

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis de la interacción *Rosa* spp. – *Botrytis cinerea* Pers.: sintomatología, análisis de la expresión de genes de resistencia “in planta” y proceso infeccioso del patógeno

Disertación previa a la obtención del título de
Licenciado en Ciencias Biológicas

ESTEBAN ANDRÉS ORELLANA VINUEZA

QUITO, 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato, Esteban Andrés Orellana Vinueza titulada: “Análisis de la interacción *Rosa* spp. – *Botrytis cinerea* Pers.: sintomatología, análisis de la expresión de genes de resistencia “in planta” y proceso infeccioso del patógeno” ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M.Sc. Alexandra Narváez

Directora de la Disertación

Quito, 21 de febrero de 2011

A mi madre,

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo a mi madre por su amor, amistad, esfuerzo, ejemplo y aliento, por siempre estar ahí, apoyándome y exigiendo lo mejor de mí, por ayudarme a alcanzar mis metas. Le agradezco por hacer de mí el hombre que soy ahora.

A Alexandra Narváez por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por guiarme durante el mismo y por su amistad y ayuda durante los últimos años, por permitirme involucrarme activamente en algunos proyectos del laboratorio y por alentarme a continuar trabajando e introducirme en el fascinante mundo de la biología molecular.

A Paola Montenegro por su amor, entendimiento y apoyo durante el tiempo que duró esta investigación. También le agradezco por su compañía mientras se realizaron los ensayos en invernadero. Le agradezco por siempre estar ahí para mí, por darme ánimo y ayudarme a seguir cuando no veía una salida.

A Lien González por sus valiosos consejos y ayuda para la realización de este estudio, por alentarme a continuar. También por su valiosa crítica para enriquecer y mejorar la presentación de este trabajo.

A Iliana Alcócer y Maria Eugenia Ordóñez por sus valiosos comentarios y correcciones sobre este trabajo.

A toda mi familia por su apoyo y palabras de aliento, de manera especial a mi tía Silvia Vinuesa, por ayudarme y apoyarme en la realización de los ensayos.

Al personal de la Empresa Esmeralda Breeding S. A., especialmente a Ana María Quiñones y Fernando Ponce, quienes me aconsejaron y me brindaron el material biológico sin el cual esta investigación no hubiera sido posible.

A Carolina Portero por su inmensa ayuda, por acompañarme durante la mayor parte de esta investigación haciendo el trabajo en laboratorio más agradable. También agradecerle por sus palabras de aliento y por siempre apoyarme.

A la Dra. Rosario Paredes y a la Dra. Germania Moreta por permitirme realizar parte de mi investigación en las instalaciones del Laboratorio de Genética Médica del Hospital Militar.

A Ana Troya por toda su ayuda y por haber sido mi tutora en el laboratorio. Le agradezco por su confianza y enorme cariño.

A Mauricio Vega por sus consejos y por su ayuda con algunos análisis y gráficas de esta investigación.

Quiero agradecer a Stephany Villota, Diana Bautista, y a todos mis amigos y compañeros; quienes me apoyaron y de alguna forma contribuyeron a esta investigación.

Agradezco a Juan Venegas, Gabriela Zambrano y Juan Carlos Collantes por su diligente ayuda para proporcionarme los reactivos y materiales necesarios para terminar esta investigación

Esta investigación fue financiada por la PUCE en colaboración con la empresa Esmeralda Breeding S.A.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1 DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD “PODREDUMBRE GRIS” Y PREVENCIÓN	7
3.1.1 DESCRIPCIÓN DE <i>Botrytis cinerea</i>	7
3.1.2 PROCESO DE INFECCIÓN	9
3.1.3 MANEJO	10
3.2 RESPUESTAS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS	10
3.3 CAMBIOS EN LA EXPRESION GÉNICA EN RESPUESTA A PATOGENOS....	14
3.4 JUSTIFICACIÓN.....	15
3.5 OBJETIVOS.....	16
3.5.1 GENERAL.....	16
3.5.2 ESPECÍFICOS.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Botrytis cinerea</i>	18
4.1.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL HONGO.....	18
4.1.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....	19
4.1.3 ANÁLISIS POR PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE PATOTIPOS	20
4.2 INFECCIÓN CON <i>B. cinerea</i> DE LOS GENOTIPOS DE <i>Rosa spp.</i> BAJO ESTUDIO	22

4.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO	22
4.2.2 ENSAYOS DE INOCULACIÓN CON <i>B. cinerea</i>	24
4.2.3 COMPROBACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA PRESENCIA DE <i>B. cinerea</i> MEDIANTE TINCIÓN	26
4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA.....	27
4.3.1 SELECCIÓN DE GENES DE DEFENSA Y DISEÑO DE INICIADORES PRELIMINARES	27
4.3.2 EXTRACCIÓN DE ARN DEL TEJIDO VEGETAL.....	28
4.3.3 SÍNTESIS DE LA CADENA COMPLEMENTARIA DE LOS ARN MENSAJEROS	29
4.3.4 OPTIMIZACIÓN DE PCR PARA LOS INICIADORES PRELIMINARES	30
4.3.5 RT-PCR DE GENES COMO POSIBLES MARCADORES DE RESPUESTA DE DEFENSA A PATÓGENOS.....	32
4.3.6 VALIDACIÓN DEL GEN CONSTITUTIVO.....	35
4.3.7 PCR SEMI-CUANTITATIVA.....	36
5. RESULTADOS	38
5.1 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Botrytis cinerea</i>	38
5.1.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL HONGO	38
5.1.2 EXTRACCIÓN DE ADN	38
5.1.3 ANÁLISIS POR PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE PATOTIPOS.....	39
5.2 INFECCIÓN CON <i>B. cinerea</i> DE LOS GENOTIPOS DE <i>Rosa spp.</i> BAJO ESTUDIO	40
5.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO	40
5.2.2 ENSAYOS DE INOCULACIÓN CON <i>B. cinerea</i>	41

5.2.3 COMPROBACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA PRESENCIA DE <i>B. cinerea</i> MEDIANTE TINCIÓN	44
5.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE POSIBLES GENES DE DEFENSA	45
5.3.1 SELECCIÓN DE GENES DE DEFENSA Y DISEÑO DE INICIADORES PRELIMINARES.....	45
5.3.2 EXTRACCIÓN DE ARN DEL TEJIDO VEGETAL	45
5.3.3 SÍNTESIS DE LA CADENA COMPLEMENTARIA DE LOS ARN MENSAJEROS	46
5.3.4 OPTIMIZACIÓN DE PCR PARA LOS INICIADORES PRELIMINARES....	46
5.3.5 RT-PCR DE GENES MARCADORES DE RESPUESTA DE DEFENSA A PATÓGENOS	47
5.3.6 VALIDACIÓN DEL GEN CONSTITUTIVO	48
5.3.7 PCR SEMICUANTITATIVA	48
6. DISCUSIÓN	50
7. CONCLUSIONES	61
8. LITERATURA CITADA.....	62
9. FIGURAS	73
10. TABLAS	99
11. ANEXOS	106

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fotografías de <i>Botrytis cinerea</i>	74
Figura 2. Preparación del inóculo.....	75
Figura 3. Cámara de conteo hemacitométrico o Neubauer	76
Figura 4. Prueba de contaminación del ARN total de <i>Rosa</i> spp. con ADN genómico mediante PCR	77
Figura 5. Calidad y concentración del ADN extraído de <i>Botrytis cinerea</i>	78
Figura 6. Productos de la amplificación de los retrotransposones <i>Flipper</i> y <i>Boty</i>	79
Figura 7. Prevalencia de los distintos patotipos de <i>Botrytis cinerea</i>	79
Figura 8. Patotipos identificados por genotipos de <i>Rosa</i> spp	80
Figura 9. Plantas susceptibles a la infección por patógenos 40 días después del inicio del ensayo	81
Figura 10. Plantas más resistentes a la infección por patógenos 40 días después del inicio del ensayo	82
Figura 11. Fotografías del progreso de la enfermedad “podredumbre gris”	83
Figura 12. Curvas de progreso de la enfermedad de diez genotipos de <i>Rosa</i> spp.....	86
Figura 13. Área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) para los diez genotipos de <i>Rosa</i> spp. estudiados	86
Figura 14. Comprobación de la infección de <i>Botrytis cinerea</i> en tejidos de <i>Rosa</i> spp	87
Figura 15. Verificación de ARN en gel de agarosa nativo al 1,2 %.....	89
Figura 16. Determinación de la temperatura de anillamiento óptima para EF1 α con los iniciadores preliminares.....	89
Figura 17. Determinación de la concentración de magnesio óptima y potenciadores de PCR para EF1 α (~100bp) con los iniciadores preliminares.	90

Figura 18. Curvas de amplificación	91
Figura 19. Determinación del número de ciclos óptimo de PCR para EF1 α con los iniciadores preliminares.....	92
Figura 20. Optimización de los iniciadores definitivos.....	92
Figura 21. Validación del gen EF1 α como gen constitutivo.	93
Figura 22. Medias calculadas a partir de las áreas de los picos de intensidad para las amplificaciones del gen EF1 α	93
Figura 23. Productos de PCR de los genes marcadores de respuesta a patógenos de las plantas que fueron inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i>	94
Figura 24. Expresión relativa temporal del gen de la glucanasa en el genotipo resistente y en el susceptible.....	95
Figura 25. Expresión relativa temporal del gen de la quitinasa en el genotipo resistente y en el susceptible.....	96
Figura 26. Productos de PCR de los genes marcadores de respuesta a patógenos de las plantas que no fueron inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i>	97
Figura 27. Prueba de contaminación del ADNc de <i>Rosa</i> spp. con ADN genómico mediante PCR.	98

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Secuencias de los iniciadores empleados para detectar la presencia de los retrotransposones “Boty” y “Flipper”	100
Tabla 2. Códigos de los diez genotipos de <i>Rosa</i> spp. empleados para el estudio.	101
Tabla 3. Información sobre los iniciadores preliminares.	102
Tabla 4. Cocteles de reacción utilizados para optimizar los componentes de la PCR para los iniciadores definitivos.	103
Tabla 5. Resultados del mejor alineamiento de las secuencias obtenidas para los retrotransposones de <i>Botrytis. cinerea</i> y los genes de defensa en <i>Rosa</i> spp.....	104
Tabla 6. Información sobre los iniciadores definitivos.	105

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Diagrama del flujo de trabajo de la investigación	107
Anexo 2. Fases de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	108
Anexo 3. Secuencias consenso	109
Anexo 4. ANOVA de los genotipos de Rosa por sus AUDPC	111
Anexo 5. Subgrupos los genotipos de <i>Rosa</i> según sus AUDPC	111
Anexo 6. Prueba de homogeneidad de varianzas de los valores de las áreas de los picos de intensidad de EF1 α	112
Anexo 7. ANOVA de los valores de las áreas de los picos de intensidad de EF1 α	112

1. RESUMEN

Actualmente el Ecuador es el tercer exportador de flores y el primer exportador de rosas a nivel mundial. Sin embargo, su producción se ve afectada por varias plagas siendo el hongo necrotrófico, *Botrytis cinerea*, uno de los patógenos que más pérdidas económicas ocasiona en la poscosecha y durante la comercialización. Esta investigación constituye un trabajo pionero en el estudio de la activación del mecanismo de defensa en rosa ante el ataque de este patógeno. A partir de 51 aislados de *B. cinerea* obtenidos en cultivos de rosas en dos localidades en el Ecuador, se determinó la presencia de cuatro patotipos mediante la detección de los retrotransposones “Flipper” y “Boty”. Mediante la observación de síntomas morfológicos resultantes de bioensayos, en los cuales se inoculó a diez genotipos de rosa con un patotipo de *B. cinerea*, se identificaron dos genotipos resistentes a este hongo. Los resultados del análisis de expresión relativa temporal de dos genes de proteínas relacionados con la patogénesis (quitinasa y glucanasa), mediante RT-PCR semicuantitativa en un genotipo de rosa resistente *versus* uno susceptible, demostraron que hay un patrón de expresión diferente en dependencia del genotipo. En el susceptible hubo una inducción tardía de la quitinasa y temprana de la glucanasa, mientras que en el resistente la expresión fue contraria, la quitinasa temprana y la glucanasa tardía. Esto sugiere que la activación temprana del gen de la quitinasa puede representar el inicio de la cascada de inducción de genes para una defensa efectiva contra *B. cinerea* en *Rosa*. La identificación y confirmación de los genotipos resistentes a *B. cinerea* a través de técnicas tradicionales y moleculares facilitará la selección de genotipos resistentes para implementar programas de mejoramiento genético en rosas, proceso que se inicia con la evaluación del recurso y la identificación de los posibles mecanismos de defensa de *Rosa* spp. los cuales han sido poco estudiados. A la vez, al seleccionar material resistente se podrá disminuir el uso de agroquímicos nocivos para la salud e impulsar un cultivo ambientalmente amigable.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, genes de proteínas relacionados con la patogénesis, patotipos, *Rosa*, RT-PCR semicuantitativo.

2. ABSTRACT

Currently, Ecuador is the third largest exporter of flowers, particularly of roses, worldwide. Nonetheless, its production is being affected by various pests, such as the necrotrophic fungus, *Botrytis cinerea*, which is one of the most important pathogens that causes economic loss during post-harvest and marketing. This research is pioneer work in the study of the activation of the defense mechanism in roses against the attack of this pathogen. We determined the presence of four pathotypes by detecting the retrotransposons “Flipper” and “Boty”. within 51 isolates of *B. cinerea* obtained in rose greenhouses from two localities in Ecuador. We identified two resistant genotypes to this fungus by observing the resulting morphological symptoms from bioassays, in which ten rose genotypes were inoculated with a pathotype of *B. cinerea*. The results of the analysis of the temporal relative gene expression of two pathogenesis related protein genes (chitinase and glucanase) by semiquantitative RT-PCR in a resistant rose genotype versus a susceptible one, showed that there is a different expression pattern which depends on the genotype. The susceptible genotype showed a late induction of chitinase and an early induction of glucanase, while in the resistant genotype the expression pattern was the opposite: early chitinase induction and glucanase late induction. This suggests that early activation of the chitinase gene may represent the beginning of the gene induction cascade for an effective defense against *B. cinerea*. The identification and confirmation of resistant genotypes to *B. cinerea* through traditional and molecular techniques will make the selection of resistant genotypes easier in order to implement breeding programs in roses, a process which begins with resource assessment and identification of potential defense mechanisms in *Rosa* spp., which are not well-known to science. At the same time, this will reduce the use of harmful chemicals and encourage environmentally friendly crop management.

Key words: *Botrytis cinerea*, pathogenesis related protein genes, pathotypes, *Rosa*, semiquantitative RT-PCR.

3. INTRODUCCIÓN

La situación geográfica del país ha permitido contar con micro climas y una excelente luminosidad que proporcionan características únicas a las flores (Corpei, 2009), de tal manera que las flores ecuatorianas se encuentran entre las mejores del mundo. Actualmente el Ecuador es el tercer exportador de flores y el primer exportador de rosas a nivel mundial. El país es privilegiado para la obtención de variedades de rosas debido a que mantiene condiciones climatológicas óptimas para una producción constante durante todo el año. La floricultura de rosas en el Ecuador ocupa el segundo lugar entre los principales productos de exportación del país (Corpei, 2009; Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2010) y constituye una de las actividades que más ingresos genera por exportaciones no tradicionales en el país; además, ofrece cerca de 76.758 empleos directos. Las exportaciones de flores han tenido un crecimiento del 59,36% en el periodo comprendido entre el año 2004 y el 2008, pasaron de USD 354 millones en el año 2004 a USD 565 millones en el año 2008 (Expoflores, 2010). Uno de sus mayores mercados lo compone la flor cortada, seguido de la planta en maceta como rosal mini y el de la jardinería en el resto de sus aplicaciones (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2005; Cabrera *et al.*, 2006). En el año 2008, Estados Unidos fue el mercado destinatario del 74% del total de exportaciones de rosas, seguido de Rusia con el 10%, Holanda (Países Bajos) con el 6%, y el 10% restante se exportó al resto del mundo (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2010).

La producción de rosas se puede realizar mediante varias técnicas siendo algunas de ellas la reproducción por semillas, estacas, cultivo *in vitro*, injertos de ramas e injertos de yema, siendo este último el método más empleado a nivel comercial (Fainstein, 1991).

El cultivo de rosa se lo realiza bajo invernadero con el cual se consigue producir flor en épocas y lugares en los que de otra forma no sería posible ya que estos proporcionan condiciones ambientales estables para el crecimiento de los rosales. Una vez que las flores han alcanzado las características deseadas, tallo largo, follaje verde, apertura del botón, se procede a la cosecha, que en el país se realiza manualmente seleccionando las mejores flores. A continuación, durante la poscosecha se acostumbra realizar controles de calidad del producto, recorte de tallos, clasificación, tratamientos químicos para prevenir enfermedades y finalmente el empaquetamiento para que sean transportadas a su destino final (Heussler, 1991). Las flores deben entrar al cuarto frío lo más pronto posible y mantenerse a una temperatura promedio de 2°C. Se trata de mantener la cadena de frío para prevenir la activación de agentes patógenos y asegurarse de que las rosas lleguen en las mejores condiciones al consumidor. Durante el transporte para su comercialización, que por lo general se realiza en avión y puede durar varios días, se procura mantener las condiciones de temperatura y humedad relativa estables; sin embargo, esto no siempre es posible y ocurren fluctuaciones ambientales severas que causan el deterioro de las flores al propiciar el desarrollo de enfermedades causadas por patógenos preexistentes en los tejidos (Fainstein, 1991; Heussler, 1991).

La principal característica comercial es la buena calidad de las rosas que se ve reflejada en su integridad física, las que si sufrieren alguna alteración pierden su valor, por lo que el aspecto fitosanitario de los cultivos condiciona su producción y comercialización (Cabrera *et al.*, 2006). Las rosas se ven afectadas por una gran variedad de plagas y patógenos que perjudican la producción y la calidad de las flores (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2005) lo cual representa pérdidas económicas para los productores. Estas enfermedades pueden ser de origen bacteriano, viral y fúngico, siendo los hongos los patógenos que provocan mayores pérdidas económicas en el cultivo

de rosas (Agrios, 2005). Los hongos patógenos más frecuentes en rosa son *Botrytis* sp., *Diplocarpon* sp., *Phragmidium* sp. y *Sphaerotheca* sp, los cuales provocan graves daños en el cultivo (Cabrera *et al.*, 2006).

Botrytis cinerea, el hongo causante de la enfermedad conocida como “podredumbre gris” o “moho gris”, es el que causa mayor pérdida económica para la industria de rosa a nivel mundial; puede afectar además a más de 200 especies vegetales distintas, determinando serias pérdidas económicas antes y después de la recolección (Benito *et al.*, 2000). La enfermedad se presenta en una amplia gama de síntomas, los cuales no pueden ser generalizados para los órganos y tejidos de las plantas. Los síntomas más típicos en hojas y frutos son lesiones húmedas, la putrefacción, acompañada por el colapso de tejidos parenquimáticos y la rápida aparición de masas de conidias de color gris, que le da un aspecto de moho de color gris. Las lesiones en hojas comúnmente se inician a partir de los márgenes (Williamson *et al.*, 2007).

En el caso de las rosas el hongo puede atacar en cualquier estado de desarrollo de la planta y puede infectar cualquier parte de la misma. Esta enfermedad puede dañar rápidamente los capullos y las flores lo cual implica una pérdida en la producción de las floricultoras. La humedad elevada y temperaturas templadas (20 a 25°C) son los factores favorables para su aparición. Bajo estas condiciones ambientales, *B. cinerea* puede causar la muerte de la planta infectada (Cabrera *et al.*, 2006). El principal problema en rosas ocasionado por *B. cinerea* se encuentra en la poscosecha cuando se observa que los pétalos de las rosas toman una coloración marrón y se incentiva la descomposición de los tejidos (Cabrera *et al.*, 2006). Hay pocas descripciones disponibles que detallan el proceso de infección por este hongo en especies ornamentales, más aún, la información disponible en rosas es escasa por lo cual es importante realizar una descripción de este proceso, así como

contar con herramientas que permitan detectar la presencia del patógeno aún cuando no se presenten síntomas.

3.1 DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD “PODREDUMBRE GRIS” Y PREVENCIÓN

3.1.1 DESCRIPCIÓN DE *Botrytis cinerea*

Los fitopatógenos a menudo son clasificados según su estilo de vida en biótrofos y necrótrofos. La diferencia principal es que los biótrofos se alimentan del tejido vivo del huésped, mientras que los necrótrofos provocan la muerte del tejido y se alimentan del tejido descompuesto (Glazebrook, 2005). *Botrytis cinerea* Pers.: Fr [teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel] es un ejemplo de un patógeno con un tipo de vida necrotrófico que pertenece al *phylum* Ascomicota, *subphylum* Pezizomycotina, clase Leotiomycetes, orden Helotiales y familia Sclerotiniaceae (Williamson *et al.*, 2007).

Este hongo puede existir en diferentes hábitats como micelio, micro y macroconidios, clamidiosporas, esclerotia y ascosporas. Las esclerotias son estructuras altamente resistentes a ambientes extremos, mientras que las clamidiosporas son células hialinas de tamaño y forma sumamente variable (Holz *et al.*, 2007). Es capaz de afectar cultivos en zonas templadas y subtropicales. *B. cinerea* produce un gran rango de enzimas degradadoras de pared celular, toxinas y otros compuestos de bajo peso molecular como el ácido oxálico, las cuales juegan un rol importante en su capacidad de colonizar tejidos vegetales (Williamson *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que *B. cinerea* es un complejo de especies (Giraud *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 1999; Albertini *et al.*, 2002, Muñoz *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003). Inicialmente se describieron dos patotipos basados en la presencia o ausencia de retrotransposones: 1) “Transposa” que presenta dos retrotransposones “Boty” y “Flipper” y 2) “Vacuma” la cual no presenta retrotransposones (Diolez *et al.*, 1995; Levis *et al.*, 1997). En 2005, Fournier y colaboradores mostraron que la diferenciación genética determinada mediante múltiples secuencias de genes no era concordante con los patotipos previamente descritos. Es por esto que estos autores proponen dividir a *B. cinerea* en Grupo I y Grupo II, los cuales se muestran como especies filogenéticamente crípticas. Se ha demostrado que estas especies crípticas muestran diferente resistencia al fungicida fenhexamida, por lo cual se las conoce sinónimamente como FenR (resistente) Grupo I y FenS (Sensible) Grupo II. En el Grupo I se han detectado los patotipos “Vacuma”, *solo* “Flipper” o *solo* “Boty”, mientras que en el Grupo II se han detectado todos los tipos de transposones (Isenegger *et al.*, 2008). En investigaciones de patología en uva se ha observado que los patotipos de “Transposa” son más virulentos que los aislados de “Vacuma” y que la frecuencia de los tipos de transposones cambia durante el desarrollo del cultivo, posiblemente por diferencias en su desempeño saprotrófico y patogénico (Martínez *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2005). La virulencia de los patotipos de *B. cinerea* ha sido ampliamente estudiada en uva; sin embargo, en *Rosa* spp. no se han encontrado estudios al respecto en la literatura consultada.

