconidioforo de *Botryotinia* sp

La forma exógena se puede originar partiendo de 5 estructuras distintas: una hifa primaria, una endohifa que emerge de una hifa primaria, de células de los macroconidióforos, de esclerocios germinados y desde el tubo germinativo de un conidio. La forma endógena se puede formar a partir de sólo 3 estructuras: sobre endohifas que surgen en el interior de una hifa primaria, en el interior de células de los macroconidióforos y sobre ascosporas que se encuentran en el interior de sus ascas (Espinosa, 2006).

La función fundamental que se le atribuye a esta estructura es la de gameto masculino en el ciclo de vida sexual del hongo. Aunque también se le atribuye una

función alternativa como estructura de resistencia, debido a su capacidad de permanecer viable en estado de dormancia bajo condiciones ambientales adversas (Urbasch, 1985).

Botrytis cinerea fue reportada de la formación de microconidias, y además de macroconidios que funcionan como el inóculo principal. Más tarde, se detectaron microconidias durante el apareamiento de hongos, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel como espermacios (Brierley, 1918)

Las microconidias, que se producen en todas las especies de *Botrytis*, proporcionan una alternativa de propagación de este hongo cuando se somete a condiciones adversas. En general se encuentran en cultivos viejos del hongo o en los que están contaminados con otros organismos, y en asociación con esclerocios (Holz *et al.*, 2004).

1.2.1.5. Clamidosporas

Las clamidosporas se forman como células terminales o intercaladas por la transformación de partes del micelio vegetativo, y son liberadas por la desintegración de hifas. Han sido observadas sobre y dentro del tejido de hojas de *Solanum lycopersicum* y *Fucsia hibrida* natural y artificialmente infectadas y su número se acrecienta en lesiones viejas (Urbasch, 1983)

Figura 8. Clamidosporas de *Botytis cinerea*, desarrollado en medio de cultivo PDA (100X)

Han sido encontradas en *B. cinerea*, *B. anthophila* y *B. fabae* (Coley-Smith, 1980). Las clamidosporas de *B. cinerea* son células hialinas de formas y medidas extremadamente variables (Fig. 8). Estas por lo general se encuentran en cultivos viejos y ocurren comúnmente en los sectores estromáticos de los cultivos del hongo que está contaminado por otros organismos, y en asociación con esclerocios (Holz, *et al.*, 2004).

Bajo condiciones de humedad y sin adición de nutrientes, las clamidosporas germinan en las hojas mediante las microconidias que han permanecido inactivas. Cuando nuevos nutrientes son suministrados a las clamidiosporas, éstas germinan produciendo inserción hifal al hospedero o producen un nuevo cultivo de macroconidias (Holz *et al.*, 2004).

1.2.1.6. Esclerocios

Figura 9. Esclerocios de *Botrytis* sp, desarrollado en medio de cultivo PDA (10X)

El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro. Algunas especies producen a veces una fase perfecta de *Sclerotinia*, en la que las ascosporas se forman en un apotecio. Al parecer, este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios del tamaño de esas semillas o sobre restos de plantas a los que ha infectado. Las etapas de hibernación también se propagan mediante cualquier cosa que mueva el suelo o los restos vegetales que pudieran portar esclerocios o micelio del hongo, el cual requiere un clima húmedo y moderadamente frío (18 a 23° C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germinen sus esporas y para que produzca la infección.

Todas las especies de *Botrytis* forman esclerocios, que dependiendo de las condiciones de aislamiento y cultivo, pueden diferir en tamaño y forma. Los esclerocios generalmente son considerados como las estructuras más importantes involucradas en la supervivencia de especies de *Botrytis*. Además estos pueden sobrevivir en condiciones ambientales adversas, pueden producir apotecios después de un proceso sexual y poseen una capacidad considerable de producir cultivos sucesivos de conidios en muchas de la especies de *Botrytis* (Coley-Smith, 1980 citado por Holz *et al.*, 2004).

Bajo condiciones de laboratorio, los esclerocios de *B. cinerea* continúan su esporulación aproximadamente por 12 semanas después de la producción del primer cultivo de conidios (Nair y Nadtotchei, 1987 citado por Holz *et al.*, 2004).

En un esclerocio maduro se distinguen tres capas:

- Un **córtex externo** formado por un conjunto de hifas empaquetadas, las cuales presentan gruesas paredes celulares que las hacen especialmente resistentes a la desecación. Esta capa presenta una coloración oscura debido a la acumulación de melanina en las paredes de las hifas más externas. Un estudio histoquímico de las células indican un contenido en quitina, β -1,3-glucanos y compuestos fenólicos. (Espinosa, 2006)
- Un **córtex interno** constituido por un tejido donde la separación entre las hifas es indistinguible y en el que las células adoptan una morfología poliédrica debido a la presión que ejercen unas sobre otras, dando lugar a la desaparición de espacios intracelulares. (Espinosa, 2006)
- Y una **médula** compuesta por un tejido donde las hifas permanecen como filamentos individuales y cuyas células son largas, con paredes hialinas y gelatinosas, rodeadas por una matriz de β -glucanos. En su interior se

encuentran proteínas, glicógeno, polifosfatos y lípidos que le sirven como sustancias de reserva. (Espinosa, 2006)

1.2.1.7. Apotecios

Los apotecios son cuerpos reproductivos que surgen, individualmente o en grupo, de los esclerocios que han sido fecundados. Su morfología consta de un pequeño tallo o **estípete** (de 2 a 20 mm de longitud y 0.5-1.5 mm de grosor) y una región ensanchada a modo de embudo denominada **himenio o tecio**. Los estípetes están compuestos por hifas septadas, dispuestas longitudinalmente y paralelas entre sí. En el tecio o región fértil se encuentran las ascas dispuestas regularmente y en distintos estadios de desarrollo. Las ascas son hifas fértiles con forma cilíndrica y alargadas que contienen en su interior un total de ocho ascosporas. Además de las ascas se presentan unas hifas estériles ramificadas en la base del tecio llamadas **paráfisis** (Espinosa, 2006).

1.2.2. Variabilidad y adaptabilidad

Botrytis, especialmente la especie *Botrytis cinerea*, tiene una reputación de ser inusualmente variable, aunque los mecanismos subyacentes implicados no son muy bien entendidos (Jarvis, 1977, 1980).

Botrytis se considera como una población compleja y muy variable, sin conocer aún por completo los diversos mecanismos involucrados en ello. Una de las primeras evidencias de variabilidad en *B. cinerea*, tiene lugar cuando se aíslan las cepas de la naturaleza y se cultivan en medios sintéticos, donde muestran una

gran diversidad fenotípica, tanto en cuanto a morfología como a producción de enzimas, patogenicidad o resistencia a fungicidas.

El proceso de coevolución entre el patógeno y el huésped se basa a menudo en relaciones gen - por -gen, en el cual los alelos del gen de resistencia del huésped corresponden a la virulencia en los alelos de genes en el patógeno (Flor 1955). La coevolución más probable esperada se da entre patógenos biotróficos obligados o simbiontes y sus plantas hospederas, que con patógenos necrotróficos. Los patógenos obligados no matan las células del anfitrión, los necrotróficos como *Botrytis* necesitan invadir las células del huésped antes de que estas mueran, (Clark y Lorber 1976; Van Baarlen, *et al.*, 2014), lo que podría sugerir la ausencia o un bajo grado de coevolución.

Varios hongos especialistas son capaces de infectar a los miembros de una misma familia de plantas o las mismas especies de plantas. Tres especies de *Botryotinia* se han descrito en la familia Ranunculaceae de los ranúnculos; *B. calthae* se produce en *Caltha palustris* L., *B. ranunculi* en *Ranunculus* spp, y *B. ficariarum* en *Ficaria verna*. Ocasionalmente *B. calthae* se ha observado infectando *Ficaria verna* (Hennebert y Groves 1963). Hasta siete especies de *Botrytis* ocurren en *Allium* spp, que es uno de los mayores géneros de la petaloide monocotiledónea (Friesen *et al.*, 2004).

1.2.3. Medios de Supervivencia

Los ciclos de la enfermedad de las especies de *Botrytis*, sus hábitos de crecimiento y la fenología de sus plantas hospederas, se encuentran a menudo intrínsecamente relacionadas. Aletargadas o metabólicamente inactivas, las estructuras fúngicas inactivas juegan un papel importante en cada uno de los ciclos de la enfermedad. Cada parte del talo del hongo puede servirle a este como estructura de supervivencia (Holz *et al.*, 2004).

Luego de la infección y muerte de los tejidos necróticos del hospedero, el hongo puede sobrevivir y esporular como saprófito en los tejidos necróticos o producir estructuras de supervivencia como esclerocios.

El patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en cosechas que se han mantenido almacenadas durante largos periodos, aun cuando las temperaturas estén entre 0 y 10° C. Las esporas que han germinado rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero lo hacen en tejidos de la planta a través de heridas o después de que se han desarrollado durante un cierto tiempo y han formado micelio sobre los pétalos de flores senescentes, follaje moribundo de las plantas, escamas de bulbos muertos, etc.

1.2.4. Ciclo biológico de *Botrytis*

El ciclo sexual del hongo implica la fecundación del cuerpo ascógeno (órgano femenino de los Ascomicetos), por parte de los microconidios (que actúan como gametos masculinos o espermacios) de cepas que sean sexualmente compatibles entre sí, a partir de lo cual, puede desarrollarse el apotecio o esporofito, característico de los Ascomicetos (Espinosa, 2006).

El estado asexual o imperfecto del hongo (Figura.10) se caracteriza por la proliferación de hifas sobre el sustrato que coloniza, hasta dar lugar a la formación de un micelio, desde donde surgen 3 estructuras básicas. Por una parte, los conidióforos o macro conidióforos en cuyos extremos se desarrollan los conidios o macro conidios, los cuales puestos en contacto con el sustrato y en condiciones adecuadas, germinan dando lugar a un nuevo micelio. Además, a partir de las hifas del micelio, se pueden originar los microconidióforos que forman los microconidios y los esclerocios (Espinosa, 2006).

1.2.5. Taxonomía de *Botrytis* y *Botryotinia*

Botrytis se reconoce por primera vez como género en 1729 por Micheli, apareciendo en el año de 1832 en el Sistema Mycologicum. Se acepta el nombre de *Botrytis cinerea* para la especie (Groves y Loveland, 1953). De Bary en 1866, observa la relación existente entre *B. cinerea* y otro hongo capaz de formar ascas y, por tanto, perteneciente al grupo de los Ascomicetos, al que él mismo denominó *Peziza fuckeliana*.

Posteriormente Fuckel, describió un nuevo género denominándolo *Sclerotinia*, siendo las primeras especies mencionadas *Sclerotinia candolleana* y *Sclerotinia fuckeliana*. Años más tarde, De Bary establece una asociación entre *B. cinerea* y *Sclerotinia fuckeliana*; incluso el autor llega a definir a *Sclerotinia fuckeliana* como el estado perfecto de *B. cinerea*. Desde este momento, son numerosas las citas de autores, donde se refieren indistintamente como *S. fuckeliana* o *Peziza fuckeliana* al tratar a las formas apoteciales del hongo. Sin embargo, debido a la imposibilidad de obtención del estado sexual del hongo a partir de cultivos puros y a la pérdida de las muestras analizadas por De Bary, muchos científicos no aceptaban totalmente la idea de que *S. fuckeliana* formara parte del ciclo de vida de *B. cinerea* (Espinosa, 2006). En 1930, el análisis realizado por Whetzel (1945) sobre numerosas ascosporas, dio como resultado un micelio y unos conidióforos análogos a los producidos por *B. cinerea*, describiendo un nuevo género.

Años más tarde, Gregory (1949) localiza en el Museo de Historia Natural de Londres el material original de *Peziza fuckeliana*, recolectado por De Bary. Comparando los resultados obtenidos del estudio de este material con los apotecios obtenidos por Groves y Drayton, comprueba la similitud entre ambas y, por tanto, concluye que *Botrytis cinerea* presenta un estado perfecto que es *Botryotinia fuckeliana*. En 1973 el género *Botrytis* fue redefinido por Hennebert, quien incluyó en el género hasta 22 especies, especificando el nombre del género y especie para el estado perfecto e imperfecto. Hoy día, ha aumentado hasta 26 el

número de especies que se reconocen como pertenecientes al género *Botrytis*, aunque tan sólo en 18 de ellas son conocidos el estado anamorfo y teleomorfo (Beever y Weeds, 2004) (Tabla1)

El ciclo de vida de *Botrytis* comprende varios estados, uno de ellos somático (vegetativo), sistema micelial que produce conidios asexuales, esclerocios y microconidias. Por conveniencia, y porque no todas las especies de *Botrytis* presentan teleomorfo conocido, se utiliza *Botrytis* como nombre genérico para incluir tanto *Botrytis* como *Botryotinia* (Ross, 2014).

La clasificación actual está en gran parte basada en caracteres morfológicos y, en menor medida, en la fisiología y la gama de hospederos.

Clasificación taxonómica:

- *REINO:* *Fungi*
- *SUBREINO:* *Dikarya*
- *PHYLUM:* *Ascomycota*
- *SUBPHYLLUM* *Pezizomycotina*
- *CLASE:* *Leotimycetes*
- *ORDEN:* *Helotiales*
- *FAMILIA:* *Sclerotiniaceae*
- *GENERO* *Botrytis*

Tabla 1. Especies de *Botrytis* y su estado telomorfo *Botryotinia*

<i>B. aclada</i> Fresen	
<i>B. alli</i> Munn	
<i>B. anthophila</i> Bondartsev ?	?
<i>B. byssoidea</i> J. C. Walker ?	?
<i>B. calthae</i> Hennebert	<i>Bt. calthae</i> Hennebert & M. E. Elliott
<i>B. cinerea</i> Pers.: Fr	<i>Bt. fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel
<i>B. convallariae</i> (Kleb) Ondej -	-
<i>B. convoluta</i> Whetzel & Drayton	<i>Bt. convoluta</i> (Drayton) Whetzel
<i>B. croci</i> Cooke & Massee -	-
<i>B. elliptica</i> (Berk.).	Cooke <i>Botryotinia</i> sp.
<i>B. fabae</i> Sardiña	<i>Bt. fabae</i> J. Y. Lu & T. H. Wu
<i>B. ficariarum</i> Hennebert	<i>Bt. ficariarum</i> Hennebert
<i>B. galanthina</i> (Berk. & Broome) Sacc. -	. -
<i>B. gladiolorum</i> Timmerm.	<i>Bt. draytonii</i> (Buddin & Wakef.) Seaver
<i>B. globosa</i> A. Raabe.	<i>Bt. globosa</i> N. F. Buchw.
<i>B. hyacinthi</i> Westerd. & J. F. H. Beyma -	-
<i>B. narcissicola</i> Kleb. ex Westerd. & J.F.H. Beyma	<i>Bt. narcissicola</i> (P.H. Greg.) N.F. Buchw.
<i>B. paeoniae</i> Oudem.	-
<i>B. pelargonii</i> Røed	<i>Bt. pelargonii</i> Røed
<i>B. polyblastis</i> Dowson	<i>Bt. polyblastis</i> (P. H. Greg.) N. F. Buchw.
<i>B. porri</i> N. F. Buchw.	<i>Bt. porri</i> (J. F. H. Beyma) Whetzel
<i>B. ranunculi</i> Hennebert	<i>Bt. ranunculi</i> Hennebert & W. H. Groves
<i>B. ricini</i> N. F. Buchw.	<i>Bt. ricini</i> (G. H. Godfrey) Whetzel
<i>Botrytis</i> sp.	<i>Bt. fritillarii-pallidiflori</i> Q. T. Chen & J L. Li
<i>Botrytis</i> sp	<i>Sclerotinia spermophila</i>
<i>B. sphaerosperma</i> N. F. Buchw	<i>Bt. sphaerosperma</i> N. F. Buchw.
<i>B. squamosa</i> J. C. Walker	<i>Bt. squamosa</i> Vienn.-Bourg
<i>B. tulipae</i> Lind	

Fuente: Beever, 2004

1.2.6. Ocurrencia geográfica y ecológica

Las especies del género *Botrytis* se presentan en cualquier lugar en que sus hospederos estén creciendo, con rangos desde áreas tropicales, subtropicales hasta frías. Una proporción rápida de germinación conidial, infección, crecimiento del micelio y esporulación es muy concurrente en *Botrytis* spp., bajo una amplia gama de condiciones de microclima, lo que genera serios problemas en el manejo de la enfermedad alrededor del mundo (Elad *et al.*, 2004).

Muchos de los sistemas patológicos de infección ocurren en la presencia de una capa de agua sobre el tejido susceptible. El papel que cumplen las gotas de agua y los nutrientes en la germinación e infección ha sido muy reconocido; sin embargo, es interesante que el patógeno también sea capaz de infectar a las plantas cuando no existe la presencia de la capa de agua sobre las superficie de la planta (Elad *et al.*, 2004).