En *Fragaria chiloensis* (Rosaceae) solamente se ha detectado el patotipo “Flipper” (González *et al.*, 2009). En *Rosa* spp., Giraud y colaboradores (1999) reportan que el 40 % de los aislados obtenidos fueron “Transposa”. Chamorro (2005) reporta la única investigación realizada en Ecuador sobre la detección de patotipos de *B. cinerea* en rosa; en este estudio se encontró una prevalencia del 90 % para el patotipo “Transposa” y el 10

% restante para el patotipo “Vacuma”, de un total de 21 aislados obtenidos en las provincias de Cayambe y Cotopaxi. La virulencia de los patotipos de *B. cinerea* ha sido ampliamente estudiada en uva (Martínez *et al.*, 2005, Martínez *et al.*, 2003); sin embargo, en *Rosa* spp. no se han encontrado estudios al respecto en la literatura consultada.

Debido a la falta de estudios, no se tiene certeza en cuánto a la prevalencia de los patotipos de *B. cinerea* en cultivos de rosa, esta información es de gran utilidad para desarrollar planes de control y manejo mejor encaminados.

3.1.2 PROCESO DE INFECCIÓN

Los patógenos presentes sobre una hoja deben penetrar o evadir barreras físicas de protección de la planta, entre las cuales está la cutícula del hospedero, la cual se compone de cutina cubierta por cera. El proceso infeccioso de *B. cinerea* se describe por los siguientes pasos: unión del conidio, germinación, formación del apresorio, penetración de la superficie, muerte del tejido del hospedero y formación de la lesión primaria, expansión de la lesión, maceración del tejido y esporulación (Van Kan, 2006; Choquer *et al.*, 2007). La estructura que se desarrolla sobre la superficie vegetal es considerada un apresorio, el cual es una estructura que posiblemente secreta enzimas, cutinasa y lipasa, para romper y así penetrar en el tejido. Una vez dentro del tejido provocan la muerte celular mediante moléculas tóxicas y enzimas líticas; a pesar de que el objetivo no es llevar a la muerte del hospedero sino descomponer la biomasa de la planta y convertirla en parte de su biomasa (Van Kan, 2006). Se distinguen dos procesos generales de infección de *B. cinerea*, el primero es llamado agresivo cuando las lesiones se expanden, y el segundo es conocido como latente, en el cual puede permanecer por periodos de tiempo variables (Elad *et al.*, 2007a).

3.1.3 MANEJO

La prevención es crucial en el control y manejo de esta patología. La mayoría de las estrategias de control utilizadas hasta el momento se han basado en el empleo de agentes químicos, los cuales se agrupan en cinco categorías dependiendo de su modo de acción: fungicidas que inhiben la respiración, inhibidores del ensamblaje del microtúbulo, los que bloquean la osmoregulación, inhibidores de la biosíntesis de esteroides y aquellos cuya toxicidad es revertida mediante aminoácidos (Rosslenbroich y Stuebner, 2000). Entre ellos, el Fenhexamida es un fungicida inhibidor de la biosíntesis de esteroides y es uno de los más usados para el control de este patógeno.

Sin embargo, cada vez es menos recomendable y más restringida la utilización de fungicidas debido a los problemas de contaminación ambiental y a la toxicidad a la salud humana. Además, frecuentemente se ha dado la aparición de cepas del patógeno resistentes a los compuestos utilizados (Benito *et al.*, 2000). En el caso de *B. cinerea* en los últimos años se ha observado el incremento de la resistencia múltiple a agroquímicos de ciertos aislados de este patógeno (Fournier *et al.*, 2005), lo que dificulta su control y ha dirigido a los investigadores a la búsqueda de alternativas como la obtención de variedades de rosa más resistentes al patógeno. Una planta altamente resistente permitirá muy poco o inhibirá por completo el crecimiento y reproducción del patógeno (Agrios, 2005).

3.2 RESPUESTAS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

Las plantas responden ante una infección por medio de sistemas de detección y respuesta que han evolucionado para inducir defensas apropiadas que pueden ser inducidas así como también preformadas, como son las barreras estructurales, (pared celular y

cutícula), o metabolitos antimicrobianos preexistentes como las fitoanticipinas (Van Baarlen *et al.*, 2007). Los microorganismos pueden provocar diferentes y diversas respuestas por parte de su hospedero. En algunos casos esta respuesta puede ser de aceptación (en el caso de simbioses), de reconocimiento tardío y defensas moderadamente efectivas (como la mayoría de interacciones que resultan en enfermedad), o una defensa rápida y fuerte que bloquee la transmisión sistémica de la infección (Dixon y Lamb, 1990; Keen, 1990; Long y Staskawicz, 1993; en Bent, 1996). Las plantas responden a la infección mediante señales sistémicas que provienen de los sitios de infección, estas rutas operan, al menos parcialmente, a través de pequeñas moléculas de señalización propias de las plantas como el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) (Feys y Parker, 2000; Jones y Dangl, 2006); son reguladores importantes de las respuestas de defensa de las plantas a patógenos. Se ha propuesto que están involucradas en diferentes mecanismos en la respuesta de resistencia, cada una en contra de un rango particular de patógenos. En *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, el etileno, ácido salicílico, ácido jasmónico, la fitoalexina y camalexina, ya sea por sí solas o en diferentes combinaciones, están involucradas en las respuestas de defensa ante diferentes patógenos (Thomma *et al.*, 2001).

Varios estudios indican que durante el transcurso de la interacción de *B. cinerea* y su hospedero, la planta trata de prevenir su invasión y crecimiento al activar múltiples vías de defensa, incluyendo la producción de metabolitos antifúngicos y proteínas relacionadas con la patogénesis (Van Baarlen *et al.*, 2004, Van Baarlen *et al.*, 2007). La resistencia a *B. cinerea* en *Arabidopsis thaliana* involucra una contribución importante de rutas mediadas por etileno/ácido jasmónico (Thomma *et al.*, 1999). En el caso de tabaco, la vía del ácido salicílico parece ser importante para la resistencia (Murphy *et al.*, 2000). Estos reguladores pueden activar procesos relacionados con defensa en las plantas, además

de la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis, que incentivan la producción de fitoalexinas y alteraciones de la pared celular (Díaz *et al.*, 2002). Los genes activados por estos reguladores son considerados marcadores de mecanismos de defensa. Algunas de estas defensas incluyen metabolitos secundarios como estilbenos, saponinas, cucurbitacinas, proantocianidinas y tulipaninas (Van Baarlen *et al.*, 2007). Es muy probable que proteínas de defensa homólogas y mecanismos de defensa similares sean inducidos en varias plantas hospederas, sin embargo esto no está muy bien documentado.

Una de las primeras respuestas de defensa es la Respuesta Hipersensible (RH), que se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas en los sitios de entrada del patógeno y puede ocurrir dentro de un par de horas a partir del contacto con el patógeno. Se ha propuesto que la RH juega un rol importante en la resistencia a enfermedades. En interacciones con patógenos biótrofos la muerte celular no permite que el patógeno avance y tenga acceso a más tejido dentro del hospedero (Hammond-Kosack y Jones, 1996). A pesar de que la RH es eficiente contra patógenos biótrofos, no protege contra infecciones de patógenos necrotróficos como *B. cinerea*, ya que estos se alimentan de tejido muerto. Así, este hongo puede explotar este mecanismo de defensa para su patogenicidad (Govrin y Levine, 2000).

Después de la formación de la lesión necrótica ocasionada por la RH se activa una ruta conocida como Resistencia Sistémica Adquirida (RSA). Se conoce que la RSA es dependiente de la señalización del ácido salicílico y se refiere a distintas señales de transducción que juegan un rol importante en la habilidad de las plantas para defenderse contra patógenos. La activación de la RSA provoca el desarrollo de una resistencia sistémica de amplio espectro, la cual conlleva a una protección contra el patógeno e induce cambios asociados a la expresión génica (Ryas *et al.*, 1996; Hammerschmidt, 2009).

Recientes investigaciones realizadas principalmente en *A. thaliana* sugieren que este tipo de resistencia es más efectiva en contra de patógenos biótrofos y menos efectiva con necrótrofos (Hammerschmidt, 2009). A pesar que la señalización AS aparentemente no desempeña un rol muy importante en la defensa contra patógenos necrotróficos, es posible que contribuya a la defensa. El mecanismo de defensa hacia *B. cinerea* no se conoce en rosas; sin embargo en estudios realizados en otras especies (Ej: *A. thaliana*) se ha visto que las defensas más eficientes contra este tipo de patógenos requieren la señalización del ácido jasmónico y del etileno (Glazebrook, 2005).

Varias proteínas son inducidas durante estos procesos de defensa (mediados por los reguladores ET, AJ y AS, principalmente) y se las conoce como proteínas relacionadas a la patogénesis (PR Proteins por su nombre en ingles, “Pathogenesis Related Proteins”). Se define a estas proteínas PRs como proteínas codificadas por la planta hospedera cuya expresión se induce específicamente durante estímulos patológicos. Se sabe que no solo se acumulan localmente en la hoja infectada sino que también son inducidas sistémicamente (Van Loon y Van Serien, 1999). Se han reportado varios miembros de las familias de proteínas PR que podrían estar relacionadas con una defensa efectiva en contra de *B. cinerea*, tales como PR1 (proteína de defensa) (mediada por la ruta AS), PR3 que codifica una quitinasa (mediada por la ruta AJ/ET), PR4 que codifica una proteína tipo heveína (mediada por la ruta AJ/ET), defensina de plantas PDF 1.2 (mediada por la ruta AJ/ET), factor de respuesta a etileno ERF 1 (mediada por la ruta AJ/ET), entre otras (Van Baarlen *et al.*, 2007; Chassot *et al.* 2008). La inducción de los genes de proteínas de PRs ha sido observada en diversas especies de plantas pertenecientes a diferentes familias, lo cual sugiere un rol conservado en la adaptación a condiciones de estrés biótico. Actualmente se reconocen 13 tipos de proteínas PRs agrupadas en familias que comparten secuencias aminoacídicas, relación serológica y/o actividad enzimática o biológica. Han sido

encontradas en más de 70 especies de plantas y 13 familias que incluyen mono y dicotiledóneas (Van Loon y Van Serien, 1999; Van Baarlen *et al.*, 2007). En Rosaceae, particularmente en manzana (*Malus x domestica*), se han caracterizado parcialmente *PR-1a*, *PR-2*, *PR-5* y *PR-8* (Bonasera *et al.*, 2006). En *Rosa* spp. no se encontró información al respecto en la literatura consultada, por lo cual es importante realizar una investigación para tratar de identificar posibles genes de proteínas PRs relacionadas a la defensa.

3.3 CAMBIOS EN LA EXPRESION GÉNICA EN RESPUESTA A PATOGENOS

Ante el ataque de un patógeno es posible analizar los cambios que se producen en la expresión de algunos o varios genes endógenos de plantas vinculados con las vías de defensa, lo cual significaría que se está ejerciendo un mecanismo de resistencia o al menos de respuesta frente al patógeno. Para determinar el efecto del patógeno sobre los niveles de transcripción de los genes relacionados con la resistencia se debe realizar el análisis del transcriptoma a lo largo del proceso de infección. Esto permite estimar los posibles mecanismos moleculares que subyacen en la progresión de diferentes eventos biológicos o patológicos (Hammond-Kosack y Parker, 2003; Watson, 2008).

En la actualidad se cuenta con varias técnicas para el análisis de expresión génica como “blots”, microarreglos, PCR reverso transcriptasa (RT-PCR por sus siglas en inglés, “reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction”) y PCR cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés “quantitative PCR”). La qPCR se destaca por su sensibilidad y reproducibilidad; sin embargo, esta técnica requiere de equipos especializados cuyos costos son elevados y no están al alcance de cualquier laboratorio. Esta técnica se denomina cuantitativa dado que es capaz de determinar un número aproximado de

transcritos al comparar los patrones de amplificación de las muestras con los de estándares con concentraciones conocidas (Freeman *et al.*, 1999). La RT-PCR es una de las técnicas más empleadas para el análisis de la expresión génica debido a su bajo costo y fácil aplicación (Ferre, 1992). Es un método altamente sensible y específico que permite, además, realizar un análisis semi-cuantitativo de transcritos de RNA específicos y detectar variaciones en sus niveles de expresión bajo diferentes condiciones experimentales (Marone *et al.*, 2001). Es un método semi-cuantitativo ya que no determina un número exacto de copias de un producto de PCR, en parte por la insensibilidad de los tintes usados para marcar ácidos nucleicos. Esto no dificulta los análisis de expresión génica, dado que se los puede determinar al compararlos con la expresión de un gen constitutivo (expresión relativa) (Derveaux *et al.*, 2010). Es posible encontrar las secuencias de algunos genes reportados para la defensa efectiva ante *B. cinerea* en la base de datos del GenBank del Centro Nacional para la Información en Bioinformática de Estados Unidos (NCBI, por sus siglas en inglés “National Center for Biotechnology Information”). Con estas secuencias se pueden diseñar iniciadores específicos para utilizarlos en la RT-PCR y así analizar su expresión y su posible función en la defensa de *Rosa* spp. ante *B. cinerea*.

3.4 JUSTIFICACIÓN

La industria florícola ecuatoriana enfrenta varios retos en el control fitosanitario, como son por un lado la necesidad de ir hacia un cultivo más verde, disminuyendo el uso de agroquímicos y por otro mantener la calidad de las flores de exportación.

En el caso de la podredumbre gris causada por *B. cinerea*, el empleo de agentes químicos para su control durante el cultivo en campo no garantiza que no se desarrolle la enfermedad al momento de colocarlas en florero, pues la enfermedad puede manifestarse

después de la poscosecha, ocasionando que las rosas pierdan su valor comercial y que la floricultora pierda credibilidad en el mercado por la mala calidad de su producto (Com. Pers. Ana María Quiñones, Esmeralda Breeding S.A.). Una alternativa es emprender programas de mejoramiento genético de las rosas, proceso que se inicia con la evaluación del recurso, con el fin de identificar variedades resistentes o tolerantes a este patógeno a la vez que se pueda conocer cómo responde este cultivo al ataque del patógeno e identificar los posibles mecanismos de defensa de *Rosa* spp. Posteriormente variedades mejoradas, en este caso resistentes o altamente tolerantes a *B. cinerea* se pueden obtener como producto de programas de mejoramiento mediante cruzamientos específicos en los cuáles los progenitores se habrán seleccionado por exhibir resistencia o tolerancia. La selección de parentales es más eficaz y eficiente al emplear métodos moleculares para su identificación.

3.5 OBJETIVOS

3.5.1 GENERAL

Caracterizar la distribución y prevalencia de patotipos de aislados de *B. cinerea* así como la resistencia de diez genotipos de *Rosa* spp. de una colección de la empresa florícola Esmeralda Breeding S.A.; mediante ensayos biológicos y análisis de ADN y ARN.

3.5.2 ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de los patotipos “Transposa”, “Vacuma” y sus variantes en una muestra de 51 aislados de *Botrytis cinerea* de dos fincas de la empresa florícola

Esmeralda Breeding S.A. ubicadas en El Quinche y en Cayambe, a través de la detección de retrotransposones por PCR.

- Describir el proceso de infección de *Botrytis cinerea* en *Rosa* spp. empleando la técnica de tinción diferencial con tripán azul.
- Caracterizar la resistencia/susceptibilidad de diez genotipos de *Rosa* spp. al hongo *B. cinerea* patotipo “Transposa”, mediante ensayos *in vivo* de infección y evaluación de síntomas.
- Determinar la expresión génica diferencial y temporal de genes asociados a respuestas de defensa en un genotipo de *Rosa spp.* resistente y un genotipo susceptible inoculados con *Botrytis cinerea*, mediante RT-PCR.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para un mejor entendimiento de la metodología empleada en este estudio en el Anexo 1 se presenta en el diagrama del flujo de trabajo de la presente investigación.

4.1 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Botrytis cinerea*

4.1.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL HONGO

Se tomaron un total de 51 muestras de tejidos infectados (pétalos) con *B. cinerea* (Figura 1, A) en dos fincas de la empresa Esmeralda Breeding S.A., localizadas en El Quinche (Pichincha, Ecuador) y en Cayambe (Pichincha, Ecuador). Los pétalos infectados fueron colocados en cajas Petri vacías (100 mm diámetro x 20 mm altura) las cuales fueron selladas con Parafilm™ y mantenidas bajo condiciones de luz y temperatura ambientales para proporcionar condiciones óptimas de esporulación. Una vez que los hongos esporularon se transfirió un conidioforo (Figura 1, B) a una caja Petri con medio agua agar al 3 % sin nutrientes con la ayuda de pinzas y un estereomicroscopio. Se incubó a temperatura ambiente por cinco días (Benito *et al.*, 1998). Se cortó un cuadrado de agar de 3 x 3 mm que contenía la punta de la hifa terminal más lejana al punto de inóculo, con la ayuda de un estereomicroscopio y un bisturí estéril (Figura 1, C). Este cuadrado fue transferido (Figura 1, D) a medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) (Strobel *et al.*, 2001).

Las muestras crecieron en medio PDA a temperatura ambiente y luz ambiental durante dos semanas de tal manera que el micelio creciera uniforme y espaciadamente en la caja. Con la ayuda de un bisturí estéril se cortó un cuadrado de 1 x 1 cm que contenía

micelio y se inoculó en 20 mL de medio de cultivo malta-levadura (malta 2 % y extracto de levadura 0,2 %) en Erlenmeyers de 125 mL y se los dejó crecer por una semana sin agitación y con condiciones de luz y temperatura ambientales. Otro cuadrado de iguales dimensiones fue utilizado para re-inocular el hongo en medio PDA y mantenerlo vivo en las mejores condiciones de virulencia para utilizarlo posteriormente (Benito *et al.*, 1998; Strobel *et al.*, 2001).

4.1.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Se cosecharon muestras de micelio a partir de los cultivos líquidos de una semana de edad. Se trabajó a partir de 50 mg de tejido y para la purificación de ADN genómico de *B. cinerea* se utilizó el juego de reactivos *Dneasy[®] Plant Mini* (Qiagen, 2006). Se siguieron las instrucciones del fabricante con una modificación que consintió en añadir 25 µL de proteinasa K (20 mg/mL) conjuntamente con el tampón AP1 (Tampón de lisis contenido en el juego de reactivos). El ADN genómico se eluyó en un volumen de 50 µL de agua destilada.

Se determinó la calidad del ADN extraído mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8 % en tampón tris hidroximetil aminometano 1 X (Tris-HCl) 89 mM; ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) 2 mM; ácido bórico 89 mM; pH 8 (TBE) (Sambrook y Russell, 2001) y se tiñó con “Sybr Gold” (Invitrogen[®], Estados Unidos). La estimación de la concentración relativa del ADN extraído se realizó simultáneamente en la propia corrida del gel, con la ayuda del marcador de peso molecular y de cuantificación *Low DNA Mass[™] Ladder* (Invitrogen Corp., 2006). La visualización se realizó con la ayuda del transiluminador de luz azul *Safe Imager[™]* (Invitrogen[®], Estados Unidos).

4.1.3 ANÁLISIS POR PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE PATOTIPOS

Para identificar los patotipos “Transposa” y “Vacuma” se detectaron los elementos transponibles “Boty” y “Flipper” mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés “Polymerase Chain Reaction”). Se tomó como base la metodología propuesta por Muñoz y colaboradores (2002) en reacciones simples. La detección de los transposones consistió en reacciones independientes de PCR con iniciadores específicos para *Boty*LTR 98-728 y F300 y F1550 para “Flipper” (Muñoz *et al.*, 2002). Para detectar el retrotransposón “Boty”, además de los LTR, se emplearon los iniciadores *Boty*R4-F4 reportados por Ma y Michailides (2005). Todos los iniciadores empleados y sus secuencias se describen en la Tabla 1.

Las condiciones de las reacciones de PCR y el programa empleado estuvo en dependencia del iniciador que se usó. Así, la reacción de PCR para el par *Boty* LTR 98-728 se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 25 ng de ADN, la concentración de cada uno de los iniciadores fue 100 nM, de deoxinucleótido trifosfato (dNTP) 65 µM, cloruro de magnesio (MgCl₂) 1,5 mM, tampón de reacción 1X y 1 U de *GoTaq flexi* (Promega[®], Estados Unidos) y el volumen se ajustó con agua destilada de grado molecular. Para el par de iniciadores F300 y F1550 la reacción se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 25 ng de ADN, la concentración de cada uno de los iniciadores fue 200 nM, de cada dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, tampón de reacción 1X y 1 U de *GoTaq flexi* (Promega[®], Estados Unidos) y el volumen se ajustó con agua destilada de grado molecular. Para el par de iniciadores *Boty*R4-F4 se realizó la reacción en un volumen final de 25 µL con las mismas condiciones empleadas para el par de iniciadores LTR.

Las reacciones de PCR para todos los iniciadores se realizaron en un termociclador (My Cycler™, BioRad®) y se variaron los parámetros para cada par de iniciadores de la siguiente manera: para el par de iniciadores *Boty* LTR 98-728 una denaturación inicial a 95 °C por tres minutos, 40 ciclos a 94 °C durante 40 segundos, 60 °C por 40 segundos y 72 °C por 60 segundos y para terminar una extensión final a 72 °C por diez minutos. Para el par de iniciadores F300 y F1550 la reacción de PCR se efectuó siguiendo los siguientes parámetros: cuatro ciclos a 95 °C por tres minutos, 60 °C por un minuto y 72 °C por dos minutos, seguido por 35 ciclos a 94 °C durante 60 segundos, 60 °C por 60 segundos, 72 °C por 90 segundos y una extensión final a 72 °C por cinco minutos. Para el par de iniciadores *Boty*R4-F4 se realizó denaturación inicial a 95 °C por tres minutos, seguida de 40 ciclos a 94 °C durante 40 segundos, 68 °C por 40 segundos, 72 °C por 60 segundos y se terminó la reacción con una extensión final a 72 °C por diez minutos.

Para detectar la presencia de los productos de PCR correspondientes a estos transposones se realizó una corrida electroforética horizontal en gel de agarosa 1,5 % en tampón TBE 1X, a 100 V de voltaje constante (Sambrook y Russell, 2001) y se tiñó con *Sybr Gold* de Invitrogen®. El tamaño de los productos de PCR se estimó por comparación con el marcador de peso molecular *TrackIt™ 100 bp DNA ladder* (Invitrogen Corp., 2003). La visualización se la realizó con la ayuda del transiluminador de luz azul *Safe Imager™* (Invitrogen®). Los productos de PCR se purificaron con el juego de reactivos *QIAquick® PCR Purification* (Qiagen, 2008), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos productos fueron enviados al laboratorio “W. M. Keck” en la Universidad de Yale (Estados Unidos) para ser secuenciados. Se determinó la identidad de las secuencias mediante la herramienta de alineamiento de secuencias Blastn del GenBank del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés “National Center for Biotechnology Information”) (NCBI, 2011a).

4.2 INFECCIÓN CON *B. cinerea* DE LOS GENOTIPOS DE *Rosa* spp. BAJO ESTUDIO

Se trabajó con un total de diez genotipos distintos de rosas de seis semanas de edad, las plantas fueron obtenidas *in vivo* y fueron proporcionados por la empresa Esmeralda Breeding S.A. (El Quinche, Ecuador). Mediante observaciones de campo y bioensayos con inoculaciones en flores cortadas el personal de la empresa determinó que ocho de estos genotipos muestran diferentes grados de resistencia a *B. cinerea* y dos han sido identificados como susceptibles (Tabla 2). Las observaciones del personal de la empresa se han ido realizando constantemente durante repetidos ciclos de cultivo para evaluar los diferentes genotipos de rosas en búsqueda de resistencia a *B. cinerea*, y de esta manera utilizarlos en cruzamientos dirigidos y generar variedades resistentes a este hongo.

Se utilizó tres clones de cada uno de los diez genotipos que fueron mantenidas en sustrato inerte a base de cáscara de coco esterilizado y se les añadió los nutrientes necesarios mediante soluciones hidropónicas. Las plantas utilizadas en todos los ensayos fueron uniformes morfológicamente (tamaño y follaje), algunas de ellas presentaron botones de flores.

4.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Las muestras de *B. cinerea*, pertenecientes al patotipo “Transposa”, se cultivaron en medio PDA a temperatura ambiente y con luz natural durante dos semanas (Figura 2, A). Posteriormente las esporas se cosecharon, se colocaron en agua destilada estéril con ayuda de un asa triangular (Figura 2, B) y se centrifugaron a 1500 RPM durante ocho minutos para concentrarlas. Seguidamente se realizó un lavado con 10 mL de agua estéril mediante

centrifugación a 2000 RPM durante ocho minutos y se resuspendieron en medio *Gamborg's B-5 Basal Salt Mixture* (Sigma®) suplementado con di-hidrógenofosfato de potasio (KH₂PO₄) 8 mM y sacarosa 8 mM, tomando como base la metodología de Benito *et al.* (1998).

La concentración de esporas se determinó mediante el método hemacitométrico usando una cámara de recuento de Neubauer (Figura 3), teniendo en cuenta el procedimiento descrito por Davidsohn y Bernard (1978) para el conteo de eritrocitos. La cámara de recuento de Neubauer consiste en un portaobjetos en el cual se encuentra un rayado cuadriculado que mide 3 x 3 mm (9 mm²), subdividido en nueve cuadrados secundarios de 1 mm². Cuando se coloca un cubreobjetos sobre la cámara de recuento, existe un espacio que mide exactamente 0,1 mm entre la plataforma cuadriculada y el cubreobjetos. Cada milímetro cuadrado está situado bajo un volumen de 1/10 µL (Davidsohn y Bernard, 1978). Bajo este volumen se realizaron los conteos de las esporas empleando las siguientes diluciones: 1:1, 1:5 y 1:10. El valor encontrado para cada una de las diluciones se multiplicó por el factor de dilución y se determinó el promedio del número de esporas presentes en 1/10 µL. Posteriormente se realizaron las transformaciones pertinentes para determinar el número de esporas presentes en cada mililitro de solución. La concentración se ajustó a $\sim 2 \times 10^6$ esporas/mL mediante la adición de medio de inoculación (Benito *et al.*, 1998). Antes de realizar las inoculaciones se preincubó la solución durante dos horas a temperatura ambiente sin agitación para proporcionar las mejores condiciones y propiciar la germinación de las esporas sobre el tejido vegetal (Benito *et al.*, 1998).

4.2.2 ENSAYOS DE INOCULACIÓN CON *B. cinerea*

Se realizaron dos inoculaciones de forma independiente, una en condiciones de invernadero en el mes de diciembre de 2009 y la otra bajo aislamiento (con humedad y temperatura controladas) en los meses de febrero y marzo de 2010. El primer ensayo se lo realizó en el invernadero localizado en el campus de la PUCE en la parroquia de Nayón (Pichincha, Ecuador) el cual no prestó las facilidades necesarias para controlar las variables ambientales.

En los ensayos en invernadero se emplearon los diez genotipos de rosa, con una edad de seis semanas, listados en la Tabla 2. Para este ensayo se emplearon tres plantas prueba (repeticiones) y una planta control por cada genotipo, con un total de 40 muestras. Previo a la colocación del inóculo se realizaron microlesiones sobre el haz de las hojas más jóvenes raspándolas ligeramente con sílica gel (20 mesh). Posteriormente se colocó con una micropipeta 50 μ L de la solución de esporas a una concentración de $\sim 2 \times 10^6$ esporas/mL ($\sim 1 \times 10^5$ esporas) sobre la lámina de la hoja. A las plantas control se les aplicó medio sin inóculo siguiendo el mismo proceso que para las plantas inoculadas. Se observaron y registraron los síntomas diariamente durante seis semanas hasta que las plantas murieron.

En el segundo ensayo bajo condiciones de aislamiento con humedad y temperatura controladas se utilizaron dos plantas prueba (repeticiones) y una planta control por cada genotipo (10 genotipos), con un total de 30 muestras. El método de inoculación empleado en este ensayo difirió del utilizado en el primer ensayo. Las variaciones consistieron en que no se realizaron las microlesiones previo a la inoculación y se aumentó y controló la cantidad de inóculo aplicado, así, con la ayuda de una micropipeta se colocó sobre las

hojas más jóvenes de las plantas prueba con cinco gotas de 50 μL de la solución de esporas a una concentración de $\sim 2 \times 10^6$ esporas/mL ($\sim 1 \times 10^5$ esporas $\times 5$); se colocaron las gotas de tal forma que quedaran equitativamente distribuidas sobre la superficie foliar. Las plantas testigo recibieron un tratamiento con el medio sin inóculo (50 μL). Se tomaron datos sobre los síntomas y tiempo de aparición durante seis semanas.

Considerando que en la segunda inoculación no se trabajó en invernadero, después de realizar la inoculación se cubrieron las plantas con plástico transparente para mantener una humedad relativa alta y una temperatura promedio de 22 °C para proporcionar condiciones controladas óptimas de desarrollo y establecimiento de la enfermedad. Con ayuda de un registrador de datos (*Data Logger Extech*, Estados Unidos) se tomaron datos de temperatura y humedad relativa dentro de las cámaras húmedas durante las primeras 96 horas del ensayo; el experimento se mantuvo durante 39 días. Se tomaron muestras de tejido foliar tanto de plantas inoculadas como control antes y durante las primeras 96 horas después de la inoculación con los siguientes intervalos de tiempo: 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras se colectaron en crio tubos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se colocaron a -80 °C hasta su utilización .

Se hizo el seguimiento del desarrollo de la sintomatología cada cinco días desde el inicio de la infección hasta el final del ensayo en forma de porcentajes de infección, correspondiente a el área de tejido infectado. Durante el desarrollo progresivo de la enfermedad se estableció una escala de la sintomatología, donde cero correspondió a la no presencia de síntomas de la enfermedad y 100 cuando se observó la muerte de la planta.

Con los datos obtenidos de este ensayo se realizaron las curvas de progreso de la enfermedad para cada muestra y se analizaron. Para cada curva se obtuvo el área debajo de

la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC, de sus siglas en inglés “Area Under Disease Progression Curve”), con la ayuda del programa estadístico R (“R Development Core Team”, 2010) del paquete Agricolae 1.0-9 (Mendiburu, 2009). Para ello se tomó en cuenta la sugerencia de Jeger y Viljanen-Rollinson (2001), de utilizar dos puntos de la curva (el inicio y el final de la enfermedad). El valor de AUDPC obtenido por cada repetición en cada genotipo se utilizó para evaluar la resistencia o susceptibilidad al patógeno. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés “Analysis of Variance”) y una prueba *a posteriori* Tukey con el paquete estadístico para las ciencias sociales v 17.0 (SPSS, por sus siglas en inglés “Statistical Package for the Social Sciences”, SPSS Inc., Estados Unidos), empleando los valores obtenidos del AUDPC total para determinar si existieron diferencias entre las áreas obtenidas para cada genotipo.

4.2.3 COMPROBACIÓN *IN VIVO* DE LA PRESENCIA DE *B. cinerea* MEDIANTE TINCIÓN

Para comprobar la presencia de *B. cinerea* dentro del tejido que fue inoculado con la solución de esporas se empleó el método de tinción con Tripán azul descrito por Chung (2006). Se tomaron muestras de tejido infectado de cada genotipo, tanto de plantas prueba como de plantas control, a las siguientes hdpi (horas después de la inoculación): 6, 12, 24, 48, 72 y 96. Las muestras fueron cortadas en segmentos de 1 cm² y colocadas en placas excavadas de 12 posillos. Se añadió a cada posillo 2,5 mL de solución de aclarado A (ácido acético:etanol 1:3, v/v) y la placa se mantuvo en agitación constante durante la noche. Posteriormente se removió la solución de aclarado A y se reemplazó con 2 mL de solución de aclarado B (ácido acético: etanol: glicerol, 1:5:1, v/v/v) y se mantuvo en agitación constante por tres horas. Se removió la solución de aclarado B y se añadió 2 mL de solución de tinción [0,01% Tripán azul en lactoglicerol (ácido láctico: glicerol: agua

destilada (dH₂O) 1: 1: 1, v/v/v]] en cada posillo y se agitó durante toda la noche. Las muestras se enjuagaron con glicerol 60% esterilizado, se eliminó el líquido presente en los posillos, se adicionaron 2 mL de glicerol 60% esterilizado en cada posillo y se agitó durante dos horas. Cada muestra se colocó en portaobjetos, se le añadió glicerol 60%, se la cubrió con un cubreobjetos y se observó la placa bajo el microscopio óptico (Zeiss Inc., Estados Unidos) bajo aumentos 4x, 10x y 20x. Se tomaron fotografías de cada placa para un posterior análisis microscópico descriptivo del proceso infeccioso.

4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA

4.3.1 SELECCIÓN DE GENES DE DEFENSA Y DISEÑO DE INICIADORES PRELIMINARES

Primeramente se realizó una revisión de la literatura para seleccionar genes de proteínas relacionados con la patogénesis (PRs, por sus siglas en inglés “Pathogenesis Related”) que podrían estar relacionados con las vías de defensa en respuesta a la infección con *B. cinerea*. Los genes de proteínas PRs seleccionados se detallan en la Tabla 3. Además, se seleccionó un gen constitutivo (factor de elongación 1 alfa, EF1 α), que no cambie sus niveles de expresión durante el ensayo, para normalizar las concentraciones de los ADN complementarios (ADNc) obtenidos.

Se diseñaron iniciadores preliminares basados en las secuencias reportadas para estos genes en *rosa* o en especies afines en la base de datos GenBank (NCBI, 2011b). Para diseñar los iniciadores se empleó el programa Primer3, el cual está disponible para usarse como una herramienta en línea (Rozen y Skaletsky, 2000; Rozen y Skaletsky, 2010). Los iniciadores que se detallan en la Tabla 3 se usaron para obtener secuencias específicas de

estos genes en *Rosa* sp. y realizar un análisis de su expresión.

4.3.2 EXTRACCIÓN DE ARN DEL TEJIDO VEGETAL

Todos los ensayos que se describen a continuación se realizaron únicamente a partir de las muestras del ensayo controlado descritas en el acápite 4.2.3. para detectar el cambio en la expresión génica se seleccionó el genotipo que presentó mayor resistencia en función de los síntomas visuales detectados y el genotipo que mostró más susceptibilidad en este ensayo, así, se analizaron un total de 16 muestras por genotipo (ocho tiempos de la planta prueba más ocho tiempos de la planta control).

La extracción de ARN total se realizó con el juego de reactivos del kit comercial *RNeasy® Plant* (Qiagen, 2006b). Se usó 30 mg de tejido foliar tanto de plantas prueba como control. El procedimiento se desarrolló siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo el paso de digestión de ADN en columna con *RNase-Free DNase Set* de la misma casa comercial. La elución de ARN total se realizó en 50 µL de agua destilada libre de RNasas.

Se determinó la calidad del ARN extraído mediante electroforesis horizontal en gel nativo de agarosa al 1,2 % en tampón TBE 1X preparado con agua Milli Q - Dietil-pirocarbonato (DEPC) (Sambrook y Russell, 2001), teñido con *Sybr Gold™* (Invitrogen®). Para eliminar las RNasas presentes en el agua se la trató con 1 mL de DEPC por cada litro de agua y posteriormente se autoclavó para eliminar los rastros de este agente. La visualización del ARN extraído se realizó con la ayuda del transiluminador de luz azul *Safe Imager™* (Invitrogen®).

La concentración del ARN extraído se determinó con el juego de reactivos *Quant-iT™ RNA Assay* (Invitrogen, 2007), utilizando el fluorómetro *Qubit™* (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.3.3 SÍNTESIS DE LA CADENA COMPLEMENTARIA DE LOS ARN MENSAJEROS

Se realizó una amplificación del gen glucanasa mediante PCR usando ARN total como templado para determinar si había contaminación con ADN genómico. El protocolo de PCR se detalla en el acápite 4.3.4. En las muestras en las que se observó una banda (Figura 4, A) se trató el ARN total nuevamente con DNasa I para eliminar el ADN genómico (Figura 4, B). Para ello se adicionó por cada 10 µL de ARN total 0,5 Kunitz de DNasa I libre de RNAsas y 2 µL de tampón 10X 500 mM Tris·Cl, pH 8.0; 50 mM MgCl₂; 10 mM de 1,4-Bis-sulfanilbutano-2,3-diol (DTT) y se completó el volumen final a 20 µL con agua libre de nucleasas. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C y posteriormente se inactivó la enzima a 72 °C por 10 minutos.

Seguidamente se procedió a la síntesis de la cadena complementaria de los ARNm a partir de este ARN total. Para ello se hizo una reacción de transcripción reversa, utilizando la enzima Reverso Transcriptasa del Virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV, de sus siglas en inglés *Avian Myeloblastosis Virus*, Invitrogen®) y un iniciador oligo (dT) 18, del juego comercial *Reverse Transcription System* (Promega, 2009). La reacción de retro transcripción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante empleando ~1 µg de ARN. Adicionalmente para cada muestra se realizó una reacción de retro-transcripción sin enzima (RT⁻) como control negativo de contaminación con ADN genómico en cada reacción.

4.3.4 OPTIMIZACIÓN DE PCR PARA LOS INICIADORES PRELIMINARES

Los ADNc obtenidos se emplearon para la reacción de amplificación mediante PCR. Para cada muestra y conjunto de iniciadores se realizaron dos reacciones negativas, la una como control de los componentes de la reacción en la cual no se incluye templado (sólo agua) y la otra en la que se incluye el templado resultante de la reacción de retro-transcripción sin la enzima retro-transcriptasa (RT⁻), para determinar contaminación de la muestra con ADN genómico.

En el protocolo del termociclador se empleó un tiempo de 30 segundos de denaturación, 30 segundos de anillamiento y 45 segundos de elongación como estándares, tomando en cuenta que la ADN polimerasa es capaz de sintetizar una longitud de 1 kb de una nueva cadena cada 60 segundos. Se empleó un máximo de 35 ciclos de amplificación con los parámetros antes mencionados. La reacción de PCR estándar se realizó en un volumen final de 40 μ L, conteniendo 2 μ L de ADNc, cada uno de los iniciadores en una concentración de 0,2 μ M, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, tampón de reacción 1X y 1 U de *GoTaq flexi* (Promega®, Estados Unidos), el volumen fue ajustado con agua destilada de grado molecular.

Se determinó empíricamente la temperatura óptima de anillamiento mediante el uso de un gradiente térmico en el termociclador *My Cycler*TM (BioRad®), para lo cual por cada set de iniciadores se prepararon seis reacciones positivas y una reacción como control negativo en tubos de 0,2 μ L para PCR. Las temperaturas de anillamiento probadas fueron las siguientes: 50°, 53°, 56°, 59°, 62° y 65 °C.

Otro de los parámetros optimizados fue la concentración de magnesio, para lo cual se evaluó cuatro concentraciones (2 mM, 2,5 mM, 3 mM y 4 mM) más una reacción como control negativo. Además, se adicionó aditivos o potenciadores de la PCR con el fin de mejorar su eficiencia, como fueron: dimetil-sulfoxido (DMSO), formamida y reactivo Q (Qiagen®). La cantidad de DMSO y formamida se determinó como un porcentaje del volumen final y se ensayaron tres concentraciones para cada uno: 1, 5 y 10 %. En el caso del reactivo Q se utilizó a una concentración final de 1X.

Por último se determinó el número de ciclos óptimos para cada par de iniciadores, para lo cual se prepararon ocho reacciones, más una reacción como control negativo. Las reacciones fueron detenidas al cumplir los siguientes números de ciclos: 22, 24, 26, 28, 30, 32, 35 y 40.

Para cada ensayo de optimización se analizaron los productos de PCR obtenidos en una corrida electroforética horizontal en gel de agarosa 2 % con tampón TBE 1X preparado con agua Milli Q (Sambrook y Russell, 2001), el gel se tiñó con “Sybr Gold” (Invitrogen®). Para estimar el tamaño de los productos de PCR en pares de bases se empleó el marcador de peso molecular *TrackIt™ 100 bp DNA ladder* (Invitrogen Corp., 2003). La visualización se realizó en un transiluminador de luz azul *Safe Imager™* (Invitrogen®).

Los parámetros óptimos se determinaron observando la calidad de las amplificaciones, considerando la intensidad y definición de la banda, el tamaño esperado del amplificado y la presencia de productos con pesos moleculares no esperados.

En el caso del número de ciclos óptimo para cada par de iniciadores se obtuvo una fotografía digital con la cámara fotográfica de alta definición DSLR-A100K (Sony, Estados Unidos). La intensidad de cada banda que se observó en la fotografía se relacionó con la cantidad de producto; este análisis se realizó con el programa de licencia libre ImageJ 1.42q, creado por Wayne Rasband en colaboración con el NCBI, y se siguieron las instrucciones para analizar geles incluidas en el manual del programa en línea (NIH, 2010). Los valores de intensidad obtenidos se emplearon para generar una curva de amplificación (número de ciclos *vs.* la intensidad de la banda) con la cual se determinó el rango de ciclos en el cual la amplificación es lineal (Anexo 2). Los parámetros establecidos para determinar el número de ciclos óptimo para cada gen fue que la amplificación se mantuviera dentro de la fase lineal de la PCR y que la cantidad de producto fuera claramente visible al realizar una corrida electroforética en gel de agarosa.

4.3.5 RT-PCR DE GENES COMO POSIBLES MARCADORES DE RESPUESTA DE DEFENSA A PATÓGENOS

Los productos de PCR obtenidos al evaluar las condiciones óptimas de cada parámetro de la reacción con los iniciadores preliminares fueron analizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 2 % (Sambrook y Russell, 2001) y el tamaño de los fragmentos se estimó con el marcador de peso molecular *TrackIt™ 100 bp DNA ladder* (Invitrogen® Corp., 2003). La visualización se realizó con la ayuda del transiluminador de luz azul *Safe Imager™* (Invitrogen®). Las bandas correspondientes a los tamaños esperados se cortaron del gel de agarosa sobre el transiluminador con el empleo de un bisturí limpio y se colocaron en un vial de 2 mL.

A partir de las bandas cortadas de los productos de PCR se purificó el ADN empleando el juego de reactivos *Quiaex® II Gel Extraction* (Qiagen, 1999) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas purificadas fueron utilizadas como templado en una nueva reacción de PCR, con los parámetros optimizados para cada set de iniciadores. Los nuevos productos de PCR fueron purificados con el juego de reactivos *QIAquick® PCR Purification* (Qiagen, 2008) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron enviados al laboratorio “W. M. Keck” en la Universidad de Yale (Estados Unidos) para ser secuenciados y de esta manera comprobar la identidad de dichos genes mediante alineamientos con Blastn.

Una vez obtenidas las secuencias de cada producto de PCR para cada uno de los conjuntos de iniciadores preliminares, se diseñaron iniciadores específicos utilizando el programa *Primer3* (Rozen y Skaletsky, 2010, en línea). Los parámetros considerados en el diseño fueron: tamaño óptimo del iniciador entre 18 y 23 bases, temperatura de fusión (T_m) entre 58 y 62 °C, porcentaje de las bases guanina (G) y citosina (C) entre 40 y 60, máximo número de bases repetidas 4, sin complementariedad en el extremo 3', un ancla GC en el extremo 3' y un producto de PCR menor a 200 bp. Los iniciadores obtenidos de esta manera se analizaron además con el programa disponible en línea *OligoAnalyzer 3.1* (*Integrated DNA Technologies Inc.*, 2010,) para confirmar la temperatura de fusión bajo condiciones experimentales, posibles estructuras secundarias, así como también la posible formación de homó y heterodímeros.

Se realizaron siete mezclas de reacción para cada set de iniciadores combinando los componentes descritos en la Tabla 4. Se repartió 30 µL de cada mezcla de reacción en tres tubos de PCR de 0,2 mL, marcados I-B, I-M y I-A. Se añadió 10 µL de cloruro de magnesio 8 mM a los tubos marcados con la letra B (Bajo) para tener una concentración

final de magnesio de 2 mM. Similarmente se añadió 10 µL de cloruro de magnesio a concentraciones de 12 mM y 16 mM a los tubos marcados con las letras M (Medio) y A (Alto), para tener una concentración final de magnesio de 3 mM y 4 mM, respectivamente. Como control de los componentes se prepararon reacciones sin templado para determinar, posible contaminación. De esta manera se probaron al mismo tiempo la concentración de magnesio y de iniciadores, así como el uso de potenciadores de PCR. Adicionalmente, para cada muestra se realizaron reacciones negativas con cada set de iniciadores utilizando el templado resultante de la reacción de retro-transcripción sin enzima (RT⁻) para determinar contaminación de la muestra con ADN genómico. Se determinó de igual manera el número óptimo de ciclos siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 4.3.4.