Un cambio en la propagación, importancia y rango de los hospederos que están siendo severamente afectados por *Botrytis* sp, está en parte asociado con el importante crecimiento de los cultivos protegidos dentro de invernaderos o túneles plásticos y en parte con el cambio en la intensificación y prácticas de crecimiento de cosechas en campo abierto (Elad *et al.*, 2004).

Luego de la infección y muerte de los tejidos necróticos del hospedero, el hongo puede sobrevivir y esporular como saprófito en los tejidos necróticos o producir estructuras de supervivencia como esclerocios.

1.2.7. Diversidad genética

Como ya hemos dicho, el género cosmopolita de *Botrytis* contiene 22 especies reconocidas y un híbrido. Existe conocimiento muy limitado sobre la filogenética, las relaciones entre los miembros del género *Botrytis*. Holst-Jensen *et al.*, (1998) analizaron las secuencias del ADN ribosomal con el espaciador transcrito interno (ITS), y concluyeron que el telomorfo *Botryotinia* junto con el anamorfo *Botrytis* constituyen un solo linaje monofilético. Sin embargo, las relaciones entre los miembros del género *Botrytis* no se pudieron resolver debido a la limitada información filogenética.

La reproducción sexual no se considera como la causa de la diversidad genética en los hongos. Este hongo está vinculado a los ascomicetos apoteciales, pero sus estructuras sexuales raramente se observan en el campo; aunque la falta de observación de una etapa de naturaleza sexual no prueba que está ausente (Burt *et al.*, 1996). Es posible que la reproducción sexual no se produzca en condiciones naturales, como apotecio, aunque estén estrechamente relacionados a hongos tales como *Sclerotinia*, que tiene estructuras de población clonal. Sin embargo, el potencial para la reproducción sexual se mantiene, ya que todos los aislamientos pueden ser capaces de reproducirse sexualmente en el laboratorio (Giraud, 1997); pero la relativa contribución de cada uno de estos modos de reproducción afecta a la estructura genética de las poblaciones (Brown y Wolfe 1990; Milgroom *et al.*, 1992).

El conocimiento de la genética de poblaciones de hongos fitopatógenos a través de diferentes técnicas moleculares puede llegar a contribuir al desarrollo de estrategias más duraderas de manejo de enfermedades (Delcan y Melgarejo, 2002). Estudios sobre genética de poblaciones mostraron que no eran significativas las diferencias genéticas entre los aislamientos de diferentes plantas huésped en Francia y en Chile utilizando técnicas moleculares como los RAPDS

polimórficos al azar amplificados en cadena y PCR-RFLP. Sin embargo, Muñoz y col. (2002) encontraron que los aislados de muestras de uva y tomate tenían diferencias genéticas.

Los marcadores moleculares son el tipo de marcadores genéticos más usados actualmente principalmente debido a su abundancia. Básicamente son secuencias de ADN que han surgido de las diferentes clases de mutaciones incluyendo mutaciones puntuales, reordenamientos (indels) o errores de replicación. Estos pueden ser genes o segmentos de ADN codificante o sin ninguna función conocida, pero su herencia puede determinarse empleando técnicas moleculares establecidas. Generalmente estos marcadores deben poseer un alto polimorfismo, frecuencia abundante en el genoma, comportamiento selectivamente neutral, fácil acceso y alta reproducibilidad (Bonin *et al.*, 2007).

El polimorfismo entre las especies *B. cinerea* (Fournier y Giraud, 2008) puede resultar de diferentes eventos y es un aspecto importante de la planta. Los microsatélites (SSR) son marcadores multialélicos, representan la mayor parte y son abundante fuente de polimorfismo de repetitivas secuencias con alta reproducibilidad. Los SSR a menudo se utilizan como marcadores moleculares. Esta tecnología consume tiempo y es muy costosa, pero es un técnica alternativa para estudiar polimorfismo basada en la presencia de microsatélites a lo largo de los genomas (Bornet y Branchard, 2004).

1.2.7.1 Marcadores moleculares basados en Transcriptores Espaciadores Internos ITS

En eucariotas, los genes que codifican los ARN ribosomales están organizados en matrices que contienen unidades de transcripción repetitivas que involucran a 16 - 18S, 5.5S, y 23 - 28S ARNr, dos espaciadores intergénicos transcritos ITS1 y ITS2

y dos secuencias espaciadoras externos (5' y 3' ETS); White *et al.*, (1990) diseñaron y describieron iniciadores específicos (ITS1 e ITS4) para amplificar y secuenciar varios segmentos del ADNr mitocondrial y nucleico de hongos.

Analizar las regiones ITS tiene un significado biológico importante en el procesamiento de rRNA. Forman estructuras secundarias específicas que son necesarias para el correcto reconocimiento de los sitios de escisión y proporcionan sitios de unión para las proteínas y ARN nuclear ribosoma durante la maduración (Korabecna, 2007).

En los hongos, ITS1 e ITS2 fueron estudiados no sólo con respecto a la filogenia y taxonomía, sino también en conexión con el desarrollo de estrategias de diagnóstico para la identificación de las especies en la medicina y la ecología. (Pinto, 2004; De Llanos *et al.*, 2004). La región ITS contiene dos regiones no codificadoras variables que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del ADNr, entre la subunidad pequeña, la región para 5.8S y los genes para ADNr de la subunidad grande (Gardes y Bruns, 1993). Las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2) (Iwen *et al.*, 2002). Estas regiones del ADNr permiten realizar estudios filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos (Bruns *et al.*, 1991), siendo de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas (White *et al.*, 1990).

1.2.7.2 Técnicas moleculares basados en Microsatelites o Secuencias Simples de repetición

Los marcadores moleculares han sido útiles para informar de la diversidad genética de las poblaciones y especies (Bornet y Branchard, 2001; Arnauet al., 2002; Korbin *et al.*, 2002), Basados en técnicas de PCR, son muy adecuados para obtener respuestas a gran escala de las poblaciones de plantas y animales.

Secuencia Inter- Simple Repetidas o SSRs se analizan mediante una técnica desarrollada sobre la base de la amplificación de las entre regiones con orientación inversa de los loci de microsatélites con oligonucleótidos anclados en sí mismos (Abbot, 2001), que pueden conducir a la detección de polimorfismo y también ser un nuevo enfoque para el estudio de la distribución y frecuencia de la SSR (Bornet, 2002)

Los ISSRs son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tandem de motivos simples como (CT) n ó (CA) n , ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Los motivos repetidos, llamados también SSRs (simple sequence repeats) pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos. La longitud de las secuencias de microsatélites tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan, ya que cuando el DNA se replica durante la meiosis, la DNA polimerasa puede “tartamudear” hacia adelante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales (Zietkiewicz *et al.*, 2007).

II. OBJETIVOS

Botrytis es uno de los hongos patogénicos más importantes ya que se puede encontrar en una gran diversidad de especies cultivadas y en productos almacenados causando daños. La República de Ecuador está considerada como uno de los sitios por excelencia exportador de productos cultivados, tanto para la alimentación como para ornamentación, como son las flores tropicales, rosas y, de manera especial, las orquídeas. Las orquídeas son uno de los productos más apetecidos por su gran variedad de especies nativas, híbridos naturales e híbridos introducidos, ubicándolos como uno de los sectores más grandes de la exportación.

Uno de los graves problemas a los que se enfrentan estos cultivos es el ataque de hongos, de manera especial *Botrytis cinerea*; por lo tanto, este trabajo se centra en el estudio del género *Botrytis*, hongo patógeno muy importante en Ecuador, por los daños que produce en la mayoría de cultivos de nuestra región, especialmente para la floricultura.

Este trabajo constituye un primer estudio de la incidencia de *Botrytis* en orquídeas, y el estudio morfológico, fisiológico y molecular del moho gris, destinado a determinar la variabilidad fenotípica y genética de este hongo, considerado como uno de los organismos fitopatógenos cosmopolitas que produce una de las enfermedades más frecuentes y graves del Ecuador.

Por todo esto, los objetivos del trabajo fueron:

1. Estudiar el desarrollo del hongo *Botrytis* sp. en especies de Orquídeas cultivadas bajo invernadero y la resistencia de éstas al ataque del hongo.

Para el cumplimiento de este objetivo fue necesario hacer una inspección previa de los sitios a muestrear. Para determinar la incidencia de la enfermedad en distintas zonas de cultivo de orquídeas comerciales en Ecuador. Asimismo se estudiaron y compararon características morfológicas y fisiológicas de una

colección de aislados de *Botrytis* obtenidos a partir de plantas enfermas en distintas zonas y cultivos representativos

2. Determinar la diversidad genética de *Botrytis* sp. en plantas de *Stanohopea* sp. cultivadas en invernadero.

Para dar respuesta a este objetivo fue necesario establecer protocolos de técnicas de PCR, así como la selección de los cebadores que permitan obtener mayor información sobre la variabilidad genética del hongo.

3. Establecer la variabilidad patogénica de *Botrytis* sp. en plantas de *Stanohopea* sp.

Para ello fue necesario seleccionar las plantas en donde se iban a realizar las aplicaciones de los inóculos y así medir el grado de patogenicidad y valorar el nivel de patogenicidad de los aislados de la colección, con la idea de identificar posibles variaciones en su virulencia.

Como objetivos concretos de este trabajo cabe resaltar los siguientes:

1.- Conocer las principales enfermedades que afectan a los cultivos de orquídeas en invernadero en Ecuador, ya que se trata de un cultivo prioritario y de especial relevancia económica en el país.

1. Ahondar en el conocimiento del hongo *Botrytis* como principal agente causal de enfermedad en los cultivos de orquídeas en Ecuador, en varios niveles:

2.1. Caracterización morfológica

2.2. Caracterización fisiológica

2.3. Caracterización molecular

2.4. Caracterización patogénica

La finalidad última de este trabajo fue contribuir al conocimiento del patosistema de modo que se favorezca el establecimiento de futuros protocolos de control del patógeno que sean más específicos, eficaces y respetuosos con el medio ambiente a la vez que económicamente viables. Con ello se pretende contribuir a la mejor conservación y puesta en valor de los recursos fitogenéticos en Ecuador y, de este modo, potenciar la agricultura y la economía del país.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Medios de cultivos

Los medios de cultivo utilizados fueron preparados comerciales diluidos en agua destilada estéril, con la concentración siguiente:

1. PDA (Potato Dextrose Agar. Laboratories Becton, Dickinson and Company USA). Se utilizó la cantidad recomendada por el fabricante (g/l).
2. Medio de cultivo para esporulación de *Botrytis*, elaborado con los siguientes elementos:

Extracto de levadura	2,5 g.
Extracto de malta (caldo)	7,5 g
Caseína hidrolizada	0, 25 g
Na nuclear	0, 1 g
Microelementos	1 ml
• Fe (NO ₃) ₃ 9H ₂ O	723,5 mg
• Zn SO ₄ H ₂ O	203,0 mg
• H ₃ BO ₃	2,0 mg
• H ₂ Mo O ₃	2,0 mg
Agar	15, 0 g
Agua destilada	1 L

Los medios de cultivo se mantuvieron en agitación con calor para diluir totalmente los compuestos y luego se esterilizaron (120 °C, 1,4 atm, por 20 min), luego se dejaron enfriar aproximadamente hasta los 50° C para verterlos en las placas de Petri. Para el estudio fenotípico, se trabajó en placas Petri de vidrio de 120 mm de

diámetro con PDA y en las de 60 mm de diámetro para la esporulación de *Botrytis*.

3.2. Ubicación del ensayo

Figura. 10. Mapa de ubicación de las zonas de muestreo de los aislados de *Botrytis cinérea*, en el Sur del Ecuador.

3.3. Toma de muestras

El muestreo se realizó en 14 localidades distribuidas entre las provincias de Loja, Azuay y Zamora Chinchipe de la Región Sur del Ecuador. Las muestras fueron recogidas de 23 invernaderos dedicados a la producción de orquídeas, de los cuales se aislaron 30 cepas de *Botrytis* de distintos híbridos y especies de orquídeas, ubicados en el cantón Gualaceo, 4 de invernaderos productores de hortalizas y 21 de zonas productoras de hortalizas y plantas ornamentales en el cantón Loja y Zamora Chinchipe al sur del Ecuador.

Las muestras fueron tomadas principalmente de flores de orquídeas que presentaban síntomas como: manchas de color marrón claro en las hojas, punteaduras de color gris oscuro en las flores y en algunos casos podredumbres con la presencia de micelio gris. Para el caso de las hortalizas y plantas ornamentales las cepas fúngicas se aislaron de órganos que presentaba un síntoma muy característico de *Botrytis*, manchas de color marrón claro a grisácea, en algunos casos con presencia de micelio. Se incluyó en el estudio una muestra de orquídea de Taiwan, cedida por el Dr. Roland Kischner de la Universidad de Frankfurt (Alemania). En la Tabla 4 de resultados se detalla los datos relativos a los aislados: Código, huésped, órgano del que se aisló, tipo de cultivo, localidad y provincia.

3.4. Aislamiento de *Botrytis*

Para el aislamiento del hongo se tomaron muestras de hojas, bulbos y tallos. Se cortaron fragmentos de las zonas afectadas, se esterilizó la superficie sumergiendo la muestra en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % durante dos minutos y enjuagando dos veces en agua destilada estéril (Agrios, 2002; Woodward y col 2005). Luego se sembraron pequeños fragmentos de 3 mm de largo por 1 mm de ancho, en medio nutritivo PDA (Potato, Dextrosa, Agar, de Becton, Dickinson and Company, USA) y se incubaron a 25°C en oscuridad. Las colonias crecidas se repicaron en medio selectivo para esporulación de *Botrytis* y se incubaron en las mismas condiciones. Se realizaron sucesivos repicados para asegurar la purificación y se conservaron almacenados a -4°C en tubos de ensayo y placas Petri.

3.5. Identificación del hongo

3.5.1. Identificación morfológica

La identificación del hongo se realizó observando en los aislados las características propias del hongo tales como: color del micelio, morfología y tamaño de los conidios y las células conidiógenas. Para clarificar las estructuras utilizamos una solución jabonosa a 1/100, luego se llevaron al microscopio las estructuras del hongo, colocadas en una placa porta objetos, de las cuales se midió el largo y ancho de los conidios, se tomaron 50 medidas que se procesaron con la ayuda del Excel (Kirschner y Piepenbring, 2006). Para cada muestra se calculó el valor promedio, la desviación estándar y los valores máximos y mínimos. Para obtener los rangos utilizados en la descripción de las especies, se calculó la desviación estándar del promedio ($\pm$). Los valores extremos se indicaron entre paréntesis.

Las estructuras morfológicas anamorfos se observaron con un microscopio óptico Axiostar Plus (Zeiss), con lente de 100X para poder graficar las formas y rasgos característicos de cada uno de las cepas y 40X para la medición de los mismos. Las estructuras telamorfos se analizaron con la lente de 100X y se graficaron a escala (Kirschner y Piepenbring, 2006).

Los gráficos fueron realizados en papel blanco con una cuadrícula, luego se dibujaron en papel plano para escanearlos y luego editarlos en el programa Adobe Photoshop CS4. Cada dibujo tenía indicada la escala respectiva, representando las diversas formas de algunas estructuras principalmente en la fase teleomorfo del hongo a escala, y a mano alzada (Kirschner y Piepenbring, 2007).

Las formas utilizadas para describir a *Botrytis* se basaron en las distintas ilustraciones encontradas en algunas publicaciones acerca de este género, principalmente en la información de Ellis (1971).

Una vez identificadas las muestras, se compararon las características de cada aislado para determinar la presencia de morfotipos.

3.5.2. Desarrollo de la fase sexual

Para determinar la fase sexual del hongo se sembró cada uno de los aislados en medio de cultivo para esporulación de *Botrytis* a 25°C y oscuridad por 8 días y luego se los puso a temperatura ambiente con un promedio de temperatura de 20°C, durante 20 días, a partir de los cuales se realizaron observaciones periódicas de las estructuras, utilizando soluciones jabonosas.

3.5.3. Germinación de conidios

Para determinar la germinación de conidios se trabajó con todos los aislados. Los conidios se obtuvieron haciendo raspados del micelio con asa de siembra y agua desionizada estéril. Las suspensiones conidiales se ajustaron a 10^5 conidios por ml. Para la evaluación de la germinación se usaron placas Microtest, colocando en los pocillos 10 µl de la suspensión de conidios (Tello, 1998; Yohalem *et al.*, 2003). Las placas se incubaron a 25°C durante 72 horas, realizando los conteos a 24, 48 y 72 horas. De cada aislado se contabilizaron un promedio de 100 conidios, con ayuda del microscopio óptico 40X. Se registraron solo los conidios germinados, con presencia de tubo germinativo. Los resultados se analizaron.