Se utilizó la técnica de PCR *Touchdown* para aumentar la especificidad de la reacción (Korbi y Mattick, 2008) en dos fases utilizando un termociclador *My Cycler*TM (BioRad[®]), de la siguiente manera: un paso de denaturación inicial a 95°C por tres minutos seguido de una primera fase que constó de 10 ciclos de denaturación a 94 °C durante 40 segundos, anillamiento de los iniciadores a 65 °C por 45 segundos (con la disminución de 1 °C por cada ciclo) y, elongación a 72 °C por 45 segundos, la segunda fase constó de 22 ciclos de denaturación a 94 °C durante 40 segundos, anillamiento de los iniciadores a 55 °C por 45 segundos, elongación a 72 °C por 45 segundos y se terminó la reacción con una extensión final a 72 °C por cinco minutos.

Se analizó la especificidad, sensibilidad de los iniciadores, calidad y cantidad de los productos de PCR mediante una corrida electroforética horizontal en gel de agarosa 3 % en tampón TBE 1X preparado con agua Milli Q (Sambook *et al.*, 2001), teñido con “Sybr Gold” (Invitrogen[®]). Para determinar el tamaño de los productos de PCR se empleó el marcador de peso molecular *TrackIt*TM 100 bp DNA ladder (Invitrogen[®]). La visualización

se realizó con la ayuda del transiluminador de luz azul *Safe Imager*[™] (Invitrogen[®]). Una vez obtenidos los parámetros de PCR se siguió el procedimiento descrito para los iniciadores preliminares para determinar el número óptimo de ciclos.

4.3.6 VALIDACIÓN DEL GEN CONSTITUTIVO

Para asegurarse que el gen del factor de elongación 1 alfa no cambió su expresión por las condiciones experimentales del ensayo se analizaron sus niveles de expresión en las muestras inoculadas y control en los siguientes intervalos de tiempo: 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas por duplicado. Previamente se realizó una cuantificación del ARN total mediante fluorimetría, utilizando el fluorómetro *Qubit*[™] y el juego de reactivos *Quant-iT*[™] *RNA Assay* (Invitrogen[®]), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez que se determinó la concentración de cada ARN se empleó 1 µg para la síntesis de la cadena complementaria de los ARN mensajeros mediante el procedimiento anteriormente descrito en el acápite 4.3.2. Luego, se procedió con la reacción de amplificación optimizada para este par de iniciadores en duplicado para cada muestra, empleando 5 µL de ADNc como templado para cada uno de los intervalos de tiempo.

Se analizó los productos de PCR mediante una corrida electroforética horizontal en gel de agarosa 3% con los parámetros previamente mencionados. Se procedió a tomar una fotografía digital con la cámara fotográfica de alta definición DSLR-A100K (Sony, Estados Unidos). La fotografía digital fue empleada para analizar la intensidad de las bandas resultantes de la amplificación del gen por PCR, la cual fue analizada mediante el programa de licencia libre ImageJ 1.42q creado por Wayne Rasband en colaboración con el NCBI. Primeramente se eliminó el ruido de fondo empleando la utilidad “subtract background” y luego se seleccionaron los carriles con la herramienta de selección

rectangular. A continuación se obtuvieron los picos correspondientes a la intensidad de cada banda con la herramienta “plot lanes”. Los picos de intensidad fueron calculados a partir del número de píxeles ocupados por las bandas, es decir, mientras una banda es más intensa y gruesa (mas producto de PCR = más expresión) ocupa un mayor número de píxeles y por lo tanto su pico es más grande. Se obtuvo el área total debajo del pico al marcarlo con la herramienta “label peaks”. Se realizó un ANOVA con el programa SPSS v 17.0 (SPSS Inc., Estados Unidos) empleando los valores obtenidos de las áreas de los picos para cada banda y su duplicado. La intensidad de banda está relacionada con la cantidad de producto y dado que se empleó la misma cantidad de templado, la posible variación en la misma corresponde a la cantidad del transcrito específico en el ADNc y, por lo tanto, a su nivel de expresión.

4.3.7 PCR SEMI-CUANTITATIVA

Las reacciones de PCR se realizaron en duplicado utilizando los parámetros óptimos previamente determinados para cada conjunto de iniciadores. Las condiciones fueron escogidas para que las reacciones de PCR nunca alcancen la meseta al final de la reacción y para que el análisis se realice en la fase linear (Anexo 2) de la amplificación. Se siguieron los lineamientos básicos propuestos por Marone y colaboradores en 2001. Por cada muestra analizada se realizó una reacción de PCR como control negativo (RT^-) con el gen PR2 para determinar contaminación con DNA genómico, adicionalmente se realizó un control negativo sin templado para ver contaminación de los reactivos.

Los productos obtenidos de la reacción de amplificación fueron analizados mediante una corrida electroforética horizontal en gel de agarosa 2 % en tampón TBE 1X preparado con agua Milli Q (Sambook *et al.*, 2001), teñido con “Sybr Gold” (Invitrogen[®]).

Para estimar el tamaño de los productos de PCR se empleó el marcador de peso molecular *TrackIt™ 100 bp DNA ladder* (Invitrogen Corp., 2003). La visualización se realizó con ayuda del transiluminador de luz azul *Safe Imager™* (Invitrogen®).

Se procedió a tomar una fotografía digital con la cámara fotográfica de alta definición DSLR-A100K (Sony, Estados Unidos) y se realizó la cuantificación de la intensidad de las bandas siguiendo el procedimiento previamente descrito en el acápite 4.2.3. Se calculó la expresión relativa de cada gen, comparando la amplificación del gen bajo estudio con respecto a la del gen constitutivo. Esto se realizó para normalizar la muestra con respecto a variaciones iniciales en la concentración de templado y como un control de la eficiencia de la reacción. Para cuantificar esta expresión relativa se dividió el valor del área obtenido a partir del pico de intensidad de las bandas de los genes analizados para el área de las bandas del gen constitutivo correspondiente, obteniendo de esta manera un valor relativo proporcional al nivel de expresión del gen constitutivo que se denominó “fold”. Los valores “fold” mayores a 1 se consideraron como sobre-expresión y los valores inferiores a 1 como silenciamiento. Con los valores de expresión relativa para cada intervalo de tiempo se realizó un estudio de expresión relativa temporal para observar el comportamiento en la expresión génica de estos genes como respuesta a la infección del patógeno. Considerando los intervalos de tiempo empleados en este trabajo se estableció como expresión temprana a la inducción antes y durante las 24 hpi y como expresión tardía desde las 48 hpi en adelante. Después de la normalización con el factor de elongación 1 alfa se calculó la media y la desviación estándar usando el SPSS v. 17 para todas las muestras.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Botrytis cinerea*

5.1.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL HONGO

El método de aislamiento empleado fue eficiente, ya que la inoculación del hongo en medio agar agua sin nutrientes promovió un crecimiento lento, lo que a su vez permitió el desarrollo de un micelio con hifas separadas y facilitó el aislamiento de una única punta terminal de la hifa (Figura 1, C). Esto aseguró que el aislamiento se realizara a partir de un solo patotipo y no una mezcla de estos. Se logró obtener suficiente tejido (50 mg) para realizar las extracciones de ADN con dos semanas de crecimiento en medio malta levadura y no fue necesario una incubación con agitación, ni a temperaturas superiores a las ambientales.

5.1.2 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN a partir de micelio con el juego de reactivos *Dneasy® Plant Mini Kit* (Qiagen, 2006), incluyó un paso adicional el cual consistió en añadir proteinasa k conjuntamente con el tampón AP1 con el objetivo de hacer más efectiva la lisis celular. Mediante la comparación con la escalera de peso molecular *Low DNA Mass™ Ladder* se estimó la concentración de el ADN en un rango de concentración de 5 ng/μL a 50 ng/μL (Figura 5). Para la PCR se utilizaron únicamente las muestras que presentaron una banda definida (Figura 5, carril A); mientras que las que mostraron un barrido (Figura 5, carril K) fueron desechadas y se repitió la extracción hasta tener una muestra con una banda bien definida.

5.1.3 ANÁLISIS POR PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE PATOTIPOS

Se identificaron en total cuatro patotipos diferentes presentes en la muestras: 1) “Transposa” que presenta dos retrotransposones “Boty” y “Flipper”, 2) “Vacuma” la cual no presenta retrotransposones 3) *Solo* “Flipper” y 4) *Solo* “Boty” (Figura 6). El protocolo de amplificación fue efectivo dado que se obtuvieron bandas únicas en cada caso, claramente identificables, y cada una se correspondió con el producto esperado. Los tamaños de los fragmentos fueron para “Boty” de 648 pb (con los iniciadores LTR) y 560 pb (con los iniciadores “Boty”R4-F4) y para “Flipper” de 1150 pb.

La detección del retrotransposón “Boty” fue más eficiente con el par de iniciadores botyR4-F4, que con el par LTR, ya que estos últimos generaron productos inespecíficos y dímeros de iniciadores, lo cual dificultó la interpretación de los resultados, no así con el par botyR4-F4.

Del total de los 51 aislados analizados del hongo, el 55 % (28 aislados) fueron identificados como patotipo “Vacuma”, el 25 % (13 aislados) correspondieron al patotipo solo “Flipper”, 14 % (7 aislados) al patotipo “Transposa” y 6% (3 aislados) al patotipo solo “Boty”. De ellos se presentó un porcentaje de patotipos diferentes en cada localidad analizada. En Cayambe de los 40 aislados obtenidos, el 65 % (26 aislados) fueron identificados como patotipo “Vacuma”, el 22 % (9 aislados) al patotipo solo “Flipper”, 5 % (2 aislados) al patotipo “Transposa” y 8 % (3 aislados) al patotipo solo “Boty”. Mientras que en El Quinche de los 11 aislados, el 46 % (5 aislados) fueron identificados como patotipo “Transposa”, el 36 % (4 aislados) al patotipo solo “Flipper” y el 18 % (2 aislados) al patotipo “Vacuma”; no se detectó el patotipo solo “Boty” (Figura 7).

Las secuencias obtenidas para los productos de PCR de los retrotransposones “Boty” y “Flipper” se presentan en el Anexo 3 A -B. Los resultados del mejor alineamiento de estas secuencias comparadas con la base de datos del GenBank del NCBI, empleando Blastn y secuencias no redundantes, se detallan en la Tabla 5. En ambos casos la identidad de la secuencia obtenida fue confirmada, ya que para “Boty” se obtuvo un 94 % de homología con el ADN repetitivo del retrotransposón “Boty” reportado en *B. cinerea* y un valor *e* de 0, y para “Flipper” se obtuvo un valor de 98% de homología con el elemento transponible “Flipper” reportado en *Botryotinia fuckeliana* y un valor *e* de 0.

Al analizar la presencia de los patotipos del hongo por cada genotipo de *Rosa* que fue muestreado, se observó que no hay especificidad del patotipo por el genotipo de *Rosa* (Figura 8), puesto que en el mismo genotipo pueden estar presentes varios patotipos y de igual manera, el mismo patotipo puede estar presente en varios genotipos de *Rosa*. El patotipo “Vacuma” es el más frecuente, ya que fue aislado en 16 genotipos de los 25 muestreados, seguido por el patotipo solo “Flipper” en 10 genotipos, el patotipo “Transposa” en 6 genotipos y el patotipo solo “Boty” en tres genotipos.

5.2 INFECCIÓN CON *B. cinerea* DE LOS GENOTIPOS DE *Rosa* spp. BAJO ESTUDIO

5.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se requirió un tiempo de dos semanas para que los hongos esporularán (Figura 2, A), donde las condiciones de crecimiento empleadas fueron adecuadas para promover la esporulación. Se determinó que la resuspensión de las esporas, utilizando los métodos

descritos en este trabajo, fue un paso crítico para que las esporas se mantuvieran viables durante el ensayo, pudieran germinar sobre el tejido vegetal y colonizarlo eficientemente. El método de conteo hemacitométrico utilizando la cámara de recuento de Neubauer (Figura 3) fue eficaz para determinar una concentración de esporas aproximada.

5.2.2 ENSAYOS DE INOCULACIÓN CON *B. cinerea*

En los bioensayos bajo condiciones de invernadero con los diez genotipos de rosa listados en la Tabla 2 fue muy difícil controlar las variables ambientales como humedad y temperatura, así como las variables bióticas, como parásitos y plagas. Bajo estas condiciones las plantas del ensayo se contaminaron con otros agentes infecciosos como áfidos y otros de carácter fúngico (Figura 9). Los genotipos más susceptibles a los patógenos presentes en el ambiente fueron, 414, 419 y 482. Los genotipos 419 y 482 fueron clasificados previamente como susceptibles (Tabla 2). Los genotipos que pese a las condiciones adversas permanecieron visualmente asintomáticos fueron los genotipos 222 (Figura 10, A), 370 (Figura 10, B), 369 (Figura 10, C) y 95 (Figura 10, D). Estos a su vez fueron clasificados previamente como resistentes (Tabla 2). Atendiendo a estas dificultades y a la imposibilidad de mantener las plantas en condiciones ambientales y de sanidad controladas, este experimento se descartó y se pasaron a los ensayos en aislamiento, condiciones de humedad y temperatura controladas.

Con la metodología diseñada para controlar estas variables se logró mantener una temperatura promedio de 22 °C y una humedad relativa de más del 95 % durante el ensayo, y no se presentaron infecciones o plagas ajenas al experimento. Bajo estas condiciones controladas los primeros síntomas de infección fueron evidentes a los cuatro días después de la infección (ddi) y consistieron en amarillamiento del ápice y márgenes de las hojas

(genotipos 361 y 414), pérdida de turgencia del tejido y plegamiento de las hojas sobre si mismas (Figura 11, A y B). A los nueve ddi se observaron los primeros síntomas de necrosis (genotipo 222), principalmente desde los márgenes de las hojas hacia el interior y se distinguió un patrón de anillos concéntricos de color gris y café (Figura 11, C). En las flores (genotipo 361) se observaron puntos de color café correspondientes a los lugares donde comenzó el proceso necrótico (Figura 11, D). En ramas, tallo y hojas de la planta (genotipo 369) fue posible evidenciar la putrefacción completa del tejido (Figura 11, E), así mismo se observaron zonas en donde el hongo estaba esporulando (genotipo 414) (Figura 11, F). A los 23 ddi se distinguió un nivel avanzado de necrosis que incluyó partes del tallo y ramas. Las plantas susceptibles mostraron un estado de pudrición de sus tejidos, llegando incluso a la muerte de la planta completa, como en el caso de los genotipos 482 y 414 (Figura 11, G y H). Sobre el tejido en putrefacción se observaron gran cantidad de conidioforos del hongo. Los genotipos resistentes (222 y 463) no presentaron síntomas de infección tan avanzado, únicamente se evidenciaron lesiones en algunas hojas. A los 39 ddi los siguientes genotipos estaban muertos: 95, 361, 369, 370, 419 y 511 (Figura 11, J). Los genotipos 222 y 463 fueron los únicos que sobrevivieron (Figura 11, I y K) y a los 42 ddi mostraron ligeros síntomas de infección, pero conservaron gran parte de su follaje, las plantas se mantuvieron erguidas, sus hojas no presentaron decoloración y se distinguieron pequeñas lesiones necróticas en proceso de cicatrización (Figura 11, L y M). Las plantas empleadas como control (sin inóculo) no mostraron síntomas de infección hasta finalizar el ensayo.

En la Figura 12 se presentan las curvas de progreso de la enfermedad para los diez genotipos estudiados bajo condiciones controladas, las curvas fueron realizadas empleando porcentajes de infección (evaluación) en cada periodo seleccionado. En la curva de progreso de la enfermedad que los genotipos 95, 369 y 511 generaron se observó una

tendencia de disminución de la enfermedad a los 23 ddi y un posterior incremento. Los genotipos 414, 370 y 482 mostraron curvas con un comportamiento asintótico llegando a 100 % de síntomas de lesión. La curva del genotipo 419 mostró un avance de la enfermedad severo con un inicio exponencial y una tendencia sigmoide. La curva del genotipo 361 presentó una tendencia asintótica con una pendiente pequeña. Los genotipos 222 y 463 presentaron una tendencia de disminución de la enfermedad, tendiendo a mantenerse en un mismo porcentaje, e inclusive, disminuyendo hasta casi desaparecer los síntomas de infección (genotipo 222). El genotipo 463 mostró un ligero incremento de la enfermedad a los 42 ddi.

En la Figura 13 se muestran los valores de las áreas obtenidos para los diez genotipos estudiados en el ensayo bajo condiciones controladas. El genotipo con el valor de AUDPC más bajo (valor 175) fue el 222, seguido por el genotipo 463 con un valor de 875. El genotipo 419 obtuvo un valor de 1925. En los genotipos 95, 361, 369, 370, 414 y 482 se obtuvo un área con un valor de 2100 y el valor más alto correspondió al genotipo 511 (2625).

Los valores de AUDPC obtenidos por cada repetición de cada genotipo se utilizaron para efectuar un ANOVA (Anexo 4). Al realizar la prueba de significación estadística de Tukey, para determinar si existían diferencias entre las varianzas, los genotipos se diferenciaron en dos subgrupos ($p=0,05$): el primer grupo contuvo solamente al genotipo 222 y el otro subgrupo incluyó al resto de genotipos (Anexo 5). De esta manera, bajo las condiciones estudiadas, el genotipo 222 fue clasificado como presumiblemente resistente, mientras que el resto de genotipos analizados mostraron susceptibilidad a *B. cinerea* en diferentes grados.

Atendiendo a los resultados obtenidos los genotipos seleccionados para el análisis de expresión de genes de defensa fueron el 222 como resistente y el 482 como susceptible, correspondiendo con la clasificación previa elaborada por el personal de Esmeralda Breeding S.A., los resultados obtenidos en invernadero y en cámara húmeda y los análisis estadísticos.

5.2.3 COMPROBACIÓN *IN VIVO* DE LA PRESENCIA DE *B. cinerea* MEDIANTE TINCIÓN

El método de tinción empleado fue eficiente para teñir el hongo y diferenciarlo del tejido vegetal, por lo que permitió determinar la presencia del patógeno en los tejidos de las plantas prueba, mientras que no se detectó en las plantas control. A las dos horas después de la infección (hdi) fue posible distinguir esporas de *B. cinerea* germinando sobre el tejido vegetal y se observó la presencia de los tubos germinales (Figura 14, A), lo cual indicó un inicio de infección temprana. A las seis hdi se diferenciaron también esporas germinadas multinucleadas y micelio en proceso de crecimiento (Figura 14, B). Se observó que las hifas del micelio comenzaron a ingresar al interior del tejido vegetal, usando los estomas para penetrar al interior de las hojas (Figura 14, C). A partir de las 12 y 24 hdi se registró un crecimiento considerable del micelio y no se apreciaron esporas germinando (Figura 14, D y E). A las 24 hdi se evidenció que el tejido circundante al hongo comenzó un proceso necrótico (Figura 14, F) formando un tejido de color café. A las 48, 72 y 96 hdi el hongo ocupó tres cuartos de la superficie de tejido y el micelio formó estructuras compactas a partir de las cuales se observaron hifas largas que se esparcieron sobre el tejido (Figura 14, G H y I). A las 96 hdi la necrosis del tejido fue extensa y tomó una coloración grisácea. En la Figura 14 K se ejemplifica el tejido sano de una planta control a

las 24 hdi y en la Figura 14 L se muestra el daño del tejido causado por el hongo a las 24 hdi.

5.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE POSIBLES GENES DE DEFENSA

5.3.1 SELECCIÓN DE GENES DE DEFENSA Y DISEÑO DE INICIADORES PRELIMINARES

Se diseñaron iniciadores preliminares basados en las secuencias informadas para estos genes en la base de datos GenBank del NCBI. Para DFN1 y PR3 no se encontró secuencias en el género *Rosa*, por lo cual se tomaron en cuenta regiones conservadas de los genes candidatos en géneros filogenéticamente cercanos dentro de la familia Rosaceae. En la Tabla 3 se presentan las secuencias y la información de los iniciadores preliminares.

5.3.2 EXTRACCIÓN DE ARN DEL TEJIDO VEGETAL

En la extracción de ARN de las muestras de los genotipos 222 y 482, tanto de las plantas prueba como de las plantas control se evidenció contaminación con ADN genómico. Esto se detectó por la presencia de una banda de alto peso molecular o un barrido sobre las bandas de ARN ribosomal (Figura 15). El paso de digestión en columna con DNasa I no fue suficiente para eliminar la contaminación con ADN genómico por lo cual fue necesario realizar una segunda digestión en solución. El segundo paso de digestión en solución fue eficiente ya que logró eliminar los rastros de ADN genómico. Mediante el fluorómetro Qubit™ (Invitrogen®) se determinó la concentración del ARN extraído de las muestras siendo la concentración más baja 1,9 µg/µL y la más alta 30 µg/µL.

5.3.3 SÍNTESIS DE LA CADENA COMPLEMENTARIA DE LOS ARN MENSAJEROS

La PCR con los iniciadores del gen de la glucanasa fue un método útil para determinar si existió contaminación del ARN total con ADN genómico (Figura 4, A). El tratamiento en solución de las muestras contaminadas con ADN genómico con DnasaI fue suficiente para eliminar los rastros de ADN en las muestras (Figura 4, B) .

La síntesis del ADNc fue exitosa y no fue necesario realizar modificaciones en el protocolo.

5.3.4 OPTIMIZACIÓN DE PCR PARA LOS INICIADORES PRELIMINARES

La temperatura de anillamiento óptima para Efl α estuvo en un rango entre 55 °C y 62 °C (Figura 16), mientras que para PR2, PR3 y DFN1 fue 58 °C. Por lo tanto, para utilizar las mismas condiciones con las diferentes parejas de iniciadores, se empleó 58 °C como la temperatura de anillamiento para los restantes pasos de estandarización.

La mayor especificidad para Efl α se obtuvo a una concentración de magnesio entre 2 y 3 mM y 5 % de Dimetil-sulfoxido (DMSO) (Figura 17). Para PR2, PR3 y DFN1 la concentración de magnesio óptima fue 2,5 mM (PR2 amplificó eficientemente hasta 4mM) y la concentración de DMSO con la que se obtuvo bandas definidas e intensas fue 5%. La formamida y el reactivo Q no mejoraron el desempeño de la reacción de PCR, por el contrario inhibieron la reacción de PCR y no se obtuvo productos. Por lo tanto, la concentración de magnesio empleada para los siguientes pasos de estandarización fue 2,5 mM y DMSO 5 %. El número de ciclos de PCR óptimo para todos los pares de iniciadores

estuvo entre 28 y 32 ciclos (PR2 - Figura 18, A). Se eligieron 32 ciclos dado que el producto era más abundante y fácil de visualizar en un gel de agarosa al 2 % (Figura 19).

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR con los iniciadores preliminares se presentan en el Anexo 3. Los resultados del mejor alineamiento de estas secuencias al ser comparadas con la base de datos del GenBank del NCBI empleando Blastn y secuencias no redundantes se presentan en la Tabla 5. Con una identidad máxima de 99 % y un valor e de 0, se confirmó la identidad del factor de elongación 1 alfa. Con una identidad máxima de 94 % y un valor e de 0, PR2 fue efectivamente identificado como tal. Con una identidad de 89 % y un valor e de 2×10^{-161} , PR3 fue identificado como una quitinasa de *Fragaria ananassa* y con una identidad de 91 % y un valor e de 1×10^{-46} , DFN1 fue identificado como una beta 1-3 glucanasa de *Fragaria ananassa*,

5.3.5 RT-PCR DE GENES MARCADORES DE RESPUESTA DE DEFENSA A PATÓGENOS

Se observó que la amplificación con los iniciadores preliminares para PR3 y DFN1 producían dímeros de iniciadores y productos secundarios inespecíficos de tamaños no esperados. Por esta razón se sintetizaron nuevos iniciadores a partir de las secuencias específicas de estos genes obtenidas a partir de los productos de PCR con los iniciadores preliminares. En la Tabla 6 se detallan las secuencias e información de los iniciadores definitivos diseñados a partir de las secuencias de los genes de defensa seleccionados.

Los iniciadores definitivos para el gen de la defensina 1 (DFN1) y para la glucanasa (PR2) no produjeron amplificaciones. La concentración de magnesio óptima para los iniciadores del gen del factor de elongación 1 alfa y para los del gen de la quitinasa fue de

4mM (Figura 20, A y B). La concentración óptima de iniciadores para los dos pares de iniciadores fue 0,25 μ M. El uso de potenciadores no tuvo un efecto apreciable sobre la eficiencia de la reacción, por lo que no fueron empleados para posteriores reacciones. Para el gen *Ef1 α* se determinó que entre los 28 y 32 ciclos de la PCR se mantuvo la reacción en la fase linear (Figura 18, B) y que la cantidad de producto era suficiente para visualizarlo claramente en una corrida electroforética en agarosa. Para PR3 (Figura 18, C) el número de ciclos óptimo fue de 32. De tal manera que se emplearon 32 ciclos para todas las reacciones.

Se descartó el gen de la defensina dado que ninguno de los iniciadores utilizados produjo bandas definidas e intensas. Para los análisis de expresión relativa temporal se usaron los iniciadores preliminares para el gen de la glucanasa (PR2), y los iniciadores definitivos para el factor de elongación 1 alfa (*EF1 α*) y quitinasa (PR3).

5.3.6 VALIDACIÓN DEL GEN CONSTITUTIVO

No se obtuvieron diferencias significativas ($p=0,541$; $F=0,914$) en los análisis presentados en los Anexos 6 y 7 sobre la expresión de el gen del factor de elongación 1 alfa por lo que fue validado como gen constitutivo. Las áreas de los picos obtenidos de los productos de PCR (Figura 21) se muestran en la Figura 22.

5.3.7 PCR SEMICUANTITATIVA

Se evidenció inducción de la expresión de los genes de la glucanasa y de la quitinasa en los dos genotipos seleccionados (Figura 23). En el caso del gen de la glucanasa, el genotipo 222 (resistente) mostró una expresión pico (0,80 “fold”) a las 48 hdi

(Figura 24, A); mientras que en el genotipo 482 la inducción fue más temprana alcanzando su máxima expresión relativa (0,85 “fold”) a las 12 hdi (Figura 24, B). Con respecto al gen de la quitinasa, el genotipo 222 mostró una expresión relativa pico (1,19 “fold”) a las 24 hdi (Figura 25, A), mientras que en el genotipo 482 la expresión máxima (0,81 “fold”) se alcanzó a las seis hdi (Figura 25, B). Las muestras control no mostraron inducción de ninguno de los dos genes durante el ensayo y su expresión se mantuvo constante (Figura 26). Los resultados fueron validados por los controles negativos (RT⁻) con el gen PR2 (Figura 27) y los controles negativos sin templado, los cuales no amplificaron ningún producto de PCR como era esperado.

6. DISCUSIÓN

Los estudios que se presentan en esta investigación constituyen la primera descripción del proceso de infección de *Botrytis cinerea* en *Rosa* en el Ecuador, mecanismo que hasta ahora solo había sido descrito para uva en la literatura consultada. Las observaciones microscópicas indican que el patógeno logra establecer la germinación de los conidios adheridos a la superficie foliar apenas dos horas después de la infección (hdi), esta etapa es crucial antes de la penetración y colonización (Doehlemann *et al.*, 2005, 2006). Posteriormente la espora desarrolla prolongaciones que corresponden a los tubos germinales. En los extremos de estas prolongaciones se aprecia una inflamación que morfológicamente correspondería a la estructura de infección conocida como apresorio (Figura 14 A), la cual secreta enzimas (cutinasa y lipasa) para degradar el tejido y así penetrarlo (Fourie y Holz, 1995; Rolke *et al.*, 2007). La secreción de estas enzimas permite que el patógeno ingrese al hospedero causando una quema oxidativa para dañar el tejido, en lugar de emplear presión física para librar las barreras físicas de la planta. No obstante, en este trabajo se observó que las hifas del micelio ingresaron al interior del tejido vegetal utilizando los estomas para penetrar en las hojas (Figura 14, C). Siendo *B. cinerea* un hongo oportunista, es válido pensar que éste aproveche la ruta de ingreso con la menor resistencia y que implique el menor gasto energético (Rolke *et al.*, 2007).

A los cuatro días después de la infección (ddi), una vez que el patógeno colonizó el interior del tejido vegetal, se evidenciaron los primeros síntomas de muerte celular en la planta correspondiente a la formación de la lesión primaria (van Kan, 2006). La muerte celular posiblemente puede deberse a dos razones: la primera a las toxinas producidas por el hongo, pues al ser un patógeno necrófago y polífago, secreta fitotoxinas no específicas para matar las células del hospedero. Dentro de estas, la más conocida es el sesquiterpeno

botridial que es producido durante la infección e induce la clorosis y el colapso celular facilitando así la penetración y colonización (Choquer *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2007). Adicionalmente a las fitotoxinas, *B. cinerea* produce otras toxinas conocidas como compuestos reactivos del oxígeno durante la infección, de los cuales el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el principal compuesto que se acumula en las etapas tempranas de la infección. Este ocasiona estrés oxidativo capaz de dañar el ADN y causar la oxidación de ácidos grasos y proteínas, así como causar la inactivación de enzimas al reducir sus cofactores (Schouten *et al.*, 2002; Rolke *et al.*, 2007).

La segunda causa de muerte celular puede deberse a una reacción oxidativa causada por el hospedero como respuesta al ataque de *B. cinerea* (Govrin y Levine, 2000). Los compuestos reactivos del oxígeno producidos por la planta son necesarios para una defensa mediada por la expresión de genes y para la reacción hipersensible (RH), la cual inhibe la expansión del patógeno limitando su acceso a nutrientes y agua (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Govrin y Levine, 2000). En *Arabidopsis thaliana* se ha evidenciado que plantas con una respuesta de muerte celular retrasada o reducida son más resistentes a la infección de *B. cinerea* y, por el contrario, plantas con muerte celular acelerada son más susceptibles (van Baarlen *et al.*, 2007). Esto explica los bajos porcentajes de daño tisular en las etapas tempranas del ensayo en los genotipos resistentes, los que se mantuvieron bajos hasta el final del experimento (Figura 12).

Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio el hongo fue capaz de completar su ciclo infeccioso al final de nueve días desde que se inició el proceso. Fue posible evidenciar los pasos infecciosos, similares a los descritos por van Kan (2006): unión del conidio, germinación, formación del apresorio, penetración de la superficie vegetal, muerte del tejido del hospedero y formación de la lesión primaria, expansión de la

lesión, maceración del tejido y esporulación. Esta investigación aporta al conocimiento sobre este proceso que es poco conocido en rosas y menos aún con sepas del hongo aisladas en Ecuador.

En los estudios realizados para evaluar la respuesta de la planta ante la infección del patógeno se identificaron dos genotipos (222 y 463) de *Rosa* spp. resistentes a *B. cinerea* bajo las condiciones ensayadas. Se los consideró resistentes dado que, dentro de los diez genotipos incluidos en el estudio, mostraron las características que se consideran importantes para clasificar a una planta resistente a un patógeno (Agrios, 2005). Estos genotipos controlaron de forma eficaz el crecimiento y reproducción del patógeno, lo que se evidenció como poco daño en el tejido vegetal, consistente con baja proliferación del patógeno. El resto de los genotipos evaluados permitieron un crecimiento y reproducción exitosa del hongo, lo que ocasionó la muerte de la planta al final del ensayo bajo las condiciones de este estudio.

De acuerdo a la clasificación de severidad de *B. cinerea* se le conoce como agresivo y latente, teniendo en cuenta si se manifiestan los síntomas en el tejido o no, respectivamente (Dugan *et al.*, 2002; Elad *et al.*, 2007a). El patotipo “Transposa” utilizado en este estudio es correspondiente con el tipo agresivo por la amplitud de las lesiones ocasionadas en los órganos vegetales. Sin embargo, los genotipos que mostraron resistencia se caracterizaron por limitar el ataque del patógeno de tal manera que hasta el final del estudio no se apreciaron síntomas evidentes.

Adicionalmente a la sintomatología, las curvas de progreso de la enfermedad y los valores de AUDPC confirmaron la clasificación de los genotipos 222 y 463 como resistentes. En la Figura 12 se observa que las curvas de progreso de la enfermedad para

los diez genotipos estudiados tienen comportamientos distintos, esto se debe posiblemente a respuestas diferenciales de defensa frente al ataque de *B. cinerea*. Los resultados muestran cuatro patrones que son: A) tendencia de disminución y posterior incremento, B) asintóticos, C) sigmoides y D) pendiente cero, muy baja o negativa. Las curvas con tendencia de disminución y posterior incremento (genotipos 369 y 95) reflejan posiblemente una mejoría de la enfermedad debido a una respuesta de defensa de la planta que se produce en una etapa intermedia del periodo de infección pero que no es totalmente efectiva, por lo que la enfermedad avanza. Las curvas asintóticas (genotipos 414, 361, 370, 482 y 511) sugieren que la respuesta de defensa de la planta es poco efectiva para controlar el desarrollo de la enfermedad. Las curvas sigmoides (genotipo 419) indican una defensa temprana y sostenida de la planta ante el ataque del hongo, no obstante el incremento brusco de la curva sugiere que el patógeno logra evadir estas respuestas y la enfermedad progresa hasta provocar la muerte.

Las curvas de pendiente cero, muy baja o negativa (genotipos 222 y 463) muestran una posible defensa temprana y constante que es eficiente para detener el avance de la infección (van Kan *et al.*, 1992). Consistentemente estos genotipos presentan valores de AUDPC más bajos, lo cual corresponde a plantas con una mayor resistencia. En tal sentido, el genotipo 222 no solo fue el que mostró menor valor de AUDPC, sino además las pruebas estadísticas lo separan en un subgrupo y agrupan el resto de genotipos en otro.

Los resultados de los análisis de expresión génica dan soporte al planteamiento de que el genotipo 222 es resistente y brindan información preliminar sobre la expresión de genes relacionados con respuestas de defensa en rosa *in planta*. En el transcurso de la interacción entre *B. cinerea* y su hospedero, la planta intenta prevenir la invasión y el crecimiento del patógeno al activar múltiples vías de defensa, incluyendo la producción de metabolitos antifúngicos y proteínas relacionadas con la patogénesis (van Baarlen *et al.*,

2007). Miembros de varias familias de proteínas PRs han mostrado capacidades fungicidas en contra de *B. cinerea in vitro*. En *Arabidopsis* la infección con *B. cinerea* induce la expresión de múltiples genes que codifican proteínas relacionadas con la defensa que son consideradas como marcadores de vías de defensa gobernadas por el ácido salicílico (AS), el etileno (ET) y el ácido jasmónico (AJ) (Benito *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2002).

La acumulación de transcritos de PRs y sus proteínas es una de las respuestas más comunes para una defensa activa. Entre ellas, se ha sugerido que las enzimas hidrolíticas β -1,3- glucanasa (PR2) y quitinasa (PR3) están involucradas en la resistencia de las plantas contra patógenos fúngicos (Derckel *et al.*, 1998). En este estudio, en el cual se analizó comparativamente la inducción de estos genes mediante RT-PCR semicuantitativa, el objetivo no fue medir cambios menores o el número exacto de copias, sino el incremento o reducción en los niveles de expresión de al menos 1,2 *fold* con respecto a un gen constitutivo. El gen del factor de elongación 1 alfa, utilizado para la normalización de la concentración del ADNc y como control de la eficiencia de la reacción, presentó una expresión estable bajo las condiciones ensayadas validando su selección como gen constitutivo (Nicot *et al.*, 2005). Esto permitió evaluar los cambios en expresión de los genes de proteínas PRs y hacer una estimación cuantitativa de los mismos.

Los análisis de expresión temporales de los genes quitinasa y glucanasa revelaron diferencias entre el genotipo susceptible y el resistente. Así, el genotipo resistente registró un incremento de la transcripción del gen de la quitinasa más temprano y con valores más altos que el genotipo susceptible, lo cual está en concordancia con reportes de otros sistemas planta-hongo (Netzer *et al.*, 1979; Joosten y De Wit, 1989; Daugrois *et al.*, 1990;

van Kan *et al.*, 1992). En el caso del gen de la glucanasa la inducción más temprana fue detectada en el genotipo susceptible y alcanzó niveles similares en ambos genotipos.

Se conoce que la defensa contra patógenos rara vez está basada en un solo gen, sino que requiere la activación de varios genes en forma de una cascada de señalizaciones (Agrios, 2005). Fue evidente en los resultados obtenidos que hay un patrón de expresión diferente en dependencia del genotipo; en el susceptible, hubo una inducción tardía de la quitinasa y temprana de la glucanasa, mientras que en el resistente la expresión fue contraria, la quitinasa temprana y la glucanasa tardía. Esto sugiere que la activación temprana del gen de la quitinasa puede representar el inicio de la cascada de inducción de genes para una defensa efectiva en contra de *B. cinerea*. Es posible que la inducción tardía del gen de la glucanasa en el genotipo resistente sea estimulada por la activación temprana del gen de la quitinasa, sugiriendo que este gen desempeña un papel importante en la cascada de defensa en contra de *B. cinerea* en *Rosa* spp. No obstante para conocer de forma integral la respuesta de defensa en rosa ante este hongo es necesario ampliar la identificación y caracterización de otros genes de proteínas PRs que puedan estar implicados en este mecanismo. Además, se recomienda determinar las variaciones cuantitativas de la expresión de estos genes como mecanismo de defensa de *Rosa* spp. ante este patógeno mediante PCR cuantitativa (qPCR) (Derveaux *et al.*, 2010), pues esta técnica permitirá identificar hasta mínimos cambios en la activación o desactivación de los genes de proteínas PRs.

En rosa hay una falta de información sobre genes de proteínas PR y su inducción frente a un patógeno. En general, el rol de las proteínas PRs en la resistencia al moho gris no ha sido esclarecido por completo y todavía es objeto de controversia. En estudios realizados en uva se demostró que la quitinasa (PR3) presenta una de las actividades

brotrizadas más elevadas (Derckel *et al.*, 1998; Salzman *et al.*, 1998). La quitinasa es la enzima responsable de digerir la quitina, un constituyente principal de la pared celular de hongos fitopatógenos, por lo que es evidente la importancia del rol que desempeña en la respuesta de defensa ante este patógeno (Singh *et al.*, 2007). La quitinasa hidroliza los enlaces glicosídicos β -1,4 en la quitina para generar productos como N-acetilglucosamina y N,N-diacetilquitibiosa (Cohen-Kupiec y Chet, 1998). Las quitinasas del apoplasto juegan un rol en la transducción de señales de las vías de defensa ante la infección del hongo. Se cree que las quitinasas al hidrolizar la quitina de la pared celular generan elicitores a partir de los polisacáridos y glicoproteínas resultantes de la digestión (Kasprzewska, 2003). Los elicitores, pequeñas moléculas de señalización, producidos por las quitinasas del apoplasto activan la síntesis de quitinasas vacuolares al unirse al receptor, posteriormente estas son las que inhibirán el crecimiento del hongo (Collinge *et al.*, 1993). A su vez estos elicitores inducen la expresión de otros genes PR al activar cascadas de transducción de señales para la respuesta de defensa. En *A. thaliana* se ha demostrado que la sobre-expresión del gen de la quitinasa (PR3) otorga resistencia ante *B. cinerea* reduciendo la tasa de la enfermedad y el tamaño de la lesión (Pak *et al.*, 2009). Se ha establecido que las quitinasas actúan sinérgicamente con PR2 (β -1,3-glucanasa) y son capaces de inhibir el crecimiento del hongo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Schlumbaum *et al.*, 1986; Mauch *et al.*, 1988; Zhu *et al.*, 1994; Jach *et al.*, 1995).

La glucanasa es la enzima encargada de catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos β -1,3 en los β -1,3-glucanos de la pared celular de los hongos (Lawrence *et al.*, 2000). En uva se conoce que la glucanasa es capaz de restringir el crecimiento de hongos patógenos al tener un efecto inhibitorio sobre el desarrollo del tubo germinal (Giannakis *et al.*, 1998). La glucanasa es considerada generalmente como la primera línea de defensa en contra de una infección fúngica cuando su expresión es constitutiva en altos

niveles (Lawrence *et al.*, 2000). Probablemente su rápida inducción y/o la síntesis de proteínas como respuesta a la infección de *B. cinerea* podría tener una función importante durante las etapas tempranas de la interacción como una defensa base, así como también podría estar ayudando a la resistencia a este patógeno.

La expresión de estos genes de proteínas PRs es inducida por químicos de señalización de defensa/estrés, principalmente el ácido jasmónico, por lo cual se las considera como marcadores de la vía AJ/ET. El mecanismo de defensa hacia *B. cinerea* no se conoce en rosas y existe poca evidencia que soporte el rol potencial de las proteínas PR para una resistencia efectiva contra *B. cinerea* (van Baarlen *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados de este estudio coinciden con lo informado para otras especies (Ej.: *A. thaliana*), en los que se ha visto que las defensas más eficientes requieren la señalización del ácido jasmónico y el etileno (Glazebrook, 2005).

Los ensayos de inoculación con *B. cinerea* se llevaron a cabo con un patotipo aislado e identificado en cultivos de rosa en Ecuador, lo cual proporciona un valor agregado a los resultados de este estudio. Los cuatro patotipos (“Transposa”, “Vacuma”, “Solo Flipper” y “Solo Boty”) identificados presentaron diferentes prevalencias entre los lugares de muestreo (El Quinche y Cayambe, Pichincha, Ecuador), lo cual sugiere que en el país la prevalencia de los patotipos puede tener una dependencia espacio-temporal, así como también influencias debido a interacciones complejas entre el ambiente, hospedero y el patógeno (Agrios, 2005).

Estudios de este tipo realizados en *Rosa* spp. son escasos, la mayoría de la información disponible sobre la detección de patotipos a nivel mundial se ha obtenido en cultivos de uva, para la cual se ha reportado los mismos patotipos en diferentes países,

como Francia (Giraud *et al.*, 1999, Ma y Michailides, 2005, Martínez *et al.*, 2005), Chile (Ma y Michailides, 2005), Bangladesh (Isenegger *et al.*, 2008), India (Isenegger *et al.*, 2008), Nepal (Isenegger *et al.*, 2008), Australia (Isenegger *et al.*, 2008) y Hungría (Váczy *et al.*, 2008). Los estudios mencionados reportan observaciones similares a las de este trabajo en cuanto a identificación de patotipos y distintos porcentajes de prevalencia entre los lugares y tiempo del estudio. En Francia, por ejemplo, los patotipos con más prevalencia correspondieron a “Vacuma” (Giraud *et al.*, 1999; Ma y Michailides, 2005) y “Transposa” (Martínez *et al.*, 2005), en Chile “Vacuma” fue el patotipo con mayor frecuencia (Ma y Michailides, 2005), en India y Nepal (Isenegger *et al.*, 2008) los patotipos *solo* “Flipper” y “Transposa”, y en Australia (Isenegger *et al.*, 2008) los patotipos “Transposa” y *solo* “Boty”.

Se piensa que la diferencia en las frecuencias de los patotipos se debe a cambios en las condiciones ambientales, así como también a la resistencia a fungicidas, a la aplicación o no de agroquímicos, órgano de la planta muestreado, estado del cultivo y limpieza del invernadero (Martínez *et al.*, 2003; Isenegger *et al.*, 2008). Esta diferencia también puede deberse a prácticas de cosecha como la remoción de hojas muertas, poda de flores y recorte de las plantas (Martínez *et al.*, 2005; Váczy *et al.*, 2008). Es probable que los desechos producidos por estas prácticas sean una de las fuentes principales de material en descomposición y materia orgánica para el desarrollo y reproducción del hongo. De igual manera, las heridas generadas en las plantas durante la cosecha podrían estar facilitando el ingreso del hongo, así como también es posible que las herramientas utilizadas en la poda sean fuente de infección y propagación del patógeno.

En esta investigación fue posible constatar la coexistencia en simpatria de los distintos patotipos, lo cual puede ser explicada por una diferencia en las estrategias de vida

de los patotipos de *B. cinerea*: El patotipo “Vacuma” presenta una estrategia ruderal más marcada que el patotipo “Transposa”, caracterizada por un crecimiento rápido y una esporulación elevada. Esto se evidenció por un crecimiento del micelio más rápido que en el patotipo “Transposa” (Martínez *et al.*, 2005). Similarmente, se registraron diferencias en la virulencia entre los patotipos, las cuales pueden proporcionar una ventaja diferencial para poder colonizar y degradar los tejidos de las plantas (Ma y Michailides, 2005). En estudios realizados en uva se ha demostrado que el patotipo “Transposa” es significativamente más virulento que el patotipo “Vacuma” (Martínez *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2005).