3.5.4. Caracterización fenotípica de *Botrytis*

La caracterización fenotípica se realizó en base a tres parámetros de desarrollo: crecimiento micelial a 10°, 15°, 20° y 25°C de temperatura, germinación y estructura morfológica.

Los aislados se hicieron crecer en dos medios de cultivo diferentes, PDA y Medio para Esporulación de *Botrytis*. En ambos casos se incubaron a 25°C en oscuridad durante 5 días para observar las estructuras de la fase anamorfo. Para observar las estructuras teleomorfo, se dispusieron las placas con los aislados a temperatura ambiente, promedio 20°C, por 10 días más.

3.5.4.1. Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial

De cada uno de los aislados se obtuvieron cultivos monospóricos utilizando la técnica de diluciones sucesivas (Dhingra y Sinclair, 1995) y se conservaron a 20°C para su posterior utilización.

Para realizar los estudios de crecimiento micelial y radial, se sembraron discos de agar con micelio de 5 mm de diámetro en el centro de la placa Petri con medio de cultivo PDA realizando cuatro repeticiones por cada aislado. La siembra se realizó a partir de colonias con siete días de crecimiento en medio de cultivo para *Botrytis*. Las placas se hicieron crecer a 10°, 15°, 20° y 25°C en oscuridad durante 10 y 13 días, de los cuales se midieron dos diámetros perpendiculares por placa, según la técnica descrita por Tello (2010).

Con los datos se calculó la tasa diaria de crecimiento para cada aislado en mm al día, (con la medida de los dos diámetros, medidos diariamente, dividida por el número de días transcurridos entre dichas mediciones (Gaforio, 2009).

3.5.5. Caracterización molecular

En el estudio molecular de *Botrytis* se emplearon 32 aislados que morfológicamente presentaban características similares. Se analizaron dos regiones del genoma, estas fueron amplificadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se trabajó con una pareja de cebadores ITS1, ITS4.

3.5.5.1. Extracción de ADN

El ADN genómico extraído se obtuvo a partir de aislados sembrados en medio de cultivo PDA durante un máximo de 7 días a 25°C, se extrajo de micelio fresco siguiendo el método de (Selosse *et al.*, 2007) y Sambrook *et al.*, (1989), utilizando el kit comercial The DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc, Germantown, MD, USA). Se recogió la parte aérea del hongo utilizando un escalpelo estéril, se tomó entre 20 y 30 mg, se colocados en tubos eppendorf de 2 ml y se lo trituraron en un molino luego se siguió el protocolo establecido por el fabricante. (Anexo 1)

3.5.5.2. Cuantificación de ADN

La cuantificación de la cantidad total de ADN se estimó utilizando un biofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf-Alemania). Las muestras de ADN se sometieron a la luz ultravioleta con una longitud de onda (λ) de 260 nm, según el factor de conversión: 1 ud A260 = 50 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ADNdc (Gaforio y Tello, 2009). Todas las lecturas se tomaron por duplicado siguiendo los siguientes criterios: La pureza del ADN estimada con los ratios A269/A280 mayor de 1.8, considerando que el ratio A260/A230 mayor de 2.

3.5.5.3. Ampliaciones de las regiones ITS

Se realizó una PCR según el método de Zhonghua y Michailides (2005), con algunas modificaciones. Se usaron los cebadores universales descritos por White *et al.*, (1990) y Gargas (2009). Se analizaron las regiones **ITS1** (5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3'), **ITS4** (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'), 5,8S que codifican para el ARNr. Se amplificó una selección de 32 aislados representativos de los diferentes huéspedes y de acuerdo a las características que estos presentaban a nivel morfológico.

En todos los casos la mezcla de reacción contenía 1X de tampón MgCl₂ 2,5 mM, 1µl de cada dNTPs, 1 µl de cada primer 0,2 µl BSA 10%, 0,2 µl de Taq polimerasa, 5 µl de ADN, a un volumen final de 25 µl. Las ampliaciones se efectuaron en un termociclador BioRad-DNA-Engine, USA. Los programas consistieron en un primer paso de 94°C durante 3 minutos para la desnaturalización inicial, seguido por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, luego el anillamiento a 40° por 45 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, para acabar la extensión final 72° por 7 minutos. Los productos amplificados se analizan mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,4 % usando Tris-acetato de etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), teñido con Sybergreen (Promega Co., Madison, WI, USA) y visualizados con luz UV (Sambrook *et al.*, 1989)

3.5.5.4. Purificación de los amplicones

Los productos de los amplicones fueron purificados con el Kit QIAquick, PCR purification (Qiagen Inc, Germantown, MD, USA). Los amplicones se purificaron siguiendo las instrucciones del manual suministrado por el fabricante. (Anexo 2)

3.5.5.5. Secuenciación de los amplicones

La secuenciación de los amplicones se los realizó en los laboratorios MACROGEN, Seul (Corea del Sur).

3.5.6. Estudio de poblaciones mediante la técnica SSR

El ADN de los distintos aislados para realizar los ensayos de este capítulo, fue el descrito anteriormente, en el capítulo de extracción del ADN. Una muestra de cada extracción fue diluida con agua miliq y 5 ng/μl. La cantidad de ADN se midió electroforéticamente.

Para efectuar el análisis SSR, se siguió el protocolo propuesto por Zhogua (2005), con algunas modificaciones y se seleccionaron tres juegos de cebadores, por su capacidad de producir patrones de bandas polimórficas y reproducibles en aislados de especies de *B. cinérea*. Los cebadores utilizados todos correspondieron a dinucleótidos con el extremo 3' y 5'; (AAC)₈, (GACA)₄, (CAC)₅.

Cada reacción de PCR contenía 1x de tampón 1x tampón, MgCl₂ 2,5 μl, dNTPs 2 μl, 0,5 uM de cada cebador, 0,2 μl de BSA 10%, 0,1 U Taq polimerasa (PROMEGA USA) y 2 μl de dilución de DNA extraído. La reacción se ajustó con agua miliq y se efectuó en un termociclado, a un volumen final de 25 μl. Los programas se detallan en la Tabla 2.

Tabla. 2. Programación de PCR para la amplificación SSr

	PRIMER BC1			PRIMER BC2			PRIMER BC5	
	T°C	Tiempo		T°C	Tiempo		T°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	3:00						
40 ciclos	94	1:00	40 ciclos	94	1:00	30 ciclos	94	1:00
Desnaturalización	94	3:00						
Anillamiento	50	1:50		50	1:00	53	0:30	
Extensión	72	2:00		72	0:30	72	2:00	
Extensión final	72	1:00		72				
Enfriamiento				4°C				

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % preparado con tampón TAE (Tris-acetato de etileno-diamino-tetra-acético. El marcador de peso molecular fue de 1kb. Para visualizar las bandas, los geles se tiñeron con Sybergreen (Promega Co., Madison, WI, USA) y visualizados con luz UV (Sambrook *et al.*, 1989).

Tabla 3. Características de los loci microsatélite para los aislados de *Botrytis*, secuencia del primer, temperatura de anillamiento, número y tamaño del rango de pares de bases.

	LOCUS	T°C	Rango de tamaño (pb)
1	(AAC)8	50	1 KB
2	(GACA)4	53	1 KB
3	(CAC)5,	53	1kb

3.6. Patogenicidad de los hongos

Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron plantas de *Stanohopeas sp*, *Dracula sp*, y *Miltonia sp* y *Epidendrum sp*, obtenidas in Vitro. Asimismo se utilizaron plantas de *Solanum lycopersicum* y *Phaseolus vulgaris* Las cepas utilizadas para las pruebas tenían 10 días de crecimiento, se utilizó dos cepas representantes de cada grupo caracterizado.

Se realizaron dos tipos de inoculación:

1. Pulverizaciones de inóculo de concentración 10^6 esporas/mL.
2. Se colocó un fragmento de medio de cultivo de 5 mm de diámetro con micelio de hongo sobre cada una de las hojas y se incubó el conjunto a 20/22°C de temperatura, durante el día y la noche, con un régimen de humedad relativa de 60-80 %. Se utilizaron como tratamientos control pequeños fragmentos estériles con agar solamente.

Las plantas se regaban diariamente tres veces en el día manualmente usando una regadera hasta empapar.

La medición de las lesiones provocadas por la inoculación del hongo se las hizo un calibrador, tomando las medidas en mm. En el caso de las inoculaciones con fragmentos de medio de cultivo se midió partiendo del tamaño del fragmento, diariamente a partir del día 3, desde la inoculación y de que el hongo empezó su proceso de infección. En el caso de las inoculaciones por pulverización se los hizo a partir del cuarto día de la inoculación, y se midió durante los 10 días consiguientes.

3.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico STAT GRAFICS 16.1. (Statpoint, Technologies, INC). Para ello se inició revisando los datos y haciendo un análisis descriptivo para hacer una exploración previa de los datos. Se realizó un análisis inferencial con distintas técnicas que se detalla más adelante. Se fijó en todos los casos un intervalo de confianza del 95 %.

Para el análisis se incluyeron las variables siguientes: Tasa diaria de crecimiento a 10°, 15°, 20° y 25°C, tamaño de los conidios (promedio largo y ancho), porcentaje de germinación.

Con los datos obtenidos de la fenología se calculó la tasa diaria de crecimiento para cada temperatura. Los datos de porcentaje de germinación de conidios se sometieron a una transformación del tipo arcoseno de la raíz cuadrada de los valores medios ($\arcsin \sqrt{y/100}$), para poder cumplir con la homogeneidad de las varianzas. (Tello y col. 1998)

Los resultados obtenidos del estudio fenotípico se analizaron mediante un análisis factorial (Ferro, 2008; Tello et al., 2010), para ello se realizó en primer lugar la prueba de Kaiser-Meyer-Olkin, para determinar si hay correlación entre las variables y aplicar el análisis factorial, determinando así las variables subyacentes. Se trabajó con un análisis de componentes principales, el propósito del análisis es obtener un número reducido de combinaciones lineales de las 6 variables que expliquen la mayor variabilidad en los datos. De esta manera se trató de identificar las variables que tienen más influencia en los factores, para explicar la mayoría de las varianzas. Los factores se agruparon reduciendo las variables a tres para que expliquen la configuración de las correlaciones dentro de un conjunto de variables.

Con los nuevos grupos de variables se hizo el análisis de varianza para las variables cuantitativas. Con el análisis de conglomerados jerárquicos se elaboró un dendrograma que nos permitió evaluar la cohesión de los factores agrupados en el análisis factorial y congrega a los aislados de acuerdo a sus características morfológicas más afines. Con los nuevos grupos de variables se realizó un análisis de varianza.

3.7.1. Análisis de resultados SSR de ADN

El análisis de la estructura de la población de *Botrytis* y al tratarse de un organismo haploide (Delcan, 2002) cada fragmento MP-PCR amplificados fueron registrados visualmente como un locus de dos alelos indicando como presencia (1) o ausencia (0) de banda, considerando similares aquellas del mismo tamaño. Los datos se agruparon en una única matriz y se analizaron conjuntamente. La similitud y correspondencia fue analizada con el coeficiente de Jaccard, se construyó un fenograma utilizando el grupo de pares no ponderados, método con media aritmética (UPGMA) por el programa secuencial, aglomerativo, y métodos de agrupamiento anidados jerárquicos (SAHN) del paquete estadístico NTSYS-pc 2.0, del Departamento de Ecología y Evolución, Universidad Estatal de Nueva York, NY) según Zhogua (2005).

El grado de ajuste entre la matriz cofenética y la matriz en la que se basó el agrupamiento, se estimó con el test de Mantel. Para realizar todos estos análisis se utilizó el programa NTSYS-pc versión 2.0. Finalmente se calculó el índice de diversidad genética según Nei (1978).

Para determinar la estimación de diferenciación genética (F_{ST}) entre las poblaciones de diferencia por pares y el análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre las poblaciones de diferentes lugares se realizó utilizando el software GenAlex (Peakall y Smouse, 2012).

III. RESULTADOS

4.1. Aislamiento e identificación de *Botrytis*

Tabla 4. Aislados de *Botrytis* procedentes de orquídeas, hortalizas y otras ornamentales, colectados de invernaderos comerciales de orquídeas en el cantón Gualaceo provincia de Azuay y zonas productoras de hortalizas del cantón Loja- Loja y Yantzatza- Zamora Chinchipe, del sur de Ecuador.

Código Aislado	Hongo	Huésped	Órgano de aislamiento del hongo	Tipo de cultivo	Origen Geográfico	
					Localidad	Provincia
B1	<i>B. cinerea</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	hojas	Campo abierto	Sauces	Loja
B2	<i>B. cinerea</i>	<i>Rosa damascena</i>	hojas	Campo abierto	San Cayetano	Loja
B4	<i>B. cinerea</i>	<i>Fragaria vesca</i>	hojas	Invernadero	Zamora Huayco	Loja
B5	<i>B. cinerea</i>	<i>Pelargonium peltatum</i>	flores	Campo abierto	Motupe	Loja
B6	<i>B. cinerea</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	fruto	Invernadero	Zamora Huayco	Loja
B7	<i>B. cinerea</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	flores	Campo abierto	La Florida	Loja
B8	<i>B. cinerea</i>	<i>Rosa sp (hibrido rojo)</i>	Tallo	Campo abierto	Zamora Huayco	Loja
B9	<i>B. cinerea</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tallo	Invernadero	Shucos	Loja
B10	<i>B. cinerea</i>	<i>Catleya maxima</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B11	<i>B. cinerea</i>	<i>Brassica oleracea var. Italica</i>	hojas	Campo abierto	Sauces	Loja
B13	<i>B. cinerea</i>	<i>Lactuca sativa</i>	hojas	Campo abierto	Motupe	Loja
B14	<i>B. cinerea</i>	<i>Oncidium sp</i>	hojas	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B15	<i>B. cinerea</i>	<i>Pelargonium peltatum</i>	flores	Campo abierto	Sauces	Loja
B16	<i>B. cinerea</i>	Ada cuca	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B17	<i>B. cinerea</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	fruto	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B19	<i>B. cinerea</i>	<i>Lactuca sativa</i>	flores	Campo abierto	Sauces	Loja
B21	<i>B. cinerea</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	hojas	Campo abierto	La Florencia	Loja
B23	<i>B. cinerea</i>	<i>Mary sugiyama</i>	Tallo	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B24	<i>B. cinerea</i>	<i>Miltonea</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B25	<i>B. cinerea</i>	<i>Miltoniopsis</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B26	<i>B. cinerea</i>	<i>Stanhopea embreii</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B28	<i>B. cinerea</i>	<i>Miltonea sp</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B29	<i>B. cinerea</i>	<i>Phragmipedium sp</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B30	<i>B. cinerea</i>	Burrageara Nelly Isler	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B31	<i>B. cinerea</i>	Epidendrum pretty princes	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B 32	<i>B. cinerea</i>	tropical splendor	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B33	<i>B. cinerea</i>	<i>Vulg</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B34	<i>B. cinerea</i>	<i>Acronia cardiosfolia</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B35	<i>B. cinerea</i>	<i>Masdevalla sp.</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B38	<i>B. cinerea</i>	<i>Vylstekeara cambrea plush</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B39	<i>B. cinerea</i>	<i>Catleya laurenciana</i>	hojas	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B40	<i>B. cinerea</i>	<i>Catleya L-rio verde Alncip x C. sammers</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B41	<i>B. cinerea</i>	<i>Dracula andretae</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B42	<i>B. cinerea</i>	<i>Masdevallia</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B44	<i>B. cinerea</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	flores	Invernadero	Plateado	Loja
B45	<i>B. cinerea</i>	<i>Dendrobium rhodostictum</i>	bulbo	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B46	<i>B. cinerea</i>	<i>Cymbidium</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B48	<i>B. cinerea</i>	<i>Odontodia</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B49	<i>B. cinerea</i>	<i>Dracula andretae</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B50	<i>B. cinerea</i>	<i>Fragaria vesca</i>	fruto	Invernadero	Shucos	Loja
B51	<i>B. cinerea</i>	<i>Rubus sp</i>	fruto	Campo abierto	shucos	Loja
B52	<i>B. cinerea</i>	<i>Rosa sp (alba)</i>	flores	Invernadero	Zamora huayco	Loja
B53	<i>B. cinerea</i>	<i>Rosa sp (rosa roja)</i>	flores	Campo abierto	Shucos	Loja
B54	<i>B. cinerea</i>	<i>Dracula sibundoyensis</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B55	<i>B. cinerea</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	tallos	Campo abierto	Catamayo	Loja
B56	<i>B. cinerea</i>	<i>Satanohopea sp</i>	hojas	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B58	<i>B. cinerea</i>	<i>Solanum betacea</i>	hojas	Campo abierto	Saraguro	Loja
B59	<i>B. cinerea</i>	<i>Rosa sp (alba)</i>	flores	Campo abierto	San Cayetano	Loja
B60	<i>B. cinerea</i>	<i>Rosa sp (tipo tè)</i>	flores	Campo abierto	Yantzatza	Zamora Chinchipe
				Invernadero	Jardín botánico	
		<i>Bletilla striata</i>	hojas		Taiwán	Taiwán

B61	<i>B. cinerea</i>	<i>Rosa sp (hibrido rojo)</i>	flores	Campo abierto	Yantzatza	Zamora Chinchipe
B18	<i>B. cinerea</i>	<i>Cymbidium sp</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B20	<i>B. fabiopsis</i>	<i>Pelargonium peltatum</i>	flores	Campo abierto	Carigán	Loja
B27	<i>B. cinerea</i>	<i>Oncidium hybrido</i>	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B22	<i>B. cinerea</i>	Miltassia Aztec nalo	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay
B36	<i>B. cinerea</i>	Oda Chold cashell	hojas	Invernadero	Gualaceo	Azuay
		Beallara Marfich Howard's				
B37	<i>B. cinerea</i>	Dream	flores	Invernadero	Gualaceo	Azuay

El total de aislados obtenidos fue de 55, tomados de 14 localidades diferentes, ubicadas en los cantones de Gualaceo (provincia de Azuay), Loja (Provincia de Loja), Yantzatza (provincia de Zamora Chinchipe) (Tabla 3).