A pesar de que en la presente investigación no se realizó un estudio de virulencia entre “Vacuma” y “Transposa”, por la información disponible en uva, se eligió realizar la inoculación con el patotipo reportado como más virulento (“Transposa”). La muerte de ocho de los genotipos de rosa utilizados (Figura 11, J) sugiere que en *Rosa* éste también se manifiesta como altamente virulento. También se podría sugerir que la mayoría de los genotipos estudiados fueron sensibles al patógeno, pese a la selección basada en las observaciones en campo y ensayos de infección con *B. cinerea* realizados por Esmeralda Breeding S.A. y en los cuales se registraron a 8/10 como resistentes.

Las prevalencias determinadas proporcionan información sobre lo que ocurría al momento del muestreo. Como se mencionó anteriormente, las frecuencias de los distintos patotipos varían de lugar a lugar y dependiendo del tiempo de muestreo, así como también del genotipo de rosa hospedero. Es posible que la alta prevalencia del patotipo “Vacuma” en Cayambe (Figura 7) se deba a su estrategia de vida de crecimiento rápido y a su habilidad de aprovechar los recursos (desechos) resultantes de la poda de las rosas. Sin embargo, la diferencia entre la prevalencia de los patotipos encontrada en El Quinche y en

Cayambe (Figura 7) puede también ser producto de la diferencia entre el número de muestras colectadas, 11 en el Quiche vs. 40 en Cayambe. Los distintos tamaños de muestra se debieron a que en la finca de Cayambe se trata de reducir al máximo las fuentes de contaminación aplicando fungicidas y eliminando las rosas que presenten síntomas de infección; mientras que en el Quinche se ha reducido la aplicación de fungicidas con miras a un cultivo más verde o ambientalmente amigable. Si se aumenta el número de muestras se podrá tener una mejor idea de la prevalencia de los diferentes patotipos en El Quinche, no obstante considerando los parámetros mencionados anteriormente que influyen sobre las variaciones en prevalencia.

Los resultados obtenidos aquí permiten establecer una línea base para realizar un seguimiento sobre la estructura de los patotipos de *B. cinerea* en cultivos de rosa ecuatorianos y facilitar el desarrollo de planes de manejo y control del patógeno más eficientes y dirigidas. Sin embargo, para ello es necesario realizar estudios que incluyan la resistencia de *B. cinerea* a estos agroquímicos de tal manera que se pueda seleccionar el fungicida más eficiente. Todo esto con el fin de disminuir el uso de estos químicos nocivos.

Finalmente, la identificación y confirmación de los genotipos resistentes a *B. cinerea* a través de técnicas tradicionales y moleculares facilitará la selección de marcadores moleculares de ADN propios de rosa para la identificación rápida de genotipos resistentes. Esto permitirá realizar la selección de progenitores por técnicas moleculares y la evaluación de los híbridos en un programa de mejoramiento genético. La floricultura ecuatoriana se beneficiará al garantizar la calidad del material exportado con flores que exhiban resistencia en el campo y también durante su permanencia en florero.

7. CONCLUSIONES

Los patotipos de *Botrytis cinerea* prevalentes fueron *Transposa*, *Vacuma*, *Solo flipper* y *Solo boty*, los que coexisten en simpatría y las frecuencias de los distintos patotipos varían dependiendo del lugar, del tiempo de muestreo y del genotipo hospedero. Entre estos el patotipo *transposa* correspondió con el tipo agresivo.

El proceso infeccioso de *B. cinerea* en *Rosa* spp. tuvo una duración de nueve días, que inició con el ingreso del patógeno al interior del tejido vegetal a través de los estomas de la planta, seguido por ocho etapas de colonización y establecimiento, similar a lo observado en otras especies.

De los diez genotipos de *Rosa* spp. evaluados, el genotipo 222 demostró ser resistente a *B. cinerea* por que presentó poco daño en el tejido vegetal, la curva de progreso de la enfermedad tuvo una pendiente de cero y obtuvo el menor valor de AUDPC; además alcanzó el mayor nivel de expresión de los genes de defensa evaluados.

Los análisis de la expresión génica diferencial y temporal de los genes de defensa quitinasa y glucanasa revelaron que el genotipo resistente registró un incremento de la transcripción del gen de la quitinasa más temprano y con valores más altos que el genotipo susceptible; mientras que el gen de la glucanasa mostró una inducción más temprana en el genotipo susceptible y alcanzó niveles similares en ambos genotipos.

8. LITERATURA CITADA

- Albertini, C., Thebaud, G., Fournier, E. y Leroux, P. 2002. Eburicol 14 α -demethylase gene (CYP51) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. Mycological Research 106: 1171-1178.
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Quinta edición. Elsevier Academic Press. Estados Unidos. Pp. 386-390.
- Benito, E., ten Have, A., van't Klooster, J. y van Kan, J. 1998. Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 104 (2): 207-220.
- Benito, E., Arranz, M. y Eslava, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revisión Iberoamericana Micología (17): S43-S46.
- Bent, A. 1996. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. The Plant Cell (8): 1757-1771.
- Bonasera, J., Kim, J. F., y Beer, S. 2006. PR genes of apple: Identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. BMC Plant Biology 6 (1): 1- 12.
- Cabrera, M., Álvarez, R. y Sosa de Castro, N. 2006. Patologías que afectan a *Rosa* sp. en Corrientes, Argentina. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste: A-023.
- Chamorro, D. 2005. Caracterización de poblaciones de *Botrytis cinerea* resistentes a fungicidas en rosas (*Rosa* sp.) en las provincias de Pichincha y Cotopaxi. Ecuador. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Central del Ecuador.

- Chassot, C., Buchala, A., Schoonbeek, H., Métraux, J. y Lamotte O. 2008. Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. *The Plant Journal* 55: 555–567.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J., Simon A., y Viaud, M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letter* 277: 1–10.
- Chung, C. 2006. Trypan blue and Aniline blue staining.
- Cohen-Kupiec, R. y Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* 9 (3): 270-277.
- Collinge, D., Kragh, K., Mikkelsen, J., Nielsen, K., Rasmussen, U. y Vad, K. 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal* 3: 31–40.
- Corpei. 2009. Perfil del Sector Florícola. Perfiles de sectores. Centro de información e inteligencia comercial. Quito, Ecuador.
- Daugrois, J., Lafitte, C., Barthe, J. y Touze, A. 1990. Induction of β -1,3- glucanase and chitinase activity in compatible and incompatible interactions between *Colletotrichum lidemuthianum* and bean cultivars. *Journal of Phytopathology* 130: 225-234.
- Davidsohn, I. y Bernard, J. 1978. Diagnóstico clínico por el laboratorio. Sexta Edición. Salvat Editores S.A. Barcelona, España Pp. 120-122.
- Derckel, J., Audran, J., Haye, B., Lambert, B. y Legendre, L. 1998. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and β -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum*, 104: 56–64.
- Derveaux, S., Vandesompele, J. y Hellemans, J. 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time. *PCR Methods* 50 (4): 227-230.

- Díaz, J., ten Have, A. y van Kan, J. 2002. The Role of Ethylene and Wound Signaling in Resistance of Tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 129: 1341–1351
- Diolez, A., Marches, F., Fortini, D. y Brygoo, Y. 1995. Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:103-108.
- Doehlemann, G., Molitor, F. y Hahn, M. 2005. Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* 42 (7): 601-610.
- Doehlemann, G., Berndt, P. y Hahn, M. 2006. Different signalling pathways involving a Gα protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular Microbiology* 59 (3): 821-835.
- Dugan, F., Lupien, S. y Grove, G. 2002. Incidence, Aggressiveness and *In Planta* Interactions of *Botrytis cinerea* and other Filamentous Fungi Quiescent in Grape Berries and Dormant Buds in Central Washington State. *Journal of Phytopathology* 150: 375–381.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. 2007a. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems—an introduction. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Pp. 1-8.
- Expoflores. 2010. Producción y exportación de flores [en línea]. <<http://www.expoflores.com/producers/esp>> [consultado: diciembre 2010]
- Fainstein, R. 1997. Manual para el cultivo de rosas en latinoamérica. Ecuaooffset Cia. Ltda. Ecuador. P. 247.
- Ferre, F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus myth. *PCR Methods Applied* 2 (1) 1, 1-9.

- Feys, B. y Parker, P. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* 10: 449-455.
- Freeman, W., Walker, S., y Vrana, K. 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques* 26, 112-125.
- Fourie, J. y Holtz, G. 1995. Initial Infection Processes by *Botrytis cinerea* on Nectarine and Plum Fruit and the Development of Decay. *Phytopathology* Pp: 82-87.
- Fournier, E., Giraud, T., Loiseau, A., Vautrin, D., Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J.M. y Brygoo, Y. 2002. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes* 2: 253-255.
- Giannakis, C., Bucheli, C., Skene, K., Robinson, S. y Steele, S. 1998. Chitinase and β -1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defense against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 14-22.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P. y Brygoo, Y. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution* 14: 1177-1185.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K. y Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuata*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89: 967- 973.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*. Pp. 205-227.
- González, G., Moya, M., Sandoval, C., y Herrera, R. 2009. Genetic diversity in Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*): Differential response to *Botrytis cinerea* infection. *Spanish journal of agricultural research* (4), 4, 886-895.

- Govrin, E. y Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* (10): 751–757.
- Hammerschmidt, R. 2009. Chapter 5 - systemic acquired resistance. *Plant Innate Immunity* 51: 173-222.
- Hammond-Kosack, K. y Jones, J. 1996. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *The Plant Cell* (8): 1773-1791.
- Hammond-Kosack, K. y Parker, J. 2003. Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 177 – 193.
- Heussler, P. 1991. Cultivo del rosal. Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador
- Holz, G., Coertze, S. y Williamson, B. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Pp. 9-27.
- Integrated DNA Technologies Inc. 2010. OligoAnalyzer 3.1 [en línea]. <<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx>> [consulta septiembre 2010]
- Invitrogen. Corporation. 2003. TrackIt™ 100 bp DNA ladder. Carlsbad, USA.
- Invitrogen. Corporation. 2006. Low DNA Mass™ Ladder. Carlsbad, USA.
- Invitrogen. Corporation. 2007. Quant-iT™ RNA Assays. Carlsbad, USA.
- Isenegger, D., Ades, P, Ford, R. y Taylor, P. 2008. Status of the *Botrytis cinerea* species complex and microsatellite analysis of transposon types in South Asia and Australia. *Fungal Diversity* 29: 17-26.
- Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J. y Maas, C. 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial

- expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 8: 97–109.
- Jeger, M. y Viljanen-Rollinson, S. 2001. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 102 (1): 32-40.
- Jones, J. y Dangl, J. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Joosten, M. y De Wit, P. 1989. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases. *Plant Physiology* 89: 945-951.
- Kasprzewska, A. 2003. Plant chitinases- Regulation and Function. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8: 809-824.
- Korbie, D y Mattick, J. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols* (3)9: 1452-1456.
- Lawrence, C. Singh, N., Qiu, J., Gradner, R. y Tuzun, S. 2000. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 211-220.
- Levis, C., Fortini, D. and Brygoo, Y. 1997. *Flipper*, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular and General Genetics* 254: 674-680.
- Ma, Z., y Michailides, T. J. 2005. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Disease* 89: 1083-1089.
- Mauch, F., Hadwiger, L. and Boller, T. 1988. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue : I. Purification and Characterization of Two Chitinases and Two -1,3-Glucanases Differentially Regulated during Development and in Response to Fungal Infection. *Plant Physiology* 87: 325-333.

- Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L., y Scambia, G. 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Procedures Online* 3(1): 19-25.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B. y Fermaud, M. 2003. Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 479-488.
- Martinez, F., Dubos, B. y Fermaud, M. 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* 95: 692-700.
- Menbiburu, F. 2009. Una herramienta de análisis estadístico para la investigación agrícola. Tesis maestría. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, Peru.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. 2005. Sector floricultor en cifras: exportaciones por tipo de flor [en línea]. <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/flores/export_tipo.htm> [consultado: enero 2010]
- Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. 2010. Comercio exterior - índice de precios de los principales productos de exportación del Ecuador [en línea]. <http://www.magap.gob.ec/sigagro/charts/comext_exportaciones.htm> [consultado: noviembre 2010]
- Munoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y. y Giraud, T. 2002. Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research* 106: 594-601.
- Murphy, A., Holcombe, L., y Carr, J. 2000. Characteristics of salicylic acid induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiology Molecular Plant Pathology* 57: 47-54.

- NCBI. 2011a. Basic Local Alignment Search Tool [en línea]. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome> [consultado diciembre 2010]
- NCBI. 2011b. GenBank [en línea]. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> [consultado diciembre 2010]
- Netzer, D., Kitzman, U., y Chet, I. 1979. β -1,3-Glucanase activity and quantity of fungus in relation to *Fusarium* wilt in resistant and susceptible near isogenic lines of muskmelon. *Physiological Plant Pathology* 14: 47-55.
- Nicot, N., Hausman, J., Hoffmann, L., y Evers, D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56 (421), 421, 2907.
- NIH. 2010. Image J: Image processing and analisis in java [en línea]. <<http://rsbweb.nih.gov/ij/>> [consultado noviembre 2010]
- Padilla, S., Cowden, J., Hilton, D., Yuen, B., Law, S., Kullman, S., Johnson, R. Hardman, R., Flynn, K. y Au, D. 2009. Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology*.
- Pak, J. H., Chung, E., Shin, S., Jeon, E., Kim, M. J., Lee, H. Y., Jeung, J., Hyung, N., Lee, J. H., y Chung, Y. 2009. Enhanced fungal resistance in *Arabidopsis* expressing wild rice pr-3 (ogchitiva) encoding chitinase Class IV. *Plant Biotechnology Reports* 3 (2), 147-155.
- Promega. 2009. Reverse Transcription System. Technical Bulletin. Valencia, USA.
- Qiagen.1999. Quiaex® II Handbook. Valencia, USA.
- Qiagen. 2006. Dneasy® Plant Handbook. Valencia, USA.
- Qiagen. 2006b. RNeasy® Mini Handbook . Fourth Edition. Valencia, USA.

Qiagen. 2008. QIAquick® Spin Handbook. Valencia, USA.

R Development Core Team. 2010. R: A Language and Environment for computing [en línea]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0.

Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K., Siewers, V., Tenberge, K., Tudzynski, B. y Tudzynski, P. 2007. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* 5 (1): 17-27.

Rosslenbroich, H. y Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea*: history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19(8-10): 557-561.

Rozen, S. y Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, Pp. 365-386.

Rozen, S. y Skaletsky, H. 2010. Primer3 [en línea]. <<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>> [Consulta: septiembre de 2010]

Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H. y Hunt, M. 1996. Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* (8): 1809-1819.

Salzman, R., Tikhonova, I., Bordelon, B., Hasegawa, P. y Bressan, R. 1998. Coordinate Accumulation of Antifungal Proteins and Hexoses Constitutes a Developmentally Controlled Defense Response during Fruit Ripening in Grape. *Plant Physiology* 117: 465-472.

Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U., and Boller, T. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324, 365-367.

- Singh A., Isaac, S. y Sakthivel N. 2007. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. *Protein Expression and Purification* 56 (1): 100-109.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third Edition. Ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. U.S.A.
- Schouten, A., Tenberge, K. B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B. y van Kan, J. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 3: 227–238.
- Strobel G.A., Dirkse E., Sears. J. y Markworth C. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147: 2943–2950.
- Thomma, B., Eggermont, K., Tierens, K. y Broekaert, W. 1999. Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 121: 1093–1101.
- Thomma, B., Penninckx, I., Broekaert, W. y Cammue, B. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion Immunology* 13: 63–68.
- Váczy, K., Sándor, E., Karaffa, L., Fekete, E., Fekete, É., Árnayasi, M., Czeglédi, L., Kövics, G., Druzhinina, I. y Kubicek, C. 2008. Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. *Phytopathology* 98 (12): 1312-1319.
- Van Baarlen, P., Staats, M. y Van Kan, J. 2004. Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology* 5 (6): 559-574.
- Van Baarlen, P., Legendre, L. y Kan, J. 2007. Plant defence compounds against *Botrytis infection*. *Botrytis: Biology, Pathology and Control* Pp. 43-161.
- Van Kan, J., Joosten, M., Wagemakers, C., van den Berg-Velthuis, G. y de Wit, P. 1992. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Molecular Biology* 20: 513-527.

- Van Kan, J. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11(5): 247-253.
- Van Loon, L. y Van Strien, E. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (55): 85-97.
- Watson, J., Myers, R., Caudy, A. y Witkowski, J. 2007 . *Recombinant DNA: Genes and Genomes-A short course*. W.H. Freeman Company. New York.USA.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y Van Kan, J. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8 (5): 561–580.
- Zhu, Q., Maher, E., Masoud, S., Dixon, R. y Lamb, C. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of Chitinase and Glucanase genes in transgenic tobacco. *Nature Biotechnology* 12, 807 – 812.

9. FIGURAS

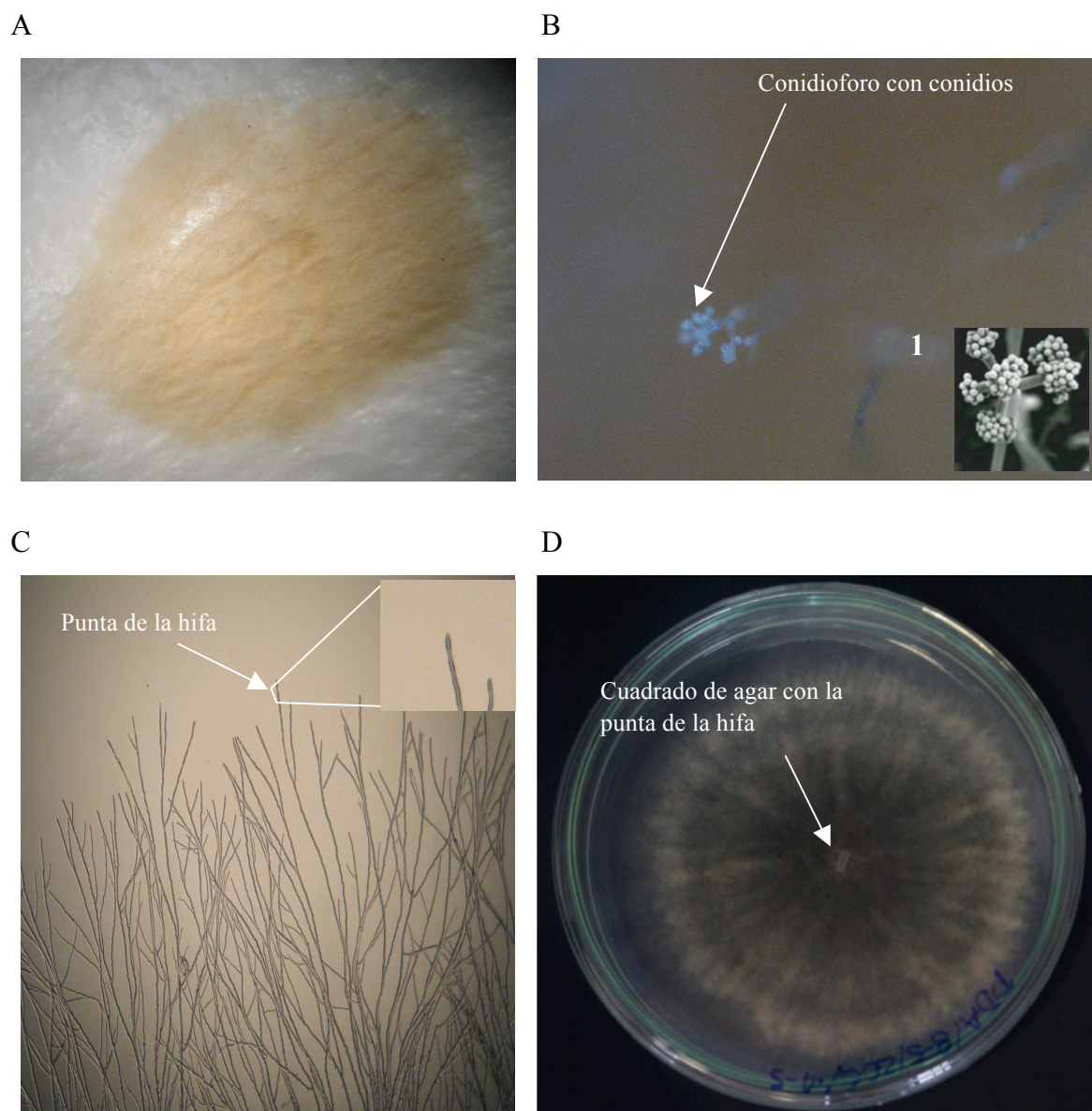
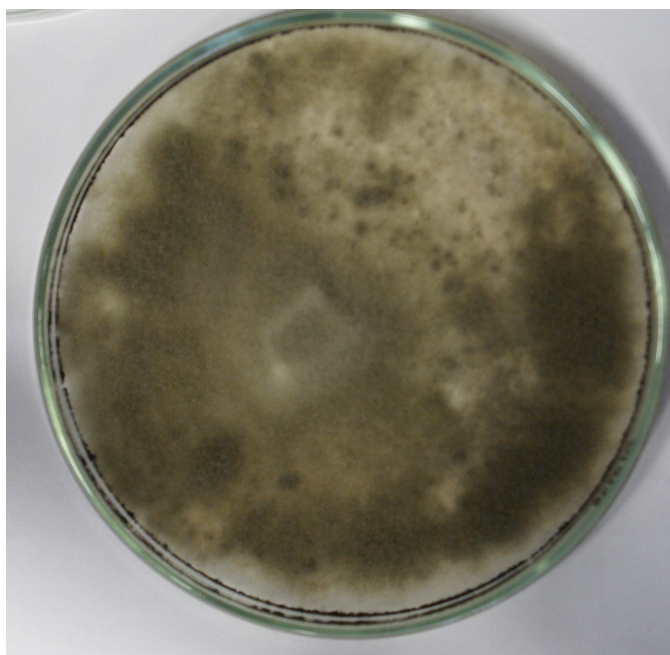


Figura 1. Fotografías de *Botrytis cinerea* A) Pétalo de rosa infectado 2X, B) Conidioforo con conidios maduros 20 X, ¹vista de conidioforo bajo microscopio electrónico (tomado de: Williamson *et al.*, 2007) C) Vista con estereomicroscopio de la punta de la hifa más lejana 10 X, D) Crecimiento de la punta de la hifa después de siete días en agar papa dextrosa (PDA).

A



B



Figura 2. Preparación del inóculo. A) Cultivo de *Botrytis cinerea* esporulando en PDA después de 14 días B) Cosecha de las esporas con ayuda de un asa Drigalski.