Las muestras se obtuvieron de hojas, bulbos y flores infectados de *Botrytis*, se obtuvieron 30 aislados de especies e híbridos de orquídeas, 7 de *Rosa sp*, 2 de *Fragaria sp*, 3 de *Pelargonium peltatum*, 6 de *Lycopersicum sculentum*, 1 de *Brasica oleracea*, 2 de *Lactuca sativa*, 1 de *Solanum betacea*, 1 de *Phaseolus vulgaris*, 1 *Rubus sp*, y 1 de *Bletilla striata* procedente del jardín Botánico de Taiwán (Tabla 3).

4.1.1. Descripción de síntomas

En las hojas de especies de hojas laminadas, se observaron manchas de color marrón, presencia de anillos circulares no muy definidos y bordes claros de color amarillo (Fig. 11a). En el caso de las hojas coriáceas (Fig.11b) aparecen lesiones húmedas con aspecto acuoso al inicio, invadiendo el resto de tejidos los que adquieren un color marrón claro. Cuando el hongo ha avanzado las lesiones se cambian a un color marrón más oscuro desde la vaina de la hoja (Fig.11b), en *Catleya* se observan en los bulbos lesiones deprimidas (Fig.11c). En condiciones de temperatura y humedad favorables, se pudo observar la presencia de micelio gris y esporas producidas por el hongo en la superficie de los tejidos infectados (Fig. 11d).

Figura 11. **a)** Lesión en una hoja de *Stanohopea* sp; **b)** Lesión sobre hojas de *Phragmipedium* sp; **c)** Lesión sobre bulbo de *Dendrobium rhodostictum* (hibrido); **d)** Micelio de *Botrytis* sobre flor de *Acronia cardiosfolia*; **e)** Lesiones de *Botrytis* sp sobre pétalos de *Catleya máxima*; **f)** Lesión en flor de *Rosa* spp.

En flores como las *Catleya máxima* (Fig. 11e), presenta manchas redondeadas de color marrón oscuras y que luego se extiende a lo largo de los pétalos de las flores, más tarde aparecen un micelio gris sobre estas lesiones; otro de los síntomas importantes que *Botrytis* causa en las flores, especialmente en las rosas, son los atizonamientos de la flor de *Rosa* sp. (Fig. 11f) con presencia de micelio gris sobre las lesiones.

Figura 12. a) Tizón causado por *Botrytis cinerea* en flores de *Phaseolus* sp; b) Lesiones con presencia de anillos concéntricos y micelio en el tallo *Solanum lycopersicum*; c) Lesiones en hoja de *Solanum betacea*; d) pudrición de la pella en *Brassica* sp.

Además se incluyeron aislados de otros cultivos como hortalizas, con el fin de poder hacer comparaciones con los aislados de orquídea, determinando de esta manera si existen diferencias entre estas poblaciones. En el caso de los cultivos de hortalizas (*Lycopersicum sculentum*, *Lactuca sativa*, *Brasica oleracea*, *Phaseolus vulgaris*), frutales (*Solanum betacea*, *Rubus* sp, *Fragaria* sp) y ornamentales (*Rosa* sp), los síntomas en estos huéspedes variaron entre atizonamiento de los brotes florales (Fig. 12a); lesiones de color marrón claro y lesiones de color gris oscuro en tallos y hojas (Figs. 12 b y c), de contornos bien definidos que se extendían sobre el tallo haciéndolo que se debilite y se quiebre a nivel de la zona de infección. En las flores de *Pelargonium peltatum* y de *Solanum lycopersicum* se evidenciaron atizonamientos de color marrón claro que luego tomaban una coloración gris oscuro. En los frutos los síntomas fueron manchas anilladas un poco difusas y lesiones ligeramente blandas. En la fig. 12 se muestra una lesión blanda aguada sobre la pella de la planta de coliflor.

4.2. Caracterización morfológica y fenotípica

4.2.1. Análisis de agrupamientos de los asilados de *Botrytis*

Para determinar si existe alguna correlación, o algún tipo de agrupamiento de acuerdo a las variables de las características morfológicas y fisiológicas de *Botrytis* aislada de orquídeas y de otros cultivos, se trabajó con el método de Ward, con la distancia Eucladiana Cuadrada.

Figura 13. Dendrograma generado con el Método de Ward, Euclidea Cuadrada y la distancia Euclidea a partir de la observación de 54 aislados de *Botrytis*.

La figura 13, muestra cómo se formaron los 3 grupos de aislados, separados de acuerdo a las características morfológicas y fisiológicas; esto permitió analizar cada uno de los caracteres del hongo por aislados y dentro del grupo de aislados. Cada columna de la gráfica muestra cómo se dividieron las observaciones en un número específico de conglomerados, observando desde la derecha de figura 13, como se combinaron las observaciones. Por ejemplo, en la primera etapa, se combinaron la observación 25 con la observación 39. La distancia entre los grupos, una vez combinado fue 0,00129531. También se muestra que la siguiente etapa en la que este grupo se combinó con la etapa final de las combinaciones fue la etapa 14.

El árbol mostrado en la figura 13, también nos indica la distancia de tres grupos. Los agrupamientos de estos aislamientos responden principalmente al

comportamiento de estos a distintas temperaturas, el primer grupo agrega a 19 aislados que en su mayoría provienen de cultivos de hortalizas, solamente cuatro de ellos corresponden a orquídeas. En la rama 2 están los 25 aislados de *Botrytis* provenientes de orquídeas y finalmente el grupo 3 contiene a 6 aislados que corresponden a los aislados provenientes de orquídeas y una de *Solanum lycopersicum*.

Figura 14. Diagrama de dispersión de conglomerados con el Método de conglomeración de Ward, Euclídea cuadrada, se muestran tres grupos, en el grupo 3 se incluye *B. fabiopsis*.

Los grupos formados responden a caracteres morfológicas de las cuales podemos mencionar que:

Grupo 1: acoge aislados provenientes de huéspedes de hortalizas como *Lycopersicum sculentum*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*; frutal *Rubus* sp; Orquídeas *Ada Cuca*, *Miltoniopsis* sp, *Stanhopea* sp, *Miltonia* sp, *Vulg*,

Vylstekeara cambrea plush, *Beallara* Marfich Howard's Dream, *Cymbidium* sp, Odontodia y ornamentales *R. damascena*, *Pelargonium* sp, *Rosa* sp.

Grupo 2: Orquideas: *C. L-rio verde alncip x C.sammers*, *D. sibundoyensis*, *S. embrei*, *Epidendrum* Pacific glory, *Miltassia* Aztec nalo, Miltoniopsis, Mary sugiyama, Oda Chold cashell, *Dendrobium rhodostictum* sp, *Phragmipedium* sp, *Acronia cardiosfolia*, *Oncidium*, *Masdevallia* sp, *Bletilla striata*; especies hortalizas *Solanum betacea*, *Brasica oleracea* y frutales *Fragaria vesca* y *Solanum betacea*. Con referencia a la procedencia, no existe un lugar en común para todos ellos.

Grupo 3: *Calteya máxima*, *Cymbidium* sp, *Burrageara* Nelly Isler, *C. lawrenceana*, *Dracula andretae*, *Pelargonium peltatum* (*B. fabiopsis*).

La distribución de las agrupaciones según los caracteres morfológicos se muestra en la figura 14, en donde podemos ver como se agrupan los aislados, en tres grupos diferentes. De la misma manera el grupo 2 acoge aislados de hospederos en su mayoría de orquídeas, no existe un lugar en común para todos, de distintos sitios muestreados. En el grupo 3 es importante indicar la ubicación de *B. fabiopsis*, en conjunto con otro aislados de *B. cinerea*.

Con los factores obtenidos del análisis factorial, se hizo un análisis de conglomerados jerárquicos. Con el cual se pudo determinar los grupos que son relativamente homogéneos basados en las características morfológicas y fenotípicas estudiadas de cada uno de los aislados que presentan cierta variabilidad, los aislados se dividieron en tres grupos descritos anteriormente.

4.2.2. Micelio

En este estudio se encontró cierta variabilidad en la morfología del hongo muy importante, como el cambio de color del micelio en los medios de cultivo. Los aislados de *Botrytis* en medio de cultivo (medio de esporulación de *Botrytis*), presentaron micelio de color blanquecino a gris claro, durante los primeros cinco días, luego tomaban una forma algodonosa con exuberante cantidad de micelio de color gris oscuro. Las hifas observadas bajo el microscopio fueron de color café, septadas transversalmente (Fig. 15).

Figura 15. Aislados de *Botrytis* en medio de cultivo específico para esporulación de *Botrytis*, a los siete días de incubación a 25°C

4.2.3. Células conidiógenas y conidios

Las células conidiógenas de *Botrytis* presentan una forma ovalada y alargada holoblástica sincrónica, ubicadas en la parte apical (conidióforo) del hongo que sostienen a los conidios, las mismas que se presentan en número de 8 ampollas ovaladas y alargadas en la parte final de la célula, características que corresponden a los conidios de *B. cinerea*; mientras que para *B. fabiopsis*, los

conidios se presentan de forma más redondeadas. En nuestro trabajo se ha observado dos morfotipos que corresponden a *B. cinerea* con algunas diferencias entre sus células conidiógenas. Los morfotipos I y II corresponden a *B. cinerea* y un tercer morfotipo que corresponde a *B. fabiopsis* (Fig. 16).

Figura 16. a, b y c) Célula conidiógena de *Botrytis cinerea*; a, b morfotipo I; c morfotipo II; d) Célula conidiógena de *Botrytis fabiopsis*.

En todas las cepas hubo esporulación. Los conidios se presentan en forma de amerospora ovoide o elipsoidales, en algunos casos son un tanto redondeados, incoloros a color marrón claro. Respecto al tamaño de los conidios, en el caso de *Botrytis cinerea* se registran valores tales como: (9.63) 10.25 – 14.55 (14.86) x (6.80) 7.33 – 11.79 (13.28) μm . Para *Botrytis fabiopsis*, se encontraron dimensiones de (10.58) 11.3 - 17.9 (18.47) x (8.33) 11.93 - 11.92 (12) μm (Fig. 16).

Figura 167. a) Esporas de *Botrytis cinérea*, b) *B. fabiopsis*.

Macedo (2009) clasifica a *Botrytis cinerea* utilizando caracteres morfológicos como el tamaño de los conidios para reportar *Botrytis cinerea* en *Clerodendron splendens*. De la misma manera (Soares, 2008), también se basó en el tamaño de los conidios para identificar al hongo como *Botrytis cinerea*. Además Hennebert (1973) hizo una revisión del género *Botrytis* basado en aspectos morfológicos. Ellis (1971) reporta dimensiones de conidios para *Botrytis cinerea* de 6-9 x 8-14 μm . En el trabajo realizado por Macedo (2009), menciona que el tamaño de los conidios del hongo es de 8,0-17,0 x 6,8-8,0 μm de forma elipsoidal a ovoide formando racimos.

En la tabla 5 podemos observar las medidas de centralización del tamaño de los conidios encontrados en los distintos aislados, a pesar de su variación no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de aislados indicados. Asimismo, podemos mencionar que a pesar que algunos autores reportan diferencias en el tamaño de los conidios de *B. fabiopsis*, en los resultados de este análisis no se observa muy marcada esa diferencia.

Tabla 5. Medidas de centralización y dispersión de la variable tamaño de los conidios, menos el aislado B18 correspondiente a *B. fabiopsis*.

Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
53,00	11,76	1,38	11,77	8,75	15,30	6,85	0,37	0,01

En la Tabla 5 se muestran los estadísticos de resumen para tamaño conidios. Incluye medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma. De particular interés aquí son el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, las cuales pueden utilizarse para determinar si la muestra proviene de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar. En este caso, el valor del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

Figura 18 Histograma mostrando la distribución de tamaño de los conidios de 53 aislados de *B. cinerea*

El tamaño de los conidios fue muy heterogéneo; en la gráfica anterior (Fig.18), se puede evidenciar la distribución de los aislados en función de los diversos tamaños, siendo estos de rango de dimensiones entre $\geq 6 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m} \geq 116 \mu\text{m}$ de largo y $\geq 6 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m} \leq 14 \mu\text{m}$ de ancho, evidentemente el mayor porcentaje de valores se acercan a la media de tamaño de conidios (11,79), solo 10 de los aislados presentan valores mínimos (8,45) y máximos (15,3).

Para obtener esta distribución normal de tamaño de los conidios se sacó del grupo a un aislado de *Botrytis sp*, con valores de 18,35 μm . Es preciso mencionar que el tamaño de los conidios de *B. fabiopsis*, está por este rango de tamaño, según autores como (Zhang *et al.*, 2010), mencionan un tamaño de conidios entre 16-25 x 13-16 μm , por lo tanto los datos obtenidos para este aislado se corresponden a

este rango de medidas. Por su parte Beever (2004), a más de mencionar el gran tamaño de los conidios, manifiesta que esta especie se distingue por su alta patogenicidad. Sin embargo, según los datos analizados en la figura 23, nuestro aislado no presenta patogenicidad alta.

Tabla 6. Análisis de varianza para tamaño de conidios de *Botrytis* en referencia con el lugar de procedencia de cada aislado.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,46	1	4,46	2,37	0,12
Intra grupos	95,82	51	1,88		
Total (Corr.)	100,28	52			

La tabla ANOVA descompone la varianza de tamaño de conidios en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 2,37351, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la variable tamaño de conidios con la media de la variable tipo de cultivo (campo, invernadero) con un nivel del 95% de confianza (Tabla 5).

Figura 19. Representación de las medias del tamaño de los conidios de *Botrytis* en relación al tipo de cultivo de las plantas hospederas, al 95 % de confiabilidad con Fisher LSD.

Al hacer un test de comparaciones múltiples para determinar si existe alguna diferencia entre las medias del tamaño de los conidios con relación al tipo de cultivo de las plantas hospederas, según la figura 19 se puede evidenciar que los conidios procedentes de las plantas de invernadero presentan los tamaños más grandes de entre 11,7 y 12,4 µm.

4.2.4 Fase teleomorfica

Las dos especies desarrollaron estructuras de reproducción sexual y en condiciones heterotálicas. En todos los aislados de las 55 cepas se comprobó la presencia de estructuras de una de las etapas de la reproducción sexual del hongo (estructuras de *Botryotinia*). Se observaron hifas maduras a veces células

hifales vacías, estructuras con una morfología básica conocida como fiálides. Las fiálides se caracterizaron por la presencia de una vesícula de una sola fiálide sésiles o de tallo cortos inflados hacia la base y va disminuyendo su tamaño hacia el ápice, en forma de botella, con tamaño de 6 μm de largo, desarrollándose como células individuales o en grupos (fialoconidias o microconidias); en el extremo de éstas fialoconidias se desarrollan los microconidios en forma de collarite o individuales, con una dimensión de 1-2 μm (Figs 20 y 21).

Figura 19. Estructuras de *Botryotinia fuckeliana*; a) estructura de fiálide, y micronidias o fialoconidias; b, d) conjunto de fiálides y microconidias de *B. Fuckeliana*, desarrollados en medio de cultivo selectivo para esporulación de *Botrytis*.

Figura 20. Gráfico de las estructuras de *Botryotinia fuckeliana*

4.2.5 Esclerocios

Los esclerocios se desarrollaron en medio de cultivo PDA. El tiempo de desarrollo de un esclerocio dependió mucho de la temperatura, a 10°C estos iniciaron su desarrollo a partir del día 7, en cambio a temperaturas de 15°C tardó entre 10 y 15 días. La fase de emisión de hifas y células conidiógenas de los esclerocios empezó a partir de los 30 días, emitiendo primeramente un micelio de color gris blanquecino con la presencia de células conidiógenas y conidios (Fig. 21).

Figura 21. Formación de esclerocios, **a)** esclerocio sobre medio de cultivo PDA; **b** y **c)** esclerocios presentando diversas formas irregulares, germinados con micelio y estructuras de *Botrytis*.

4.2.6 Germinación de conidios

Figura 22. Germinación de los conidios de *B. cinérea*.

a) a las 24 hrs; b) a las 72 hrs (100x)

Se midió el porcentaje de germinación de los conidios a partir de las 24 horas, considerando como conidio germinado a la emisión del tubo germinativo, en la Fig. 22 se muestra conidios con tubos germinativos, (fig. 22a) 24 horas, (fig. 22 b) 72 horas.

Figura 23. Esquema que representa el porcentaje de germinación obtenido para los 3 grupos de aislados de *Botrytis*, medido a las 24, 48 y 72 horas.

Esta variable se midió a las 24, 48 y 72 horas a partir de suspensiones obtenidas de 10^5 con/ml, donde se pudo observar que en los grupos 1 y 3 el porcentaje de germinación de las conidios bajo con respecto al porcentaje de germinación de los conidios de los aislados del grupo 2 (Fig. 23)

Tabla 7. ANOVA para Germinación por Tamaño de conidios con relación al tamaño de los conidios.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,286645	44	0,0065147	0,84	0,67
Intra grupos	0,0697664	9	0,0077518		
Total (Corr.)	0,356412	53			

La tabla 6 muestra los valores del Análisis de varianza que descompone la varianza de Germinación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.84, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Germinación entre un nivel de Tamaño de conidios y otro, con un nivel del 95% de confianza.

Figura 24. Representación de las medias de la germinación de los conidios de *Botrytis* en relación al tipo de cultivo de las plantas hospederas.

Para comparar la diferencia entre la tasa de germinación con respecto a la procedencia de los aislados de *Botrytis* spp, se realiza un test de comparaciones

múltiples. Según la figura 24 entre los conidios procedentes de las plantas de invernadero con respecto a los conidios aislados de plantas de campo no existen diferencias, excepto por un pequeño grupo de invernadero que presenta una tasa de germinación baja de alrededor del 42 %.

Se analiza también la relación germinación de conidios con los tamaños de las mismas, y la diferencia entre estos a con un análisis de varianza (Tabla 6), no es significativa.

Figura 25. Medias del porcentaje de germinación y tamaño de los conidios, al 95 % de LSD Fisher.

En la figura 25 se muestra la distribución de las medias del porcentaje de germinación de los conidios de *Botrytis*, la misma que se observa heterogénea, observándose que no existen diferencias significativas entre estas con relación al tamaño de los conidios.

4.3. Efecto de la temperatura en el crecimiento micelar.

Todos los aislados crecieron en todas las temperaturas evaluadas excepto a 30°C, la placas para esta temperatura se mantuvieron durante 8 días a 30°C y luego se las colocó a 25°C durante 7 días más, comprobándose que los aislados habían muerto. La medición de la capacidad de crecimiento del aislado mostraron una gran variabilidad.

4.3.1. Tasa diaria de crecimiento micelar

Se mide el crecimiento micelar de *Botrytis* sp a 10°C, 15°C, 20°C y 25°C, considerando que para la zona de muestreo las temperaturas inferiores a 10°C no son relevantes; el tiempo de medida fue entre los 10 y 13 días desde la siembra, dependiendo de la temperatura a la que se sometió a los aislados hasta el final del ensayo cuando el micelio llenó completamente las placas. Con los datos obtenidos en cada temperatura se obtuvieron curvas de crecimiento para los micelios en cada temperatura, por grupos.

Tabla 8. Medidas de centralización y dispersión de los caracteres del crecimiento de los aislados de *Botrytis* sembradas en medio de cultivo PDA a 10°C.

Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
54	2,46	0,69	28,05%	1,06	4,06	3	0,79	-0,84

Se realiza un estudio fenotípico del hongo, considerando que este patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en los cultivos, se analiza la influencia de la temperatura de 10°C en cada uno de los aislamientos, tenemos los siguiente:

En este caso, el valor del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal (Tabla 8).

Figura 26. Histograma mostrando la distribución del promedio de la tasa diaria de crecimiento en mm (TDC) de 55 aislados de *Botrytis* prueba de Fisher al 95%.

La frecuencia del crecimiento micelial a 10°C, en la gráfica presenta una distribución normal, se puede evidenciar que la mayor frecuencia de aislados está alrededor del medio 2,5 mm de crecimiento diario (Fig. 26).

Además de determinar la diferencia significativa entre los aislados a una temperatura de 10°C, con los grupos derivados de la caracterización morfológica, se realizan curvas de crecimiento micelial para observar la evolución de los grupos de aislados, sometidos a un aislamiento de 10° C, de esta manera determinar el comportamiento del patógeno en esta temperatura.

Figura 27. Curva de crecimiento micelial de los distintos grupos de aislados de *Botrytis* durante los 13 días de incubación a 10°C y a oscuridad (dds= días después de la siembra).

La mayor tasa de crecimiento a 10°C, lo presentaron los aislados del grupo 3 con 29,15 mm, los grupos 2 y 3 obtuvieron un máximo crecimiento de 28,20 mm, a los 13 días, mientras que los aislados del grupo 2 tuvieron un crecimiento más lento

(Fig. 27). Al hacer un análisis de varianza no se encuentra diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 9. Medidas de centralización y dispersión de los 55 aislados de *Botrytis* incubados en medio de cultivo PDA a 15°C.

Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
55	3,19	0,78	24,71	1,25	4,67	3,42	-0,65	-0,79

Para el crecimiento micelial al 15°C, el valor del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada -0,79 se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal (Tabla 9).

La frecuencia de distribución de las medias de Tasa diaria de crecimiento, muestran una normalidad, con excepción de un aislado que presenta una media de 1 mm/día y medianamente separada del grupo (Fig. 28).

Figura 28. Histograma mostrando la distribución del promedio de la tasa diaria de crecimiento en mm (TDC) a 15°C, en 55 aislados de *Botrytis*

Figura 29. Curva de crecimiento micelial de los distintos grupos de aislados de *Botrytis* durante los 13 días de incubación a 15°C y a oscuridad

Asimismo para la temperatura de 15°C el grupo 3 presentó la tasa de crecimiento más baja hasta los trece días, con una pequeña diferencia con el grupo 2, el

primer grupo que contiene un mayor porcentaje de aislados es el que mostro una tasa de crecimiento mayor con 31 mm a los trece días (Fig. 29).

Tabla 10. Medidas de centralización y dispersión de las medias de crecimiento de los aislados de *Botrytis* sembradas en medio de cultivo PDA a 20°C.

Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
55,00	3,76	0,67	17,78	2,09	5,02	2,93	-2,24	0,18

Para la temperatura de 20°C, el valor de sesgo estandarizado no se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El valor de curtosis 0,18 estandarizada se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal (Tabla 10).

Frecuencia de la tasa diaria de crecimiento mostrando normalidad en los datos, con un óptimo de crecimiento de 3,9 mm diarios de crecimiento, considerando como uno de los mejores comportamientos del hongo a estas temperaturas; solamente tres de los aislados se alejan, con una desviación estándar de diferencia (Fig. 30).

Figura 30. Histograma mostrando la distribución del promedio de la tasa diaria de crecimiento (TDC) de 55 aislados de *Botrytis*, sembrados a 20°C

Figura 31. Curva de crecimiento micelial de los distintos grupos de aislados de *Botrytis* durante los 13 días de incubación a 20°C y a oscuridad. (dds= días después de la siembra)

Con la temperatura de 20°C el grupo 1 presentó una tasa de crecimiento baja, durante nueve días, al igual que el grupo 2, el grupo 3 representada por algunos aislados de *Botrytis cinerea* y un aislado de *Botrytis fabiopsis* alcanzó los 35 mm de crecimiento micelial a los ocho días, un tiempo de desarrollo menor con respecto a las temperaturas 10°C y 15°C (Fig. 31).

Tabla 11. Medidas de centralización y dispersión de las medias de crecimiento de los aislados de *Botrytis* sembradas en medio de cultivo PDA a 25°C.

Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
55	3,45	0,67	19,51%	1,36	4,68	3,32	-2,00	0,87

Para el crecimiento a 25°C, el valor de sesgo estandarizado – 2,00 no se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada 0,87, se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal (Tabla 11).

Figura 32. Distribución y frecuencia del promedio de la tasa diaria de crecimiento en mm (TDC) a 25°C de 55 aislados de *Botrytis*.

En el histograma de la tasa de crecimiento a 25°C, también se puede evidenciar una normalidad de los datos alrededor de la media de 3,5 mostrándonos que esta temperatura también es un factor importante para el desarrollo del hongo. De la misma manera se puede observar que solo un individuo se separa de la normalidad con una desviación estándar de distancia (Fig. 32).

Figura 33. Curva de crecimiento micelar de los distintos grupos de aislados de *Botrytis* durante los 13 días de incubación a 25°C y a oscuridad. (dds= días después de la siembra)

Finalmente, un óptimo de crecimiento de los aislados también se observó con temperatura de 25°C, el grupo de aislados 3 presentó el valor más alto a los 10 días, es importante señalar que este grupo acoge a un aislado de *Botrytis fabiopsis* que tuvo un promedio de crecimiento de 4 mm/día (Fig. 33).

El resultado del análisis de la varianza simple de la tasa de crecimiento diario (TDC) para todas las temperaturas estudiadas se recoge en la Tabla 11 y en la Figura 33.

Tabla 12. Analisis de la varianza simple entre grupos de la tasa de crecimiento diario de los 55 aislados de *Botrytis*, sembrados en medio de cultivo PDA A 10°C, 15°C, 20°C y 25°C.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	50,0684	3	16,6895	33,32	0
Intra grupos	107,175	214	0,500816		
Total (Corr.)	157,243	217			

La tabla ANOVA descompone la varianza de TDC en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 33,32, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de TDC entre un nivel de Temperatura y otro, con un nivel del 95% de confianza.

Es evidente que la temperatura óptima para *Botrytis* es la de 20°C, tal como se observa en la figura 34. Los aislados alcanzaron una media de crecimiento diario de 3,7 mm, siendo esta una condición para el normal desarrollo e infección del patógeno. La temperatura de 25°C también es muy favorable para su desarrollo, con una tasa de crecimiento alrededor de 3,4 mm, que se puede considerar como un valor de considerar al momento de hacer un plan de manejo del hongo.

Figura 34. Medias de la Tasa diaria de crecimiento en mm (TDC) de *Botrytis*, con la prueba de Fisher al 95% de varianza Medias de 55 aislados incubados a 10°C, 15°C, 20°C y 25°C.

La temperatura de 15°C, también presenta un valor considerable, en tanto que el crecimiento a 10°C es el más lento, lo que se puede considerar como valores de sobrevivencia del hongo, Considerando que las condiciones de la zona donde se tomó la muestra pueden tener temperaturas muy variable durante ciertas épocas del año, es importante destacar que los métodos de sobrevivencia dependen principalmente de los factores climáticos así como también del huésped.

4.4. Análisis de componentes principales (ACP)

En el momento de comparar la relación existente entre los 55 aislados estudiados mediante un análisis de componentes principales, se obtuvo un número reducido de combinaciones lineales de las 6 variables que expliquen la mayor variabilidad en los datos. En este caso, 3 componentes se han extraído puesto que 3

componentes tuvieron eigen valores mayores o iguales que 1,0. En conjunto ellos explican 60,1356% de la variabilidad en los datos originales.

La tabla 13 recoge los valores que representan las contribuciones de los caracteres (valores propios o *eigen*-vectores) a la construcción de las tres primeras componentes principales.

Tabla 13. Valores y proporción de varianza explicada correspondientes a las componentes con valores propios

Componente		Porcentaje de la varianza explicada	
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	1,37	22,83	22,83
2	1,20	19,98	42,80
3	1,04	17,33	60,14
4	0,90	15,06	75,20
5	0,76	12,64	87,84
6	0,73	12,16	100,00

4.4.1. Correlación entre los caracteres morfológicos y fisiológicos con análisis de componentes principales de caracteres (ACP)

Cuando se analiza la contribución de las variables evaluadas a las dos primeras componentes (Tabla 14), se puede determinar cuáles son las variables que aportan positivamente a cada componente. En el primer componente tenemos el mayor aporte (*eigen* vectores $\geq 0,47$) de Tamaño de los conidios; el segundo componente (*eigen* vectores $\geq 0,69$) con la Tasa diaria de crecimiento a 10°C y 25°C; y el tercer componente (*eigen* vectores $\geq 0,70$), con Tasa diaria de

crecimiento 15°C y 20°C. La variable germinación no aportó con mucho peso a los componentes, presentando un valor negativo.

La tabla 14 muestra las ecuaciones de los componentes principales. Así tenemos el primer componente principal tiene la ecuación $-0,0478512 \cdot \text{TDC } 10^{\circ}\text{C} + 0,395877 \cdot \text{TDC } 15^{\circ}\text{C} - 0,497867 \cdot \text{TDC } 20^{\circ}\text{C} - 0,210576 \cdot \text{TDC } 25^{\circ}\text{C} + 0,477674 \cdot \text{Tamaño conidios} - 0,56622 \cdot \text{Germinación}$, en donde los valores de las variables en la ecuación se han estandarizado restándoles su media y dividiéndolos entre sus desviaciones estándar.

Tabla 14. Contribuciones de los caracteres (vectores propios o *eigen*-vectores) a la construcción de las tres primeras componentes principales.

	<i>Componente</i>	<i>Componente</i>	<i>Componente</i>
	1	2	3
TDC 10°C	-0,048	0,690	0,196
TDC 15°C	0,396	-0,095	0,709
TDC 20°C	-0,498	-0,125	0,546
TDC 25°C	-0,211	0,521	0,246
Tamaño conidios	0,478	0,446	-0,190
Germinación	-0,566	0,168	-0,254

Se resaltan valores de mayor contribución

Diagrama de Dispersión - Analisis de Componentes Principales

Figura 35. Diagrama de dispersión y distribución de los aislados de acuerdo a los seis caracteres estudiados: Germinación, Tamaño de conidios, Tasa diaria de crecimiento (TDC) a 10°C, 15°C, 20°C, y 25°C.

En la figura 35 se muestra el diagrama de componentes principales, podemos observar que hay un pequeño grupo de aislados que se separan del mismo, más estos no comparten alguna similitud entre ellos, ya que son aislados provenientes de hortalizas y de orquídeas, no hay un lugar de procedencia común, y el tamaño de las esporas oscila entre 11,7 y 14,45 μm , excepto por los aislados B17, B49 y B39 que son aislados de *Phaseolus sp* y *Fragraria sp* que si están distanciados de este grupo grande; el aislado de *B. fabiopsis* (B20), especie diferente a *B. cinerea*, no tiene una separación muy representativa dentro del grupo.

4.5. Pruebas de patogenicidad

Se determinó la capacidad patogénica de los aislados inoculados en plantas de *Stanhopeas sp*, *Dracula sp*, *Miltonia sp* y *Epidendrum sp*, se midió con el crecimiento de la lesión producida por *Botrytis* en mm/día, durante 10 días. Durante los primeros días después de la inoculación de *B. cinerea* con tapones de micelio, las lesiones alrededor del punto de inoculación presentaban color marrón en hoja de *Stanhopea sp*, el tejido infectado se volvió de color marrón y las lesiones se agrandaron. Los síntomas de las pulverizaciones en la hoja comenzaron a surgir a partir del cuarto día y fueron creciendo gradualmente, tomando un color marrón oscuro (Fig. 36).

Figura 36: Lesiones provocadas por las inoculaciones de *Botrytis cinerea*, en hoja de *Stanhopea sp*. a) inoculación con tapones de micelio. b) inoculaciones con pulverizaciones.

El análisis ANOVA realizado (Tabla 14), descompone la varianza de los valores de la patogenicidad del hongo en dos componentes: un componente entre-grupos y

un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 20,27, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05. La comparación de la relación del progreso de la lesión entre los experimentos reveló altamente diferencias estadísticamente significativa entre las medias con un nivel del 95% de confianza.

Tabla 15. Análisis de la varianza simple entre los grupos de aislados de *Botrytis* para el carácter patogenicidad.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	111,31	9	12,0241	20,27	0
Intra grupos	6,79	79	0,593135		
Total (Corr.)	118,11	88			

En la figura 37 se indica las medias de los grados de patogenicidad medidos en las plantas inoculadas y mantenidas a una temperatura ambiente de 20°C. Se puede observar que los aislados del grupo 1 presentaron un grado de patogenicidad alto con referencia a los otros grupos, el grupo 3, en donde se ubica el aislado de *B. fabiopsis* representa una agresividad algo menor en las plantas inoculadas.

Figura 37: Media del crecimiento en mm de la lesión producida por *Botrytis* inoculado sobre plantas de *Stanhopea spp*, para los tres grupos de aislados de *Botrytis cinerea*. El grupo que contiene al aislado identificado como *B. fabiopsis* es el grupo 3.