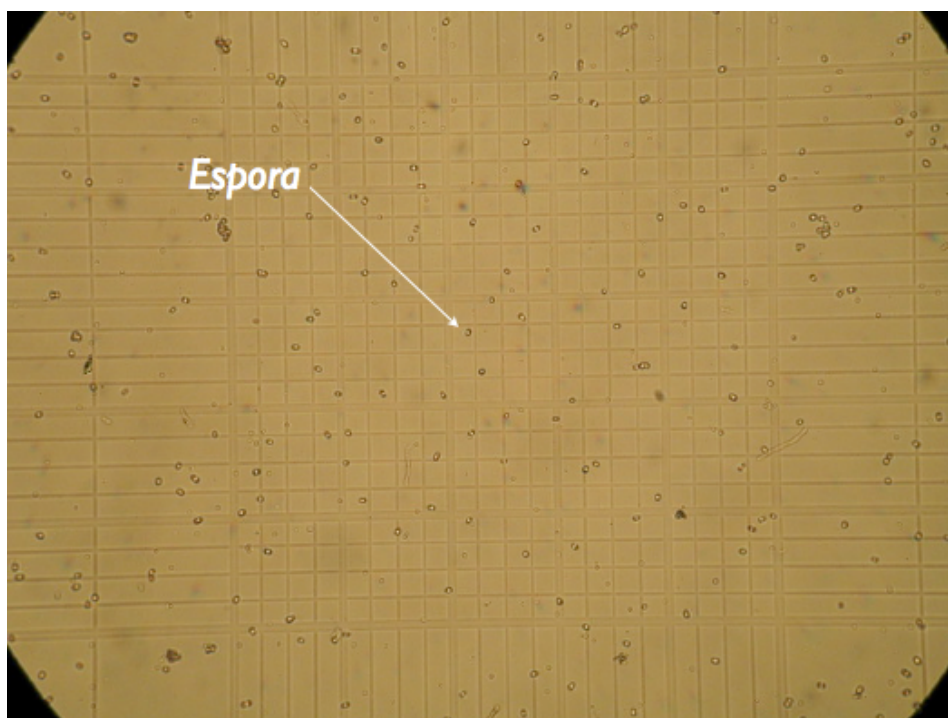


Figura 3. Cámara de conteo hemacitométrico o Neubauer. Se observan las esporas de *Botrytis cinerea* con el fondo cuadriculado. Magnificación 4 X.

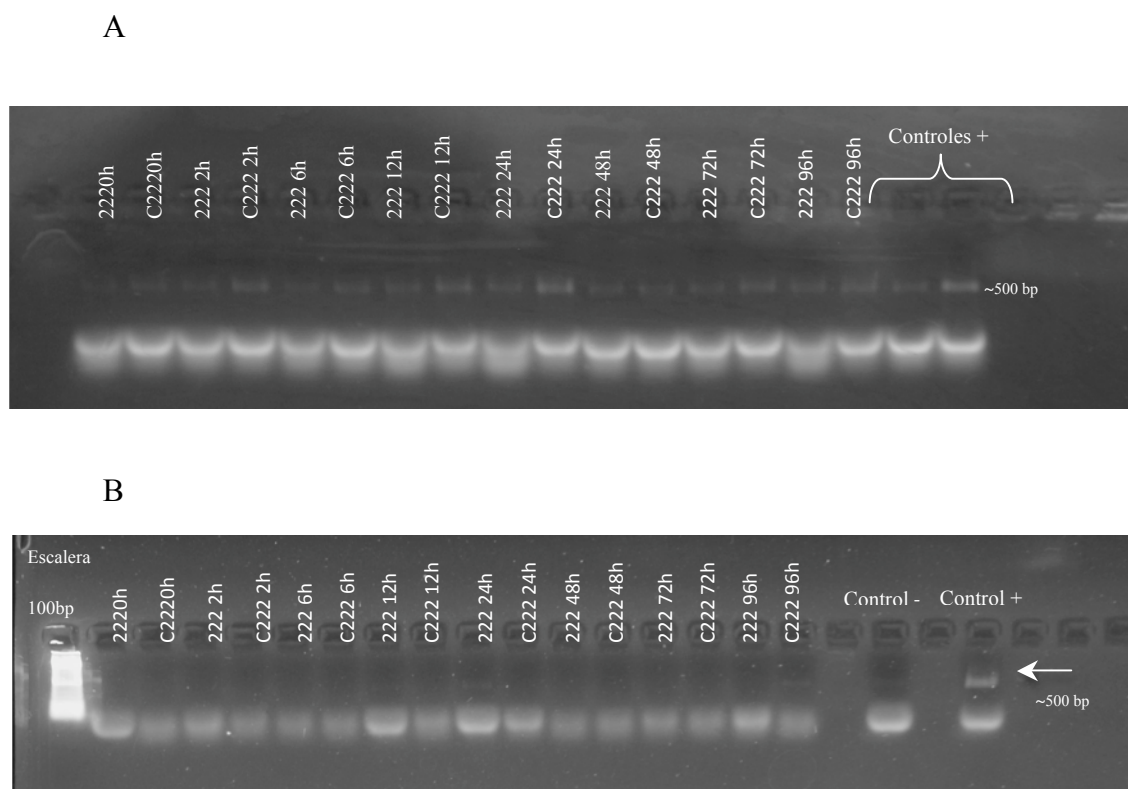


Figura 4. Prueba de contaminación del ARN total de *Rosa* spp. con ADN genómico mediante PCR. Se presentan las amplificaciones con todas las muestras del genotipo 222 (prueba y control, a los siguientes intervalos de tiempo 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas post inoculación - hpi) utilizando los iniciadores para el gen de la glucanasa. Se empleó como templado ARN total. A) Se evidencia contaminación con ADN genómico debido a la presencia de la banda correspondiente al producto de PCR del gen de la glucanasa (~ 500 bp) en todas las muestras. B) Muestras de ARN total contaminadas con ADN genómico tratadas con DNasa I. Se observan bandas solamente en las muestras 222 12h, 222 24h y C222 96h.

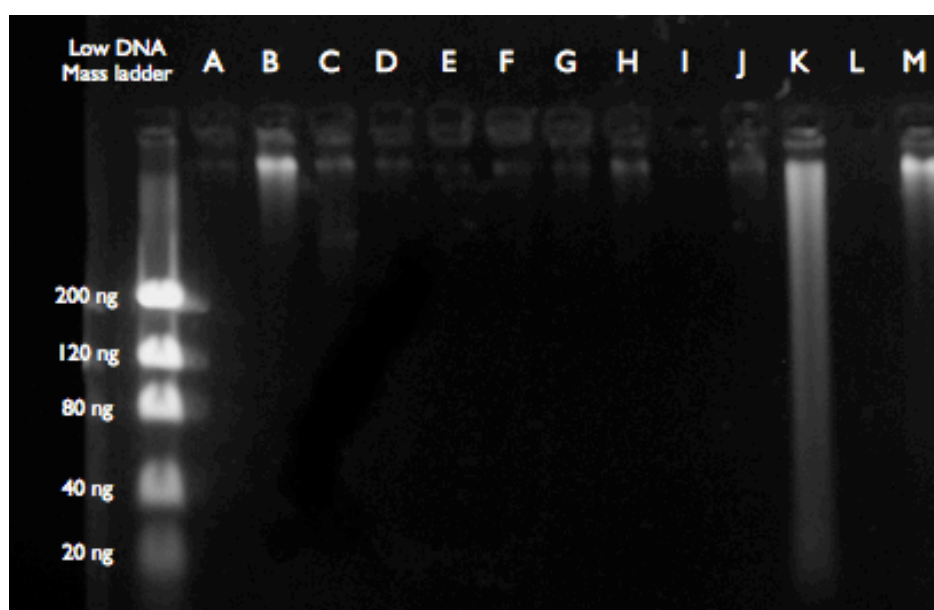


Figura 5. Calidad y concentración del ADN extraído de *Botrytis cinerea*. A, C, D, E, F, G, H, y J tienen un brillo similar a la banda de la escalera que corresponde a 20 ng por lo que su concentración es $\sim 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ($20 \text{ ng} / 4 \mu\text{l} = 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$). B y M son similares a la banda de 40 ng por lo que su concentración es $\sim 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$. En I y L no se observa banda. En K se ejemplifica un ADN de mala calidad debido a degradación.

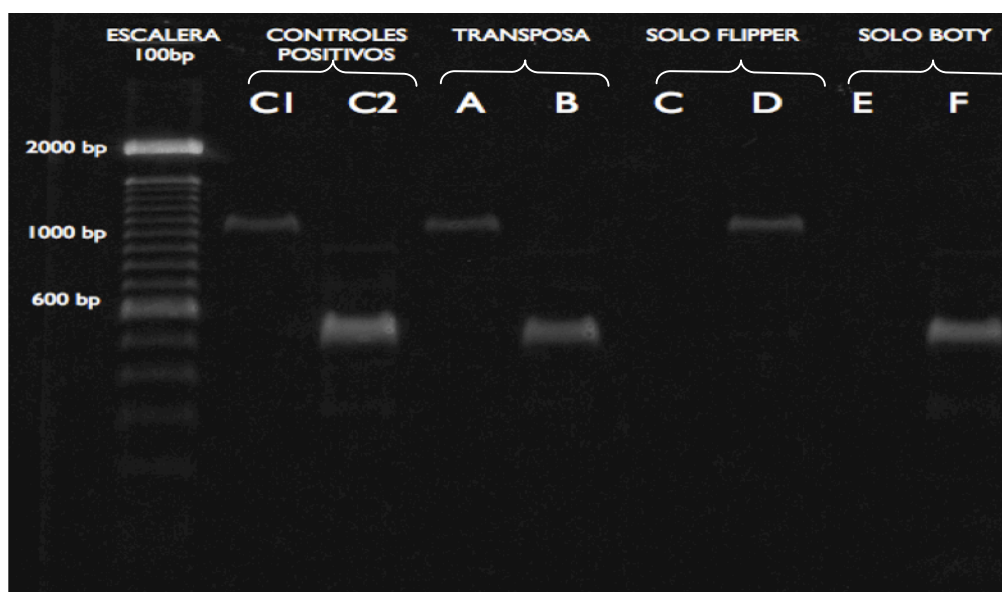


Figura 6. Productos de la amplificación de los retrotransposones *Flipper* y *Boty*. El amplificado para *Boty* fue de ~560 pb y para *Flipper* ~1150 pb. C1 y C2 corresponden a los controles positivos: *Flipper* y *Boty*; A y B corresponden a un aislado del patotipo Transposa; C y D corresponden a un aislado del patotipo solo *Flipper*; E y F corresponden a un aislado del patotipo solo *Boty*.

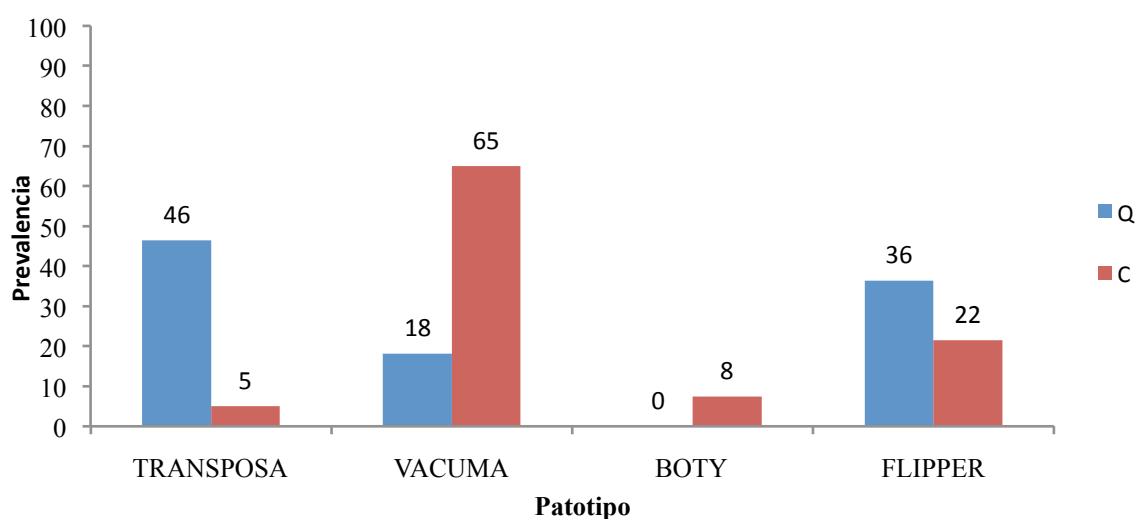


Figura 7. Prevalencia de los distintos patotipos de *Botrytis cinerea* aislados en Cayambe (Rojo) y El Quinche (Azul). En total se colectaron 11 muestras en El quinche y 40 muestras en Cayambe.

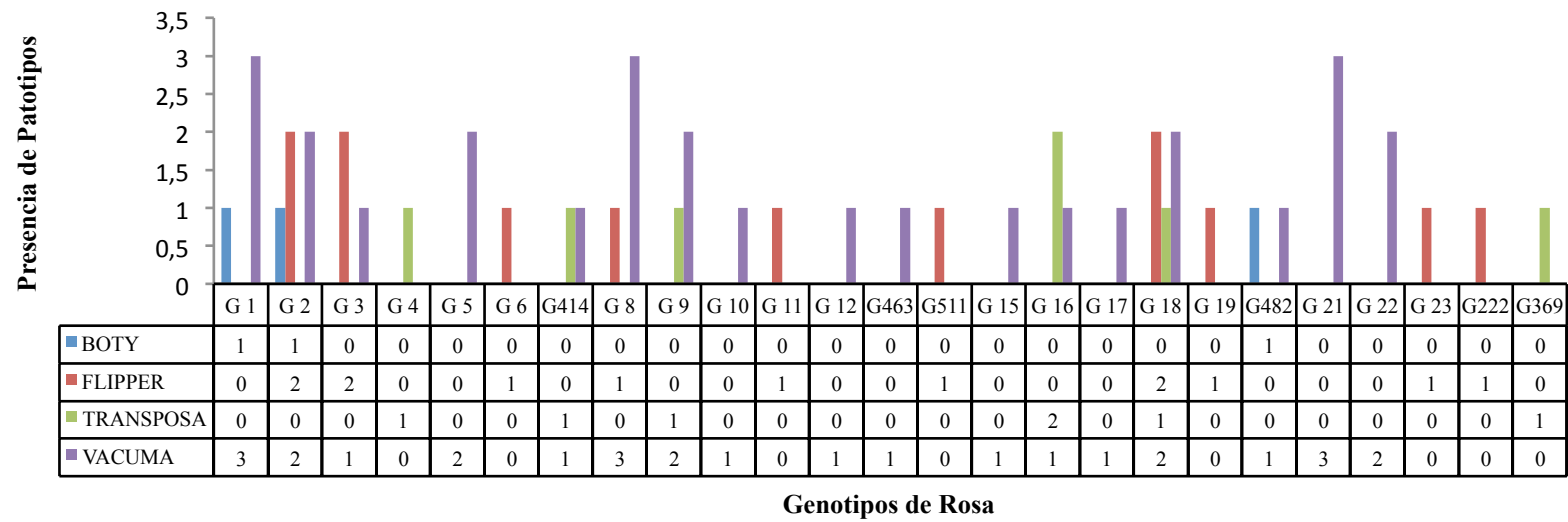


Figura 8. Patotipos identificados por genotipos de *Rosa* spp. En total 51 aislados del hongo colectados en 25 genotipos de *Rosa* spp. denominados G.



Figura 9. Plantas susceptibles a la infección por patógenos 40 días después del inicio del ensayo. Las fotografías ilustran la infección de las plantas por patógenos en el ensayo realizado en invernadero. Los signos de infección corresponden a la enfermedad causada por oidio. Las fotografías corresponden a los tres genotipos reportados como susceptibles por el personal de la empresa Esmeralda Breeding S.A. A) genotipo 414, B) genotipo 419 y C) genotipo 482.

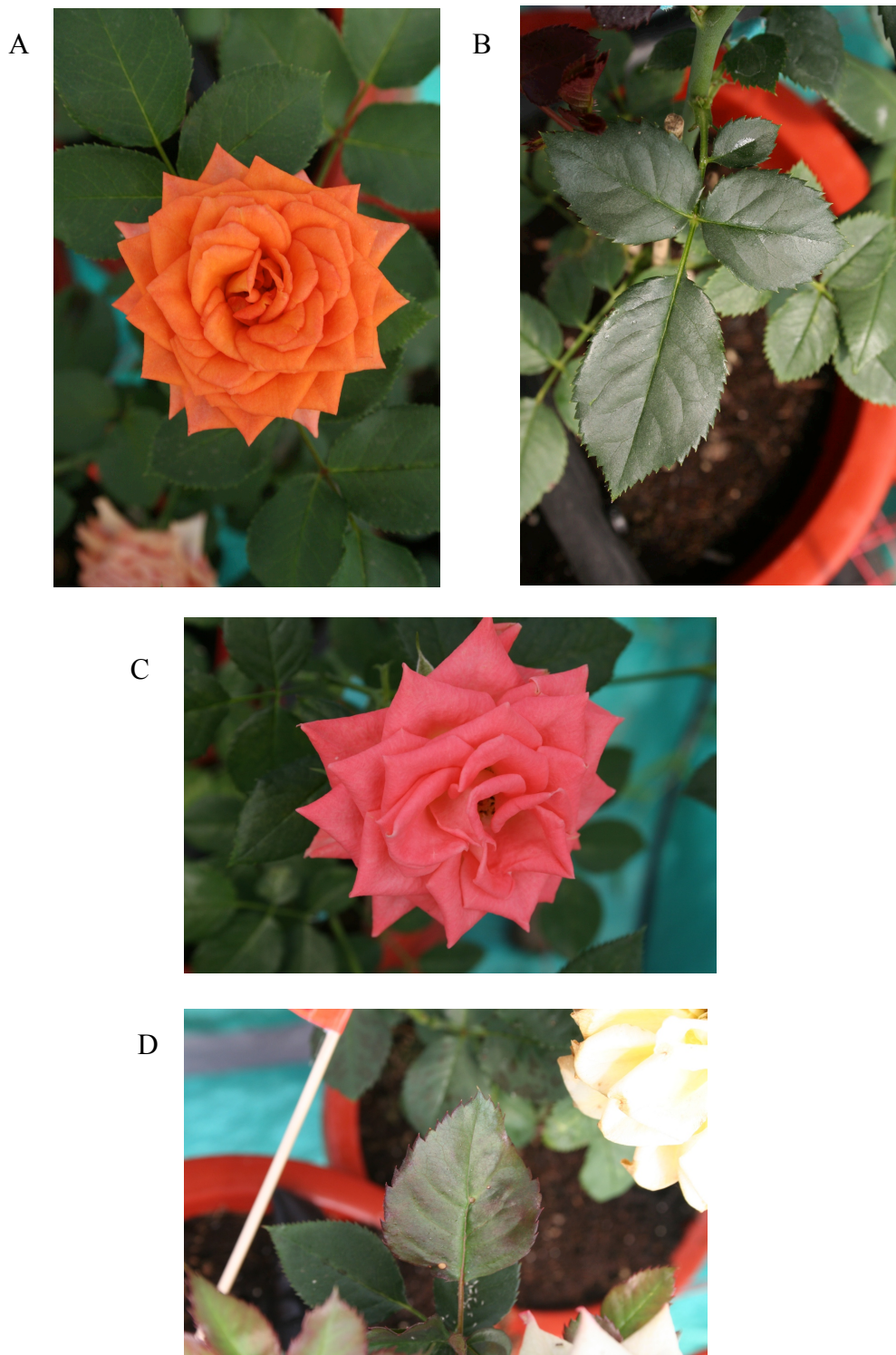


Figura 10. Plantas más resistentes a la infección por patógenos 40 días después del inicio del ensayo. Las fotografías ilustran la infección de las plantas por patógenos en el ensayo realizado en invernadero. Los signos de infección corresponden a la enfermedad causada por oidio. Las fotografías corresponden a los cinco genotipos reportados como resistentes por el personal de la empresa Esmeralda Breeding S.A. A) genotipo 222, B) genotipo 370, C) genotipo 369 y D) genotipo 95.

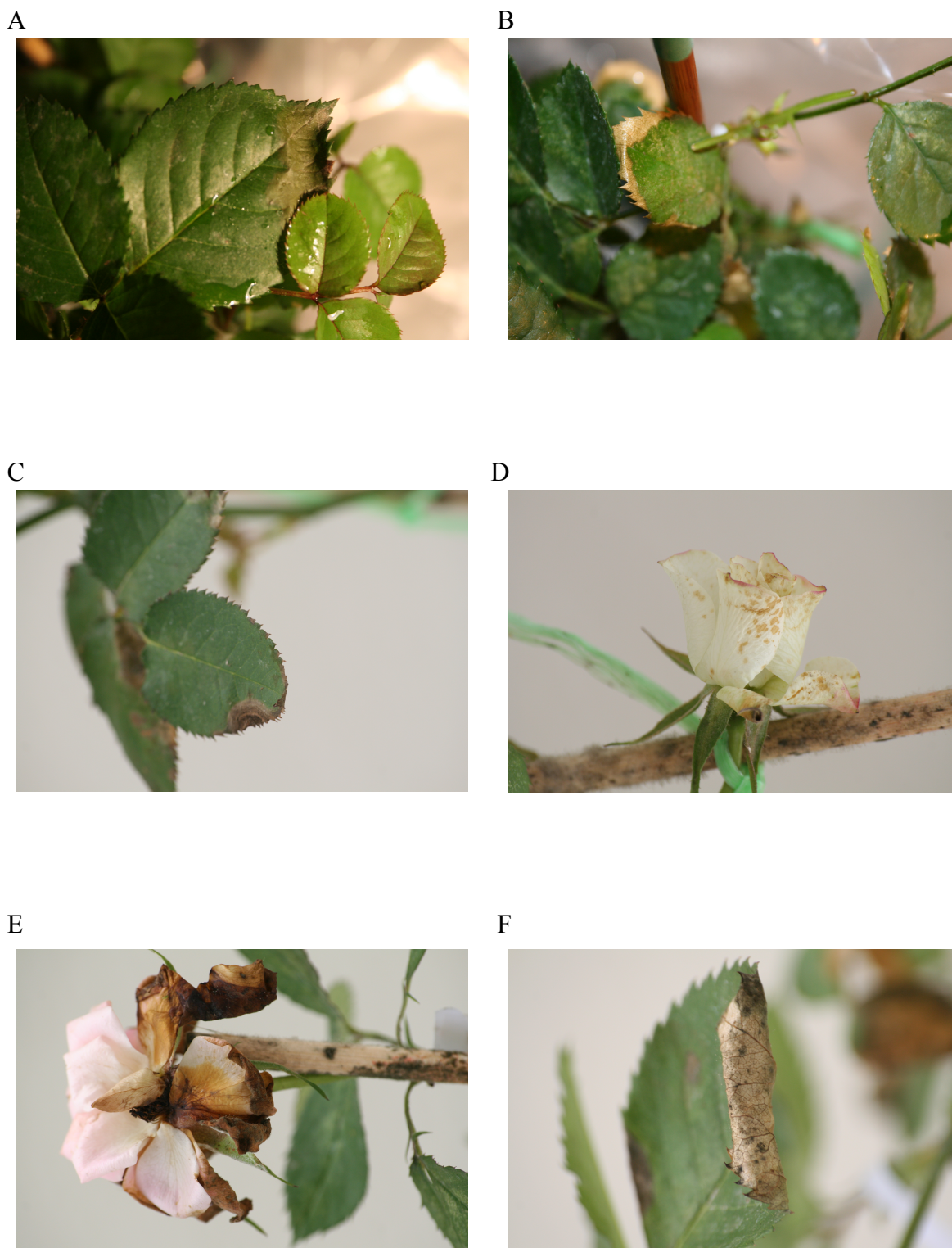


Figura 11. Fotografías del progreso de la enfermedad “podredumbre gris”. A) Genotipo 414 – 4 días después de la infección (ddi), B) Genotipo 361– 4 ddi, C) Genotipo 222– 9 ddi, D) Genotipo 361– 9 ddi, E) Genotipo 369– 9 ddi, F) Genotipo 414– 9 ddi, G) Genotipo 370– 23 ddi, H) Genotipo 482– 23 ddi, I) Genotipo 222– 39 ddi, J) Plantas susceptibles muertas - 39 ddi, K) Genotipos resistentes 222 y 463– 42 ddi, L) Genotipo 222– 42 ddi, M) Genotipo 463– 42 ddi.