4.6.1. Identificación molecular

Los productos de amplificación obtenidos con los cebadores universales TS1/ITS4 alcanzaron un tamaño de aproximadamente 550 pb, siendo similar en los 37 aislados de la colección y el aislado de referencia, y uno diferente que corresponden a otra especie, además consta un hongo tomado como referencia grupo externo (OUTGROUP).

Figura 38. Hipótesis de la filogenia para la región ITS, obtenida con secuencias de aislados de *Botrytis*. El árbol fue enraizado con *Colletotrichum acutatum* como grupo externo. Las muestras con código son secuencias del GenBank.

De los aislados de *Botrytis* obtenidos se obtuvo secuencias para la región ITS1, ITS 4. Las secuencias obtenidas fueron depuradas y editadas hasta obtener secuencias con similitudes de 99% y 100% de cobertura en el BLAST, para ser consideradas de buena calidad. Las secuencias correspondieron a *Botrytis cinerea* con soportes de 99 y 100% de similitud y uno a *Botrytis fabiopsis* con una similitud del 99% .En los genomas eucarióticos las regiones ITS varían mucho en tamaño y secuencia (Fig. 38). En la gráfica se muestran además accesiones del gen Bank usados para comprar con nuestros aislados, además se ubica al final del árbol los aislados de *Colletotrichum acutatum* utilizado como grupo externo.

4.6.1. Análisis molecular con SSr de los aislados de *Botrytis*

Los tres microsatélites escogidos mostraron polimorfismo excepto en dos aislados. Se determinó un porcentaje de polimorfismo del 58% para el aislado BC1 y del 61% para BC3 y BC5. Se analizaron 54 aislados de *Botrytis cinerea* y 1 de *B. fabiopsis*, de los cuales en dos aislados de *Botrytis cinerea* no apareció ninguna banda. En la figura 40, se muestran los patrones de bandas obtenidos para los microsatélites amplificados en un fragmento de la colección. Se observaron genotipos homocigotos.

Figura 40. Ejemplos de separación electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplicones de aislamientos obtenidos a partir *Botrytis cinerea*, con los cebadores de microsatélites, $(AAC)_8$, $(AAG)_8$ y $(GACA)_4$.

4.6.2. Análisis de similitud y agrupamiento.

Para establecer la relación genética entre las accesiones se generó una matriz de similitud con el coeficiente de DICE. La representación gráfica de esta

similaridad o dendrograma UPGMA permitió identificar los genotipos iguales dentro de la colección que tenía un coeficiente de similaridad en un rango de -0.12 a 0.70 (Fig. 41).

Figura 41. Dendrograma mostrando la relación entre las muestras de la colección de 53 aislados de *Botrytis*, con referencia a su organismo hospedero, basada en el coeficiente de similaridad DICE, para tres marcadores microsatelites. *B. cinerea*, *Solanum lycopersicum*, *Miltonea* sp, *Rubus* sp, *Rosa* sp, *B. fabiopsis*

(*Pelargonium* sp), *B. cinerea* (*Solanum betacea*, *Phaseolus vulgaris*,) Se incluye el aislado de *B. cinerea* procedente de Taiwan, señalado de color verde.

En el dendrograma de la figura 41, se pueden observar dos ramas principales, aquí denominadas A y B, conectadas a una distancia euclidiana de 1.0, no mostrándose un patrón de agrupación. La rama A incluye únicamente aislados provenientes de orquídeas de Gualaceo (Azuay) y de una única hortaliza de Loja. La segunda rama principal está conformada por el resto de aislados distribuidos en sub grupos que tienen distintas procedencias y huéspedes, como se puede ver, hay una distribución muy heterogénea dentro del dendrograma, conectada con una distancia de 0,40 con respecto a la rama B 1 que se subdivide a su vez en dos sub agrupaciones, la primera conformada por 8 aislados, los cuales en su mayoría tiene como procedencia Loja (Shucos, Sauces) y dos aislados de Gualaceo (Azuay); la segunda sub agrupación contiene a 15 aislados, 13 de ellos de Azuay y 2 de Loja.

La rama B2 estuvo conformada por 21 aislados, en su mayoría provenientes de plantas de orquídeas de Azuay, estas muestran mucha similaridad frente a los aislados colectados de otras plantas como las hortalizas y frutales, denotándose además que el aislado de *B. fabiopsis* (B20) se encuentra dentro del grupo grande B, en donde se agrupan la mayoría de aislados provenientes de Gualaceo (Azuay).

No se observa una distribución clara en el dendrograma de los grupos aislados, debido a que en todas las ramas se han encontrado aislados provenientes de un mismo sitio, pero dentro de estos grupos hay aislados de procedencia distinta así como de huésped distinto.

Figura 42. Análisis de correspondencia mostrando la relación entre los diferentes aislados de la colección de *Botrytis*, con base en los datos morfológicos y fisiológicos.

En la figura 42 se muestra un diagrama en tres dimensiones que se obtuvo con el análisis de correspondencia. Se observa que la mayoría de aislados se distribuye homogéneamente sobre los ejes de X e Y, formando grupos independientes que coinciden con lo observado en el análisis de similaridad, las muestras 36, 37, 38 y 39 aisladas de orquídeas se separan un poco del grupo. Asimismo se puede observar que la muestra de *B. cinerea* proveniente de Taiwan (aislado B61) está dentro de los grupos de aislados de Ecuador. De la misma manera se observa a *B. fabiopsis* (B20) con mucha similitud con los aislados de *B. cinerea*.

Los análisis de diferenciación genética revelaron que en el primer grupo de la población de *Botrytis* que acoge a *B. cinerea* y un aislado de *B. fabiopsis* (Grupo B1.1), presenta un grado de diferenciación génica bajo, con respecto del grupo 2 (B1.2) ($F_{st}= 0,03$), pero con relación al grupo B2.2 existe una diferencia moderada entre los aislados ($F_{st}=0,08$), considerando que en este grupo se encuentran aislados provenientes en mayor porcentaje de orquídeas, y solo unas pocos aislados de hortalizas, y de dos localidades distintas. De la misma manera con el grupo B2.2 ($F_{st}=0,07$); mientras que con el grupo (A) existe una diferencia génica considerada grande dentro de los parámetros de diferenciación genética (0,24) (Tabla 15).

Tabla 16. Valores de Identidad genética y la distancia genética entre las poblaciones de *Botrytis* seleccionadas con UPGMA, colectados en diferentes hospederos, separados por el coeficiente de similaridad DICE.

	Grupo B1.1	Grupo B1.2	GrupoB2.1	Grupo B2.2	Grupo A
Grupo B1.1	****	0.13	0.09	0.06	0.01
Grupo B1.2	0.036	****	0.17	0.01	0.01
Grupo B2.1	0.083	0.025	****	0.01	0.01
Grupo B2.2	0.073	0.113	0.26	****	0.09
Grupo A	0.247	0.288	0.488	0.053	****

Los valores por encima de la diagonal se lee la Identidad génica (I), por debajo de la diagonal se lee la distancia genética.

Tabla 17. Valores de estadísticos de F (FST) entre las poblaciones de *Botrytis* aisladas de distintas especies, según Nei. (1978)

	Pob BO	Pob BH	Pob bO	Pob BF
Pob BO (orquídeas)	****			
Pob BH (hortalizas)	0,057	****		
Pob bO (ornamentales)	0,178	0	****	
Pob BF (frutales)	0,326	0,108	0,06	****

Pob BO (orquídeas), Pob BH (hortalizas), Pob bO (ornamentales), Pob BF (frutales)

Al hacer un análisis espacial con datos binarios podemos comparar los aislados de *Botrytis* por huésped y podemos mencionar que en el grupo de aislados de orquídeas y hortalizas (Pob BH) y frutales (Pob BF) hay diferencia significativa ($p=0,001$) y además que entre estos dos grupos, existe una diferenciación genética grande ($F_{st}=0,10$). Considerando que valores de 0 indican que las frecuencias alélicas son iguales, se puede evidenciar esa situación con las poblaciones de *Botrytis* de Orquídeas (Pob BO) y hortalizas (Pob BH), éstas no son significativamente diferentes ($p=0,01$), con una diferenciación genética moderada ($F_{st}=0,06$). Asimismo el grado de significancia con relación a las plantas ornamentales (Pob bO) y frutales (Pob BF), es significativa con una diferenciación génica moderada ($F_{st}=0,06$) en tanto que, entre las poblaciones de *Botrytis* de orquídeas con relación a los aislados de frutales esta diferencia génica es muy grande ($F_{st}=0,32$); con relación a los aislados de ornamentales también se considera una diferencia génica grande. Por lo tanto se puede decir que se rechaza la hipótesis de que no existen diferencias génicas entre los aislados (Tabla 17).

Tabla 18. Identidad Genética (I) y distancias Genética (DG) calculada según Nei (1978) para los 4 grupos identificados dentro de la colección de aislados.

	Pob BO	Pob BH	Pob bO	Pob BF
Pob BO (orquídeas)	****	1.00	0,81	1.00
Pob BH (hortalizas)	1.00	****	0,81	0.81
Pob bO (ornamentales)	0.20	0.20	****	1.00
Pob BF (frutales)	0.20	0.20	1.00	****

Valores por encima de la diagonal Identidad genética (I), valores por debajo de la diagonal Distancia Genética Nei

La identidad genética o más conocida como similitud entre los grupos fue de 0,81 a 1.0, moderadamente alta. Se deduce según los datos obtenidos que la población de aislados de orquídeas y hortalizas tienen la misma frecuencia alélica, de la misma manera los aislados de frutales y ornamentales (Tabla 18). Con respecto al total en los grupos, se observó valores más similares de las poblaciones Pob bO y Pob BF, así mismo entre la Pob BH y Pob BF. En cuanto a la distancia genética, estuvo entre 0,20 y 1.0, considerándose como una distancia genética pequeña (Tabla 18).

Los marcadores MP-PCR revelan que la mayor parte de la diversidad genética (73%) se presentó dentro de las poblaciones (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis jerárquico de variación molecular dentro y entre poblaciones de *Botrytis* sobre la base de marcadores microsatélites.

Fuente de variación	df	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Varianza estimada	Porcentaje de variación
Entre Población	3	17.935	5.978	0.438	27%
Dentro de la Población	49	56.593	1.155	1.155	73%
total	53	74.528		1.593	100%

El número de genotipos, número de alelos observados y número de alelos efectivos se muestran en la Tabla 20, pudiéndose notar la relación que tiene con el número de genotípicos incluidos en los grupos, con un flujo genético total de $Nm = 1.30$ considerado alto.

Tabla 20. Parámetros de diversidad genética identificados en el análisis de agrupamientos del de la colección reducida de *Botrytis*, incluyendo el control.

Poblaciones	N	Na	Ne
Pob BO (Orquideas)	2.963	0.000	0.000
Pob BH (hortalizas)	0.667	0.000	0.000
Pob bO (ornamentales)	1.856	0.333	0.333
Pob BF (frutales)	1.202	0.333	0.333
TOTAL	0.930	0.112	0.112

Abreviaciones: (N) Número de genotipos, (Na) número de alelos observados, (Ne) número de alelos efectivos

IV. DISCUSSION

Este es el primer estudio de una colección de aislados de *Botrytis* sp, realizado en la región Sur de la República del Ecuador, obtenidos de plantas de orquídeas cultivadas en condiciones de invernadero, de hortalizas y plantas frutales, con síntomas de necrosis, atizonamientos y pudriciones. A partir del análisis de las características fenotípicas, entre los aislados estudiados se identificaron dos grupos con características morfológicas diferentes, correspondientes a dos especies de *Botrytis* (*B. cinerea* y *B. fabiopsis*).

Estudios similares para este género han sido realizados en países como La India donde se encontró *B. cinerea* en *Phaius tankervilleae* (orquídea) (Baiswar y Chandra 2008); en los Estados Unidos ha sido reportado el género *Botrytis*, causando daños en *Cymbidium*, *Catleya*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Maxillaria*, *Miltonia*, *Oncidium* (Ito et al., 1977; Brunet-simon et al., 2005)). Así mismo, se han reportado trabajos en donde señalan a *B. cinerea* como el responsable de causar pudriciones post cosecha, deterioro de brotes, yemas, hojas jóvenes y flores (Elad et al., 2004; Elad et al., 2007; Soares 2008; Karakaya et al., 2010;), en una gran cantidad de plantas hortícolas y ornamentales (Michailides 2000).

Los síntomas de *Botrytis* sp variaron desde la presencia de tizones de color marrón, presencia de anillos poco difusos y bordes claros de color amarillo; hasta pequeñas manchas marrones en la porción basal de las primeras hojas. Esta descripción es similar a las descritas en *Gaura lindheimeri*, *Echinacea purpurea* (L.) Moench y *E. pallida* (Nutt.) Nutt. Var. *Angustifolia*, *Cornus florida* L, *Catharanthus roseus*, *Hibiscus sabdariffa* L, *Chamelaucium uncinatum*, *Platycodon grandiflorum*, *Ocimum basilicum* L, e *Hibiscus cannabinus*. Estas lesiones con el tiempo se extienden hasta cubrir toda la hoja, el tejido afectado se pudre y seca. Iguales características describen en *Rudbeckia hirta* en Italia (Swart, 2001; Chang et al., 2005; Nagy, 2007; Bardas, 2009; Garibaldi, 2009; Garibaldi et al., 2009; Swart, 2010). Además, en hojas coriáceas aparecen lesiones húmedas con apariencia acuosa; lesiones también observadas en plantas de *Phaius tankervilleae* y *Arachis hypogaea* L. y se observaron tallos con marchitez y empapado de agua,

con lesiones densas, coincidiendo con lo publicado por Baiswar (2008) y Woodward *et al.*, (2005). De la misma manera, lesiones necróticas se observaron en el cáliz y los pétalos, que se volvieron de color marrón y las flores se marchitaron (Swar, 2002).

Cultivos como *Solanum lycopersicum* mostraron síntomas en el tallo de plantas cultivadas en condiciones de campo. En el cultivo de *Phaseolus vulgaris* se observó atizomamientos en los brotes tiernos y vainas; de igual manera en las *Brasica* sp se evidenció el daño causado por *Botrytis* en la pella. Todas estas características descritas son similares a los daños producidos por *Botrytis* en cultivos en Japón, donde se encontró a *B. cinerea*, como causante de un deterioro severo de los tallos, hojas y vainas en plantas de *Lupinus mutabilis*, una leguminosa que se cultiva en Kagawa (Keisuke, 2008); en Tagawa-gun, se reportaron síntomas diferentes de las lesiones típicas de *Botrytis* en hojas y tallos de plantas de *Mesembryanthemum crystallinum*, en cultivos hidropónicos, (Kazuyuki, 2010).

Utilizando las características morfológicas del hongo, permitió describirlo e identificarlo la presencia de dos morfotipos. Se observaron células conidiógenas de *B. cinerea* de forma ovalada, alargada, holoblastica, ramificada alternadamente en la región apical. Presentaba esterigmas cortos, clavados y ovalados en número de ocho (morfotipo 1), en cambio, los conidioforos de *B. fabiopsis* eran transparentes y presentan alta septación a nivel de la ramificación apical y tienen diferencias en el tamaño de los conidios (morfotipo 2), características descritas también por Jarvis (1980); Michailides y Elmer (2000); Woodward (2005); Garibaldi (2009); Karakaya (2009); Soares (2009) y Zhang (2009).

Asimismo, con relación al tamaño y forma de las conidios, se encontró una gran variación, tamaños entre (9.63) 10.25 – 14.55 (14.86) x (6.80) 7.33 – 11.79 (13.28) μm . Para *Botrytis fabiopsis* se encontraron dimensiones de (10,58) 11,3 - 17,9 (18,47) x (8,33) 11,93 -11,92 (12). Esta característica fue muy consistente y

permitió diferenciar las dos especies de *Botrytis* identificadas (*B. cinerea* y *B. fabiopsis*), variando notablemente. Esto se corroboró con lo mencionado por Chang (2005) y Wooward (2005). Además Hennebert (1973) hizo una revisión del genero *Botrytis* basado en aspectos morfológicos. Ellis (1971) reporta dimensiones de conidios para *Botrytis cinerea* de 6-9 x 8-14 μm . En el trabajo realizado por Macedo (2009) menciona que el tamaño de los conidios del hongo es de 8,0-17,0 x 6,8-8,0 μm de forma elipsoidal a ovoide formando racimos. Al hacer una comparación de tamaño de los conidios con el tipo de cultivo podemos ver que las conidios procedentes de cultivo de invernadero tienen un mayor tamaño, este factor quizá se pueda corresponder con el hecho de que las condiciones para la infección y desarrollo de *Botrytis* en Invernadero son mejores, y la variación de temperaturas no es relevante, con relación a las condiciones de campo abierto.

Este es el primer reporte de *B. fabiopsis* en plantas ornamentales, una especie muy parecida a *B. cinerea*, pero se trata de un patógeno especializado de Vicia, distinguido por una mayor patogenicidad (Ros, 2004). Las características morfológicas de *B. fabiopsis* diferían de las encontradas con el resto de aislados que correspondían a *B. cinerea* en plantas de frijol cultivadas en la provincia de Hubei, China. Los conidios producidos por *B. fabiopsis* en las hojas de haba son hialinos a marrón pálido, forma elíptica a ovoide, arrugada en la superficie y son más grandes que los conidios de *B. fabae* y *B. cinerea*.

Botrytis fabiopsis al igual que *Botrytis fabae* causa la mancha chocolate, siendo el mayor limitante en el crecimiento de judia/haba de grano en las regiones de Etiopia (Dereje y Yaynu, 2001). Se ha registrado como causa de enfermedad en Vicia sp., Pisum sp., y Phaseolus sp. (Staats et al., 2005; Tivoli et al., 2006). No se han encontrado reportes de este patógeno en plantas ornamentales, pero si se ha reportado *B. fabae* como una enfermedad nueva en *Trifolium dasyurum*, con síntomas de manchas con halo al inicio y luego un tizón en la hoja (You, 2007).

Uno de los estados del ciclo de vida de *Botrytis cinerea* es el estado sexual, *Botryotinia fuckeliana*. En nuestros experimentos los teleomorfos se generaron en condiciones heterotálicas *in vitro*. Las estructuras observadas en estas condiciones fueron: a) macroconidioforos, estructura muy importante dentro del ciclo, ya que son de importancia principal en la epidemiología del patógeno y b) microconidias, estructura anamorfa de la cual hay pocos estudios sobre su papel dentro del ciclo del hongo (Urbasch, 1984). Por su parte, los esclerocios son considerados como una parte esencial del ciclo de vida al ser requeridos para la reproducción sexual, ya que a partir de este se desarrollan los apotecios; sin embargo, en nuestro trabajo no se encontraron estas estructuras, coincidiendo con lo expuesto por Jarvis (1980). En ambas especies se observaron fiálides cortas de 6 μm , endógenas y exógenas, desarrolladas como células individuales o en grupos, presencia de microconidios en grandes cantidades, en concordancia con lo descrito por Urbasch (1984); Ross (2004) y Fukumori *et al.*, (2004).

Los resultados del estudio fenotípico de los aislados no presentaron una gran variabilidad. La morfología de las colonias era de color blanco en un inicio y luego tomaba una coloración de gris claro a gris oscuro. La tasa de crecimiento micelial fue heterogénea, coincidiendo con lo publicado por otros investigadores (Chardonnet *et al.*, 2000; Mirzaei *et al.*, 2008). Al analizar el crecimiento micelial del hongo, podemos destacar que la temperatura óptima para el desarrollo de *Botrytis* fue la de 20°C, en donde el patógeno tuvo un crecimiento en un menor número de días y una tasa de crecimiento de 3,9 mm/día, en relación al crecimiento a 25°C que fue de 3,55 mm. El crecimiento de los aislados a temperaturas de 10°C y 15°C respectivamente fue de 2,5 mm/día y 1 mm/día, respetivamente. En trabajos presentados por Clarkson (2000) mencionan que a temperatura de 20°C el hongo puede presentarse con mayor agresividad; de la misma manera Latorre (2002), en su trabajo midió los efecto de la temperatura infectando bayas maduras de Vid, observándose que 20°C es la temperatura óptima para su proceso infectivo, aspecto a considerar como muy importante al momento de hacer planes de manejo para disminuir la agresividad del hongo.

Además, se midió la capacidad germinativa de los conidios de *Botrytis*, considerándose este aspecto como importante para el proceso de infección que se inicia con la germinación de los conidios, formación del tubo germinativo y de un apresorio, los mismos que son emitidos cuando la humedad relativa es alta (90%) (Latorrea, 2002). En nuestro trabajo se midió la capacidad germinativa (emisión del tubo germinativo) de las esporas de *Botrytis* aisladas en medio de cultivo PDA en el cual observamos que esta fue muy heterogénea, sin embargo al hacer un análisis de varianza de estos datos obtenidos no se encontraron diferencias significativas. Asimismo no fue posible establecer una clara concordancia entre estos resultados y la descripción de las especies.

La descripción fenotípica de este trabajo es muy consistente, al someter los datos a un análisis factorial multivariante. Los factores seleccionados explican aproximadamente el 60,13 % de la variabilidad total. La proyección de los aislados de *Botrytis* sobre el plano de los tres factores separó claramente la colección en tres grupos, en los cuales se incluye a *B. fabiopsis*, incluido el aislado de referencia respectivo.

Por otro lado, se llevó a cabo una evaluación de la capacidad del hongo para infectar a la planta huésped. Aunque nuestro interés se centra en caracterizar los aislados de *B. cinerea* obtenidos sobre la especie de orquídeas a partir de la cual han sido recogidos, se evaluó estos aislados en plantas de orquídeas y en dos hortalizas. La literatura menciona que estos trabajos se deben realizar en plantas tipo como las judías (Martínez, 2013). Si bien resultan claras las diferencias de agresividad observadas, se llevó a cabo un análisis estadístico para determinar si existían diferencias significativas entre las medias mediante un análisis de la varianza para un factor (ANOVA). Este análisis demostró la existencia de diferencias significativas de virulencia entre los aislados estudiados.

La utilización de los cebadores universales ITS1 e ITS4 para el análisis molecular fue muy importante ya que permite observar una región importante de ARN

ribosomal y las relaciones entre especies congéneres y estrechamente relacionadas, además de ser considerada como la región de ADN más ampliamente secuenciado en los hongos. Ha sido por lo general más útil para la sistemática molecular a nivel de especie, pero incluso dentro de las especies, y en este trabajo permitió diferenciar las especies existentes de *Botrytis*. Para nuestro trabajo se depuraron las secuencias y se trabajó solamente las regiones ITS1, ITS2, para poder tener un acercamiento más preciso para la identificación, obteniéndose así secuencias idénticas entre 99% y 100%, para *Botrytis cinerea* y una especie de *Botrytis fabiopsis* al ser comparadas con otras secuencias disponibles para este grupo de hongos en el GENBANK. Estos resultados coinciden con los de Saito (2014), quien los utilizó estos marcadores para determinar las especies de *Botrytis cinerea* y *Botrytis pseudocinerea*.

El análisis filogenético basado en los datos combinados de secuencia de ADN de los dos genes nucleares (ITS1-ITS4) (White *et al.*, 1990), mostró que *B. fabiopsis* está estrechamente relacionada con *B. cinerea* y *B. elliptica*, pero lejanamente relacionado con *B. fabae*. El análisis de secuencias de genes que codifican proteínas y necrosis inducidas con etileno indicaron que *B. fabiopsis* es distinta de *B. galantina* (Li *et al.*, 2011). La inoculación de haba con conidios de *B. fabiopsis* causa síntomas típicos de mancha chocolate con una gravedad de la enfermedad similar a la causada por *B. fabae*, pero significativamente mayor que la causada por *B. cinerea*. Este estudio sugiere que *B. fabiopsis* es un nuevo agente causal de la mancha chocolate del haba (*Vicia faba*) (Jin y Wu, 2015).

Para hacer un análisis de la población de los aislados de *Botrytis* se seleccionaron tres parejas de cebadores microsatélites que habían sido probados en otros trabajos y que además mostraban un alto polimorfismo. Con un análisis del coeficiente de DICE se analizó la similaridad entre los aislados para determinar la presencia de genotipos iguales dentro de cada grupo de huéspedes, así como lugares de procedencia de los mismos. Se determinaron tres grupos, en los cuales *Botrytis fabiopsis* comparte un grupo grande con *B. cinerea*.

Los análisis de diferenciación genética mostraron diferencias significativas entre los grupos diferenciados 1 y 2. Al revisar las poblaciones de acuerdo al tipo de hospedero, se evidencia que entre los aislados de orquídeas y hortalizas existe una diferencia pequeña; comparando esta población de aislados de orquídeas con los aislados de frutales, si se puede mencionar que existe una diferencia génica grande entre estos.

Estos resultados nos muestran que los agrupamientos no se dan por el tipo de hospedero ni por lugar de procedencia, lo que nos permite sugerir que la especialización de *Botrytis* no está dada por el tipo de cultivo que el hongo infecte. En este contexto Zhugua (2005) también menciona en su trabajo, que la especificidad de *Botrytis* no está dada por los hospederos, pero eso no descarta la posibilidad de que exista especificidad con algún cultivo.

En el análisis de diferenciación genética se ha determinado que ésta no fue muy consistente al tratarse de pocos marcadores moleculares. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Dutech, (2006), se demuestra mucha consistencia entre estos valores, ya que muestran unos valores menores a los límites establecidos (Zane, 2002) y a los obtenidos con RAPDS en aislados de *Lycopersicon solanaceraum* y *Cucumis sativa*.

Finalmente, se detectó un valor bajo de flujo génico ($N_m = 1.30$) en la población, considerándose que la migración génica entre los aislados de *Botrytis* dentro de la región, no fue muy frecuente, teniendo en cuenta que la separación geográfica entre las poblaciones de Orquídeas y las poblaciones de hortalizas y frutales es de 300 km aproximadamente.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo se resumen a continuación:

1. *Botrytis* es un género de hongos patógenos ampliamente distribuido tanto en zonas geográficas como en huéspedes en todo el mundo, siendo muy estudiada especialmente en cultivos de vid, tomate y fresa. Este trabajo contribuye por primera vez a la caracterización morfológica y molecular de un grupo de aislados de *Botrytis* colectados de orquídeas cultivadas en invernadero, plantas hortalizas, frutales y ornamentales.
2. Se identificó a *Botrytis cinerea*, como el patógeno causante del moho gris o podredumbre gris que afecta a plantas de orquídeas, ornamentales y hortalizas. Este es el primer reporte para Ecuador tanto en orquídeas como en otras especies ornamentales y hortalizas.
3. Se identificó además *Botrytis fabiopsis* aislada de una planta de *Pelargonium* sp., aunque hasta ahora esta especie de *Botrytis* era conocida como específica para el género *Vicia*. El hospedero de donde se tomó el aislado proviene de Loja.
4. Las poblaciones de aislados de *B. cinerea* recogidos de las plantaciones de orquídeas sembradas en invernadero, está integrada por dos morfotipos, de acuerdo a las características morfológicas evaluadas.
5. Además desarrollaron estructuras sexuales en condiciones heterotálicas, pudiéndose observar la presencia de estructuras como micro conidios y micro conidióforos de *Botryotinia fuckeliana* y la presencia de esclerocios, considerado como la estructura esencial dentro de la reproducción sexual del hongo. Los apotecios no se desarrollaron en nuestros aislados.

6. Los síntomas de *Botrytis cinerea* variaron en la mayoría de los casos, según el hospedero. Se caracterizaron por presentar atizonamientos de color marrón claro en las hojas y lesiones humedecidas, especialmente de las flores y bulbos.; en el caso del aislado de *Botrytis fabiopsis*, el daño que ocasiono era pudrición en flores de *Pelargonium*.
7. La capacidad germinativa de los conidios de *Botrytis* es alta por lo que se considera este aspecto como importante, relacionado con la capacidad patogénica del hongo para infectar a las plantas, aspecto importante para la correcta aplicación de modelos de infección predictivos.
8. La utilización de los cebadores universales ITS1 ITS4, considerada como la región de ADN más ampliamente secuenciado en los hongos, ha permitido identificar las dos especies de *Botrytis* descritas.
9. Con los micro satélites escogidos no se encontró una diferencia genética significativa entre los diferentes grupos de aislados de poblaciones de orquídeas, ornamentales, hortalizas y frutales con polimorfismos de los 52 aislados de 58 % y 61 % entre aislados de *B. cinérea* y de *B. fabiopsis*
10. En el análisis de diferenciación genética se ha determinado que ésta no fue muy consistente al tratarse de pocos marcadores moleculares, se obtuvo una diferencia genética muy grande entre los aislados de orquídeas en relación a los aislados de hortalizas y frutales.
11. La migración génica entre los aislados de *Botrytis* dentro de la región, no fue muy frecuente, teniendo en cuenta que la separación geográfica entre las poblaciones de Orquídeas y las poblaciones de hortalizas y frutales es de 300 km aproximadamente.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre V D; Anrango MJ ; N. (Noviembre de 2012). *Repositorio.espe.edu.ec*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2015, de Escuela Superior del ejercito: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/6845/1/AC-B-ESPE-034935.pdf>
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. California: Elievier Academic Press.
- Abbot, P. (2001). Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science (Online)*, 1(Table 1), 8. [http://doi.org/10.1672/1536-2442\(2001\)001\[0001:iapvii\]2.0.co;2](http://doi.org/10.1672/1536-2442(2001)001[0001:iapvii]2.0.co;2)
- Benito, E. P., & Arranz, M. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Plant Molecular Biology*, 43–46.
- Beever, R. E. (1999). A major gene controlling pathogenicity in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). . *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54, 13-53.
- Beever R.S., W. P. (2004). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. En W. B. En: Elad Y., *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (págs. pp. 29-52). Dordrecht, Holanda,: Kluwer Academic Publishers, .
- Bornet, C. M. (2002). Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri and tetra nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis* L.). *Genome*, 890-896.
- Bornet, B., & Branchard, M. (2004). Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related *Brassica* taxa and *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas*, 140(3), 245–248. <http://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2004.01737>.
- Brierley, W. B. (1918). The microconidia of *Botryotinia cinerea*, Studies from the Pathological Laboratory VII. Bulletin of Miscellaneous information . Royal Botanical Gardens, Kew, 129-146
- Brown, J. K. M., and M. S. Wolfe. (1990). Structure and evolution of a population of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Plant Pathol.* , 39:376-390.
- Buckley, P. S. (1966). Electro microscopy *Botrytis cinerea* conidia . *Journal of Bacteriology*, 91: 2037-2044.
- Chardonnet, C. O., Sams, C. E., Trigiano, R. N., & Conway, W. S. (2000). Variability of Three Isolates of *Botrytis cinerea*

- Affects the Inhibitory Effects of Calcium on this Fungus. *Phytopathology*, 90(7), 769–74. <http://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.7.769>
- Brunet-simon, A., Duclert, A., Fillinger, S., Fortini, D., Lebrun, I., Pe, P. Le, ... Levis, C. (2005). Expressed sequence tags from the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, 139–146. <http://doi.org/10.1007/s10658-004-1429-4>
- Burt, A., A. C. Deidre, G. I. Koenig, T. J. White, and J. W. Taylor. . (1996). . Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:770-773. DI LENNA, I?, I? M. MA.
- Chang K., F. a. (2005). First report of Botrytis Blight Caused by *Botrytis cinerea* on Coneflowers. *Plant disease*, 89: 910.
- Chardonnet, C. O., Sams, C. E., Trigiano, R. N., & Conway, W. S. (2000). Variability of Three Isolates of *Botrytis cinerea* Affects the Inhibitory Effects of Calcium on this Fungus. *Phytopathology*, 90(7), 769–74. <http://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.7.769>
- Clark, C. A. (1976). Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves. *Phytopathology*, 66: 1279-1289.
- Coley-Smith, J. (1980). *The Biology of Botrytis*. Published by Academic Press Inc., 54-56.
- Delcan, J., & Melgareja, P. (2002). Mating behaviour and vegetative compatibility in Spanish populations of *Botryotinia fuckeliana*. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 391–400.
- De llanos R,. Fernandez-Espinar. (2003). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8 S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacer. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85:175-185.
- Dressler., R. (1990). The Spiranthideae grade or subfamily Lindeleyana. *Microbiology*, 61:260-265.
- DresslerL., R. (1993). *Phylogeny and clasification of the orchid family*. Cambridge University Press.
- Dingra O. y Sinclair J. B., O. D. (1995). *Basic Plant Pathology Methods* . Boca Raton: Lewis publisher CRC.

- Doss R.P. Potter S.W., S. A. (1995). Adhesion of germings of *Botrytis cinerea*. Applied and Enviromental.
- Doss, R. D. (2003). Melanin in the extracellular matrix of germings of *Botrytis cinerea* . *Phytochemistry*, 63:687-691.
- Elad Y. , Williamson B., Tudzynski P. y Delen N. (2004). *Botrytis* spp, and diseases they cause in agricultural system . Academic Publisher, 1-8.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. (2007). *Botrytis*: Biology, pathology and control, 1–403. <http://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3>
- Ellis, M. (1971). *Botrytis*. Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Espinosa de los Montes, M. C. (2006). Estudio d ela variabilidad genetica y organizacion cromosomica en el hongo fitopatogeno *Botrytis cinerea*. Cadiz-España.
- Faretra, F., Antonacci, E. (1987). Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz under controlled environmental conditions. *Pytopathology Medit*, 26: 29-35.
- Faretra, F., Antonacci, E., & Pollastro, S. (1988). Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*, 134(9), 2543–2550. <http://doi.org/10.1099/00221287-134-9-2543>
- Finding, 2010. Armonía Ecuador. Finding especies, 105 pp
- Flor, H. (1955). Host-parasitic interaction in flax-rust-its genetics and other implications. *Phytopathology*, 45:680-685.
- Fournier, E., & Giraud, T. (2008). Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1), 122–32. <http://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01462.x>
- Fukumori, Y., Nakajima, M., & Akutsu, K. (2004). Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 70(5), 256–260. <http://doi.org/10.1007/s10327-004-0124-9>
- Gaforio. (2009). Hongos implicados en la yesca y en la enfermedad de Petri en vid (*Vitis vinifera* L.) Biología, control y metodos de detccion. Madrid.

- Gardes M. y Bruns T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology*, 2:113-118.
- Garibaldi, A., Bertetti, D., Pensa, P., & Gullino, M. L. (2009). First report of gray mold caused by *Botrytis cinerea* on *stevia rebaudiana* in Italy. *Plant Disease*, 93(3), 318.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., & Brygoo, Y. (1997). RFLP markers show genetic recombination in.
- Gargas AM, Trest MT; Christensen y col. (2009). *Geonmyces destructans* sp, associated with bat white nose syndrome. *Mycotaxon*, 108:147-154.
- Georgy, P. (1949). Studies *Sclerotinia* and *Botrytis* De Bary's description and specimens of *Peziza fuckeliana*. *Trans. British Mycol Soc.*, 32:1.
- Groves JW, y Drayton FL. (1939). The perfect stage of *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 31: 485-489.
- Groves JW. y Loveland CA. (1953). The connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 45:415-425.
- Hammer, H. D. (2001). Paleontological Staticstics Software Package for educational and Data Analysis. *Palaentologia Electronica*, 4: 9.
- Hansen, H. y. (1932). The mechanism of variation in imperfect fungi *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 22:953-954.
- Hennebert, G. (1973). *Botrytis* and *Botrytis* like genera. *Persoonia Molecular. Phylogeny and Evolution on fungi.*, 183-204.
- Holz, G. C. (2004). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. En E. y. col, *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (pág. 9:27). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Jarvis WR. (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity. A guide to the literature. Ottawa: Departamento of Agriculture.
- Jarvis J. (1980). Taxonomy. En J. Coley Smith, J. WR, & V. K., *The Biology of Botrytis* (pág. 318). New York: Publisher by Academic Press.
- Jin W. & Wu F. (2015). Characterization of miRNAs associated with *Botrytis cinerea* infection of tomato leaves. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1.

<http://doi.org/10.1186/s12870-014-0410-4>

- Karakaya A; Bayraktar H. (2010). Botrytis Disease of Tea in Turkey. *Journal Phytopathology*, 158:705-707.
- Kasuyuki M; Yoshio K. (2010). Appearance of new leaf rots disease on common ice plant. *Journal Gen Plant Pathology*, 76:303-309.
- Kirschner, R., & Piepenbring, M. (2007). Two new hyphomycetes parasitic on leaves of *Maianthemum* species in Panama. *Mycological Progress*, 7(1), 21–29. <http://doi.org/10.1007/s11557-007-0549-6>
- Keisuke T; Hiroyuk S. (2008). Gray mold of pearl lupine caused by *Botrytis cinerea*. *Genetics Plant Pathology*, 74:405-407.
- Koh YJ, Jung S, Hur JS. (2003). Current status of occurrence of major diseases on kiwifruits and their control in Korea. . *Acta Horticulturae*, 610, 437–443.
- Latorre, B.A. y M.E. Rioja. (2002.). Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. . *Cien. Inv. Agr. (Chile)*, 29:67-72.
- Lilja, A.; Poteri, M.; Petäistö, R. L.; Rikala, R.; Kurkela, T.; Kananen, R. (2010). Fungal diseases in forest nurseries in Finland. . *Silva Fenn*, 44, 525–545.
- Linington S y Pritchard HW. (2001). Gene Banks . *Encyclopedia of Biodiversity* Academic Press, 3:165-181.
- Meisel JF y Woodward CL. (2005). Andean orchids conservation and the role of private lands a case study from Ecuador . *Selyana*, 26: 49-57.
- Michailides, T. J., & Elmer, P. A. G. (2000). Botrytis gray mold of kiwifruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. *Plant Disease*, 84(3), 208–223. <http://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.208>
- Mirzaei S; Mohammadi G y Sham M. (2007). Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Technology*.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E. M., Shams-Bakhsh, M., & Safaie, N. (2008). Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. *Journal of Phytopathology*, 156, 21–28. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01317.x>
- Michelli, I. (1729). *Botrytis*. En Ellis, *Dematiaceae Hyphomycetes* (pág. Ken Surrey). CAB.

- Milgroom, M. G. (1992.). DNA fingerprinting and analysis of population structure in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*, 131:297-306.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E. M., Shams-Bakhsh, M., & Safaie, N. (2008). Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. *Journal of Phytopathology*, 156, 21–28. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01317.x>
- Monteros, M. C. E. de los. (2006). Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, 1–223. Retrieved from papers3://publication/uuid/68E62FC1-B82D-4ABD-858A-8B1EFF27CAB6
- Moyano, C., Alfonso, C., Gallego, J., Raposo, R., & Melgarejo, P. (2003). Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. *European Journal of Plant Pathology*, 109(5), 515–522. <http://doi.org/10.1023/A:1024211112831>
- Moshin, G. (1990). Le cycle sexue in Vitro de *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) forme parfaite de *Botrytis cinerea* (Pers. Determinisme optimisation des conditions d obtention). Lille: Universidda de Lille.
- Muñoz G; Hinrichsen P; Brygoo Y. y Giraud T. (2002). Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research*, 594-601.
- Muñoz, G., & Campos, F. (2013). Genetic characterization of *Botrytis cinerea* isolates collected from pine and eucalyptus nurseries in Bio-Bio Region, Chile. *Forest Pathology*, 43(6), 509–512. <http://doi.org/10.1111/efp.12057>
- Nair NG y Nadtotchei. (1986). Sclerotia of *Botrytis* as a Source of Primary Inoculum for But Rot of Graapes in New Sout Wales, australia. *Journal Phytopathology* , 119:42-51.
- Nei, M. (1978). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press New York.
- Oliveira R; Moral J. y col. (2005). Caracterization morfologica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. *Boletin de Sanidad vegetal, Plagas*, 31:531-545.
- Peakall R, y Smouse PE. (s.f.). *genetic analysis in Excel Populations genetic software for teaching and research an update*.

- Pekeall RS; Smouse PE. (2012). GenAlex 6.5: genetic analysis in Excel, populations genetics for teaching and research an update. *Bioinformatics*, 28:2537-2539.
- Pinto PM; Resende MA; Koga-Ito C; Ferreira JA; Tendlar M. (2004). Identification of candida species in immunocompromised and seriously diseased patients. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 514-520.
- Sambrook J; Fritsch EF; Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Laboratory Press.
- Selosse, M. A., Setaro, S., Glatard, F., Richard, F., Urcelay, C., & Weiß, M. (2007). Sebacinaleae are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist*, 174(4), 864–878. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02064.x>
- Shirane N; Masuko M; Hayashi Y. (1988). Nuclear behaviour and division in germinating conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 78:1627-1630.
- Simone GW; Burnett HC. (2002). Diseases Caused by Bacteria and Fungy . En W. JB, *Orchid pest and diseases* (págs. 50-73). Florida: Amerinac Orchids.
- Sinchire R; Rojas J. (2014). Identificación de hongos parásitos en especies de *Dracula* (Orchidaceae) sembradas bajo invernadero, en el Sur de Ecuador. Loja, Loja, Ecuador. *Actualidades biológicas*; ISSN 0304-3584 (pág. 104). Medellín: Instituto de biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas.
- Soares, D. J. (2008). Grey mould caused by *Botrytis cinerea* on *Oxalis latifolia* from Brazil, 85–86.
- Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. a. L. (2006). AFLP analysis of genetic diversity in populations of *Botrytis elliptica* and *Botrytis tulipae* from the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 117(3), 219–235. <http://doi.org/10.1007/s10658-006-9085-5>
- Swart I; Coertse S. (2002). First record of *Botrytis* Flower Blight Caused by *Botrytis cinerea* on geraldton Waxflower in South Africa. *Plant Disease*, 86:09-10.
- Taga M; Murata M. (1994). Visualization of mitotic chromosomes in filamentous fungi by fluorescence staining and fluorescence in situ hybridization. *Chromosoma*, 103: 408-413.
- Tello, L. (1998). Alteraciones en nacimiento y enraizamiento de algunas plantas

ornametales de la comunidad de Madrid. Universidad politecnica de Madrid: Teis doctoral.

- Urbasch, I. (1985). Ultrastructural studies on the microconidia of *Botrytis cinerea* Pers. and their phialoconidial development. *Journal of Phytopathology*, 237, 229–238. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.1985.tb00800.x/full>
- Valencia RN; Pitman; S.Leon-Yanes y Jorgensen. (2000). Libro rojo de plantas endemicas del Ecuador. Quito: Publicaciones del Herbario QCA.
- Vallejo, I., Carbú, M., Rebordinos, L. & Cantoral, J. M. . (2003a). . Virulence of *Botrytis cinerea* strains on two grapevine varieties in south-western Spain. . *Biologia*, Bratislava, 58, 1067-1074.
- Vander Pijil and Dodsosn. (1966.). *Orchid Flowers: The Pollinitation and Evolution*. Univ of Miami Pr; First edition, 213 .
- van Baarlen, P., M. Staats, and J. A. L. van Kan. 2004. (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology*.
- Walter, M., Boyd-Wilson, K. S. H., Perry, J. H., Elmer, P. A. G. & Frampton, C. M. . (1999). Survival of *Botrytis cinerea* conidia on kiwifruit. *Plant Pathology*, 48, 823-829.
- Watson, J. (2002). *Orchid Pest and Diseases*. American orchid Society.
- Whetzel, H. H. ((1945)). A synopsis of the genera and species of the Sclerotinaceae, a family of stomatic inoperculate Discomycetes. . *Mycologia*, 37, 648-714.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. a L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417>.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. . ((1990)). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applicati*. White (Eds.),.
- Woodward JE; TB, Brenneman; col, Kemerait RC y. (2005). First Report of *Botrytis* Blight of Peaunut Caused by *Botrytis cinerea* in Georgia. *Plant Disease*,

89:910.

- Yoder OC; Barbara V; ChumLey. (1986). Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. The american Phytopathological Society, 97-100.
- Yohalem DS;NielsenK y Nicolaisen M. (2003). Taxonomic and nomenclatural clarification of the onion neck rotting *Botrytis* species. *Mycotaxon*, 85-175-182.
- Zhang, J., Wu, M.-D., Li, G.-Q., Yang, L., Yu, L., Jiang, D.-H., ... Zhuang, W.-Y. (2010). *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. *Mycologia*, 102(5), 1114–1126. <http://doi.org/10.3852/09-217>
- Zhang, J., Wu, M.-D., Li, G.-Q., Yang, L., Yu, L., Jiang, D.-H., Zhuang, W.-Y. (2010). *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. *Mycologia*, 102(5), 1114–1126. <http://doi.org/10.3852/09-217>
- Zietkiewicz E1, Rafalski A, L. D., Zhang, J., Zhang, L., Li, G.-Q. Q., Yang, L., Jiang, D.-H. H., Abbot, P. (2007). Two New Primers Highly Specific for the Detection of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. *European Journal of Plant Pathology*, 9(1), 1–10. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>
- Zhonghua Ma, M. T. (2005). Genetic Structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Disease*, 1082-1089.
- Zomlefer Wendy B. (1994). *Guide to Flowering Plant Families.*,. University of North Carolina Press, 430.

VII. ANEXOS

ANEXO 1

1. PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN

2. Moler el micelio de los hongos bajo nitrógeno líquido a un polvo fino usando un molino de tejidos o mortero. Transferir el polvo y el nitrógeno líquido a un tubo de 1,5 ml y dejar que el nitrógeno líquido se evapore, sin dejar que la muestra se descongele y continúe con el paso 2.
3. Añadir 400 μ l de tampón de AP1 y 4 μ l de RNasa A (solución madre 100 mg / ml) a una máximo de 100 mg de muestra (peso húmedo) y agitar con un Vortex vigorosamente.
4. Incubar la mezcla durante 10 min a 65 ° C, dar vortex de 2-3 durante la incubación.
5. Añadir 130 μ l de tampón de AP2 al lisado, mezcla, e incubar durante 5 min en hielo.
6. Aplicar el lisado a la columna de centrifugación QIAshredder (lila) sentado en una colección de 2 ml tubo y centrifugar durante 2 min a velocidad máxima.
7. Transferir Fracción de flujo del paso 5 a un nuevo tubo nuevo (no suministrado) y sin alterar recoger el sedimento de hebras de pelets
8. Añadir 1,5 μ l de volumen de tampón AP3 / E para el lisado aclarado y mezclar mediante pipeteo.
9. Aplicar 650 μ l de la mezcla de la etapa 7, incluyendo cualquier precipitado que puede haber formado en la columna dando un mini vortex en la columna de DNeasy de 2 ml (suministrado), centrifugar durante 1 min a ≥ 6000 xg (corresponde a ≥ 8000 rpm para la mayoría de microcentrifugas) y deseche de flujo continuo
10. Repita el paso 8 con la muestra restante. Deseche el filtrado * y guarde el tubo.

11. Colocar la columna DNeasy en un nuevo tubo de recogida de 2 ml () , añadir 500 µl de tampón AW a la columna DNeasy y centrifugar durante 1 min a $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm).
12. Añadir 500 µl de tampón AW a la columna y centrifugar el DNeasy durante 2 min a máxima velocidad para secar la membrana.
13. Transferir la columna DNeasy a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml (no suministrado) y pipeta de 100 µl de precalentado (65 ° C) Buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente y centrifugar durante 1 min a $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm)

ANEXO 2

Tabla de Componentes Principales

		Componente	Componente	Componente
Fila	Etiqueta	1	2	3
1	1	2,09498	1,01981	1,4081
2	3	0,453307	-0,395699	-0,246084
3	4	1,37113	-0,394206	-1,48908
4	5	-1,96946	-0,933539	-1,76849
5	6	1,11672	-1,08354	0,143611
6	7	1,79743	-1,60644	-0,952797
7	8	1,34025	0,377266	-0,758206
8	9	-0,228069	-1,35219	-1,1496
9	10	0,321853	0,31394	-0,798783
10	11	1,53907	-0,22163	-0,586327
11	13	0,226759	1,50585	-0,264301
12	15	0,552602	0,392831	0,204396
13	16	0,699095	2,15271	0,104687
14	17	-0,0303805	0,555862	1,81301
15	18	-0,958737	2,02666	-0,439313
16	19	0,377315	0,937425	0,35943
17	20	-0,327362	-0,12625	-2,2125
18	21	-0,951333	-0,858261	-0,494371
19	22	-0,511463	0,513666	0,37777
20	23	0,650796	-2,51131	-0,864859
21	24	0,69636	-1,00992	-0,226294
22	25	-0,13917	1,61825	-0,756724
23	26	0,397654	-0,0334753	0,0528325
24	27	-0,99618	-1,00774	-0,53884
25	28	0,37272	0,513399	0,232439
26	29	0,53509	-0,270151	0,0387269
27	30	-1,6187	2,52849	-1,44694
28	31	0,8168	-1,3165	1,08327
29	32	-0,921382	0,715119	0,639404
30	33	1,38677	-0,0371866	-0,097882
31	34	1,92202	0,0155286	0,115052
32	35	0,877721	0,716826	0,482294
33	37	0,171214	0,0364126	0,294203
34	36			
35	38	-1,29216	0,67257	-0,545597
36	39	-2,18309	-0,384331	-0,814155
37	40	-0,830801	0,0919711	-1,84398
38	41	-0,000008097	-0,0804253	0,352462

		9		
39	42	0,0570759	-0,67297	0,958788
40	44	-0,342256	-2,04009	0,263749
41	45	0,194715	0,313099	1,33497
42	46	-1,29709	-1,00945	0,981869
43	48	-2,32036	-1,02792	1,0081
44	49	-0,808473	-1,78324	1,04038
45	50	0,51434	0,140504	1,53736
46	51	-1,786	-1,1315	0,744105
47	52	0,0459281	0,284716	0,628905
48	53	-1,39019	1,18581	2,5059
49	54	-3,49225	1,25598	-0,162712
50	55	-0,491515	-1,97201	0,632018
51	56	0,43703	0,684795	1,95722
52	58	1,11254	0,582348	-0,152671
53	59	1,07436	0,421213	0,396941
54	60	0,360728	0,544595	-1,36094
55	61	1,37205	1,14234	-1,72055