G



H



I



J



Figura 11 (Continuación). Fotografías del progreso de la enfermedad “podredumbre gris”. A) Genotipo 414 – 4 días después de la infección (ddi), B) Genotipo 361– 4 ddi, C) Genotipo 222– 9 ddi, D) Genotipo 361– 9 ddi, E) Genotipo 369– 9 ddi, F) Genotipo 414– 9 ddi, G) Genotipo 370– 23 ddi, H) Genotipo 482– 23 ddi, I) Genotipo 222– 39 ddi, J) Plantas susceptibles muertas - 39 ddi, K) Genotipos resistentes 222 y 463– 42 ddi, L) Genotipo 222– 42 ddi, M) Genotipo 463– 42 ddi.

K



L

M



Figura 11 (Continuación). Fotografías del progreso de la enfermedad “podredumbre gris”. A) Genotipo 414 – 4 días después de la infección (ddi), B) Genotipo 361– 4 ddi, C) Genotipo 222– 9 ddi, D) Genotipo 361– 9 ddi, E) Genotipo 369– 9 ddi, F) Genotipo 414– 9 ddi, G) Genotipo 370– 23 ddi, H) Genotipo 482– 23 ddi, I) Genotipo 222– 39 ddi, J) Plantas susceptibles muertas - 39 ddi, K) Genotipos resistentes 222 y 463– 42 ddi, L) Genotipo 222– 42 ddi, M) Genotipo 463– 42 ddi.

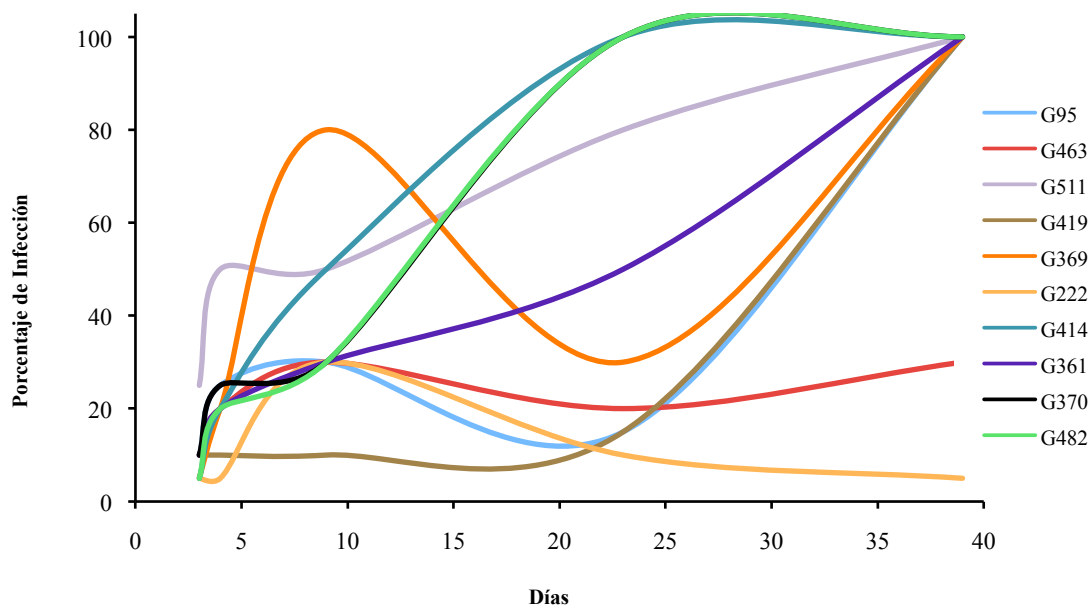


Figura 12. Curvas de progreso de la enfermedad de diez genotipos de *Rosa* spp. Los valores de porcentaje de infección corresponden al daño en los tejidos de las plantas.

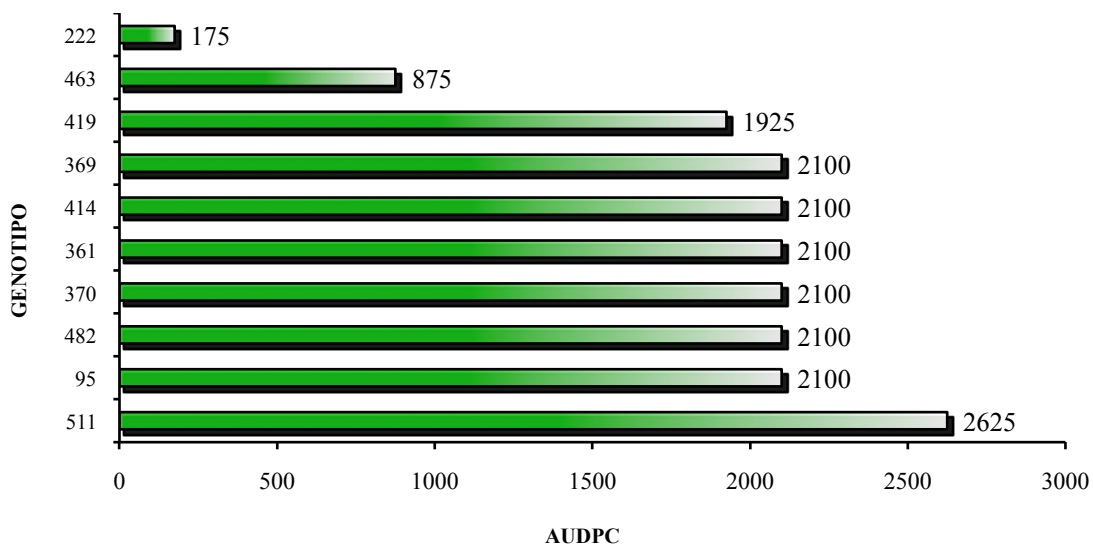


Figura 13. Área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) para los diez genotipos de *Rosa* spp. estudiados.

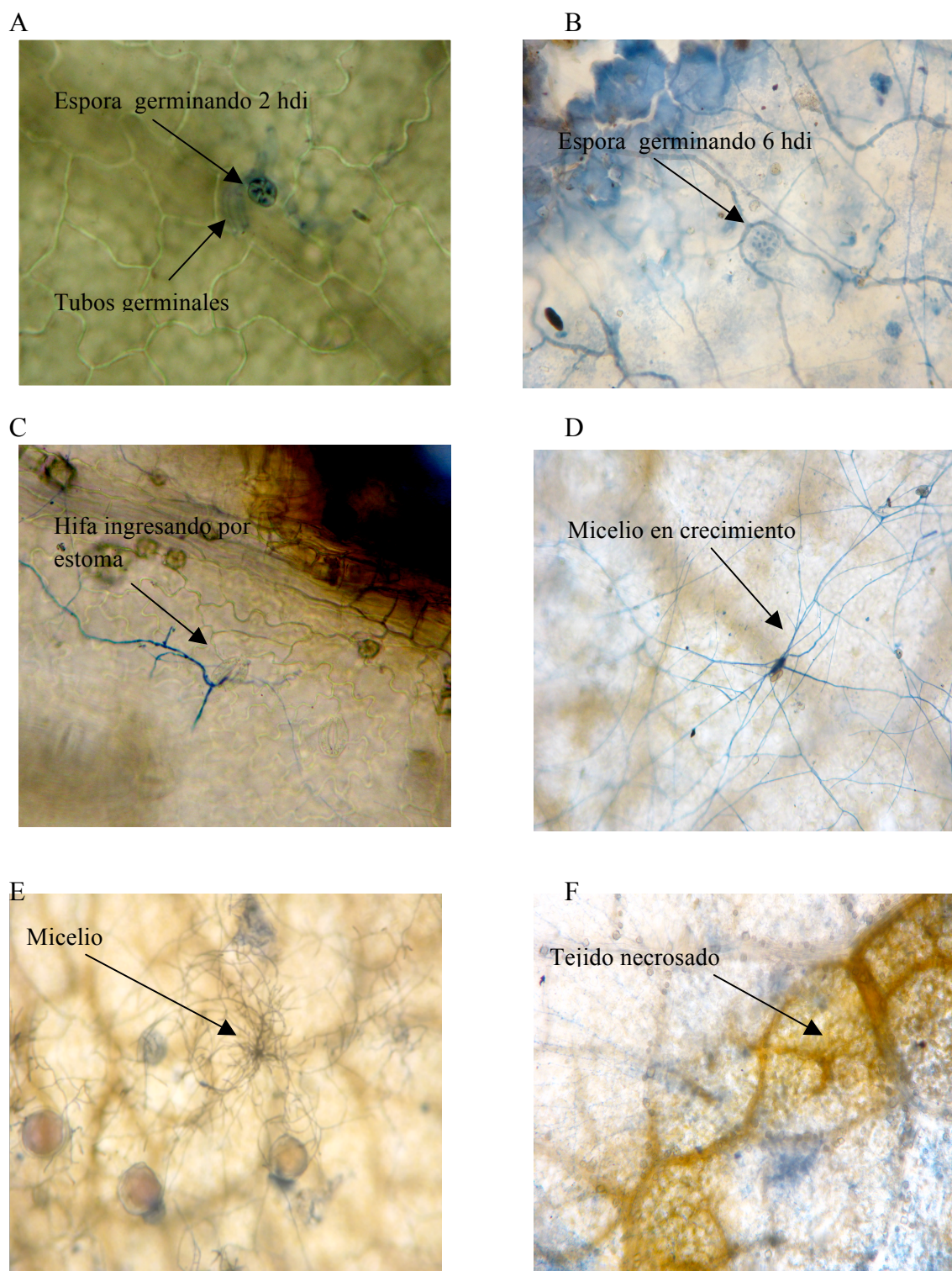
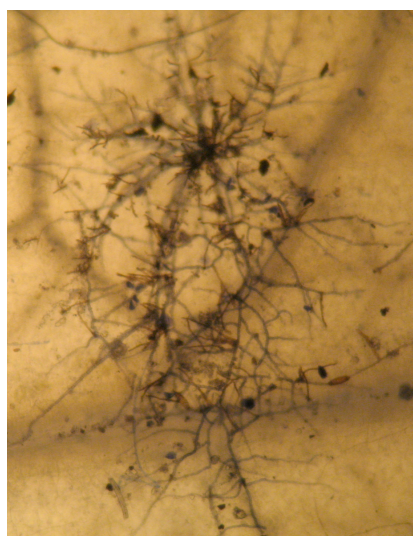
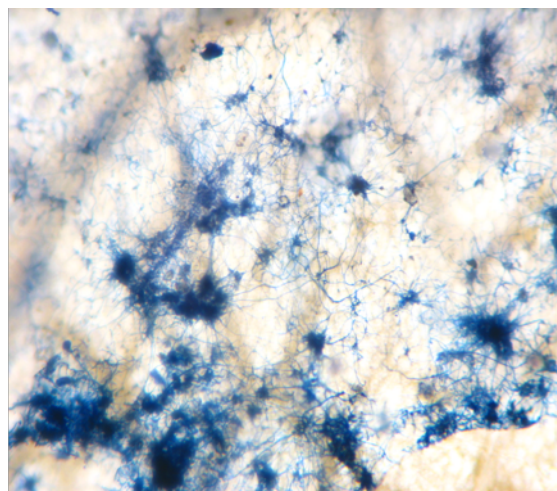


Figura 14. Comprobación de la infección de *Botrytis cinerea* en tejidos de *Rosa* spp. (genotipo 222) mediante tinción con tripan azul. El método destiñe el tejido vegetal y tiñe con azul los tejidos del hongo. A) Espora de *B. cinerea* germinando en tejidos de *Rosa* dos horas después de la infección (hdi) 20 X, B) Espora de *B. cinerea* germinada 6 hdi 20 X, C) Hifa del hongo ingresando al tejido por un estoma 6 hdi 10 X, D) Infección del hongo 12 hdi micelio en crecimiento 10 X, E) Infección 24 hdi 10 X, F) Necrosis del tejido circundante al hongo 24 hdi 10 X, G) Infección 48 hdi 20 X, H) Infección 72 hdi 10 X, I) Infección 96 hdi 10 X, J) Necrosis 96 hdi 2.5 X, K) Ejemplo de tejido sano de una planta testigo 24 hdi 10 X, L) Ejemplo de tejido necrosado 24 hdi 10 X.

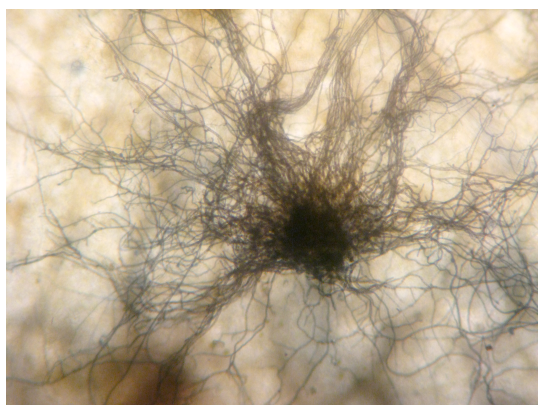
G



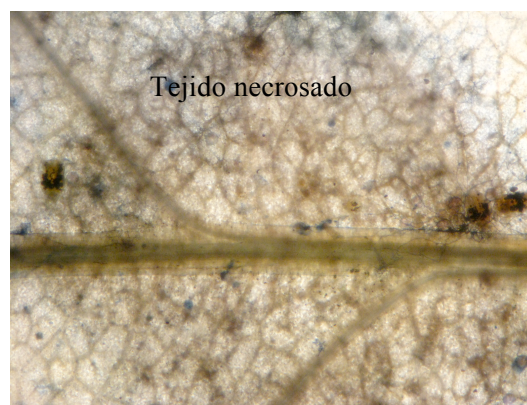
H



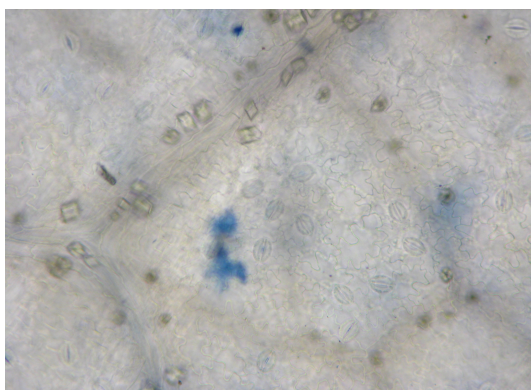
I



J



K



L

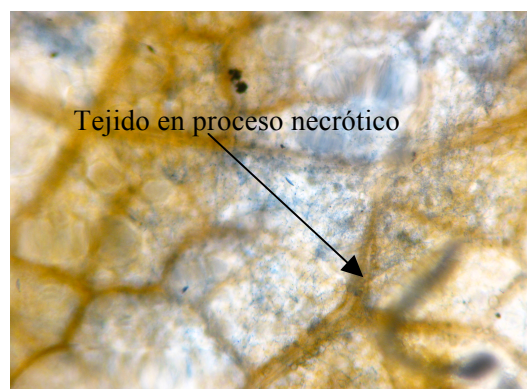


Figura 14 (Continuación). Comprobación de la infección de *Botrytis cinerea* en tejidos de *Rosa* spp. (genotipo 222) mediante tinción con tripan azul. El método destiñe el tejido vegetal y tiñe con azul los tejidos del hongo. A) Espora de *B. cinerea* germinando en tejidos de *Rosa* dos horas después de la infección (hdi) 20 X, B) Espora de *B. cinerea* germinada 6 hdi 20 X, C) Hifa del hongo ingresando al tejido por un estoma 6 hdi 10 X, D) Infección del hongo 12 hdi micelio en crecimiento 10 X, E) Infección 24 hdi 10 X, F) Necrosis del tejido circundante al hongo 24 hdi 10 X, G) Infección 48 hdi, micelio 20 X, H) Infección 72 hdi, micelio 10 X, I) Infección 96 hdi, micelio 10 X, J) Necrosis 96 hdi 2.5 X, K) Ejemplo de tejido sano de una planta testigo 24 hdi 10 X, L) Ejemplo de tejido necrosado 24 hdi 10 X.

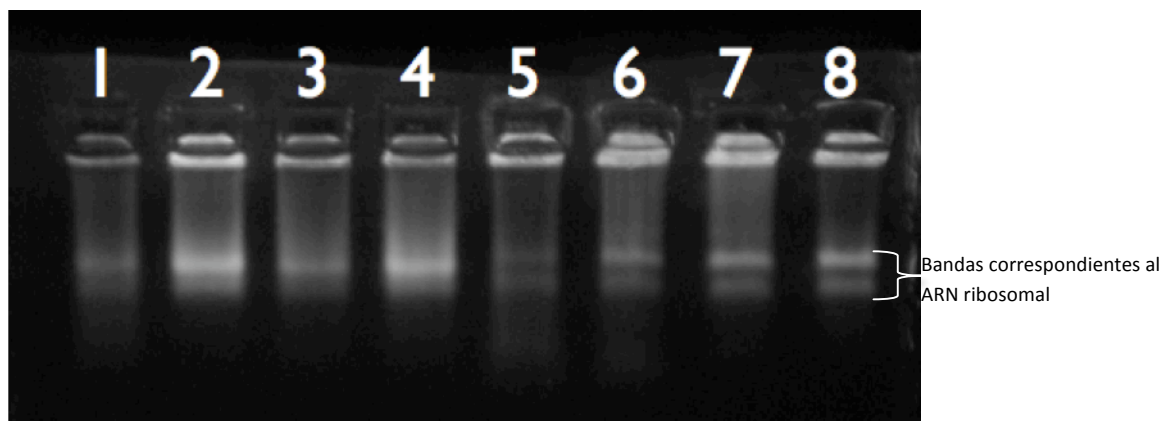


Figura 15. Verificación de ARN en gel de agarosa nativo al 1,2 %. Ocho muestras de ARN de rosa en buen estado y diferentes concentraciones, se observa contaminación de ADN visible como un barrido sobre las bandas de ARN ribosomal (~ 1,9 kb).

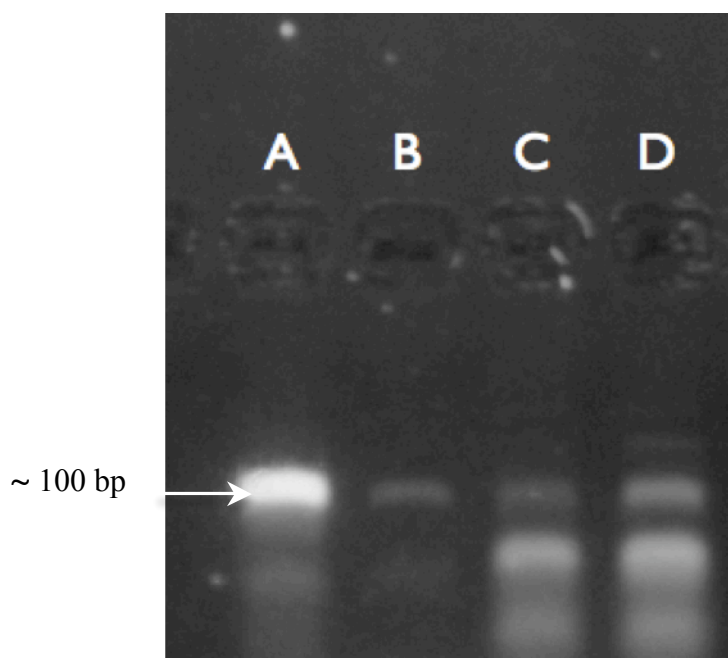


Figura 16. Determinación de la temperatura de anillamiento óptima para EF1 α con los iniciadores preliminares. A) temperatura de anillamiento 62 °C ,B) temperatura de anillamiento 56 °C, C) temperatura de anillamiento 53 °C , D) temperatura de anillamiento 50 °C.

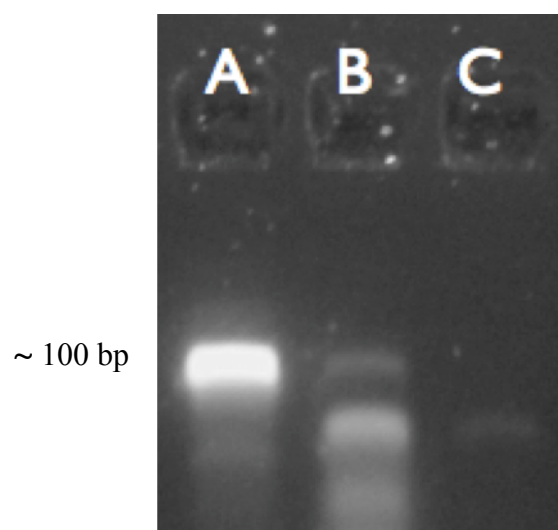


Figura 17. Determinación de la concentración de magnesio óptima y potenciadores de PCR para EF1 α (~ 100 bp) con los iniciadores preliminares. A) magnesio 3 mM - DMSO 5%, B) magnesio 1,5 mM, C) magnesio 3 mM.

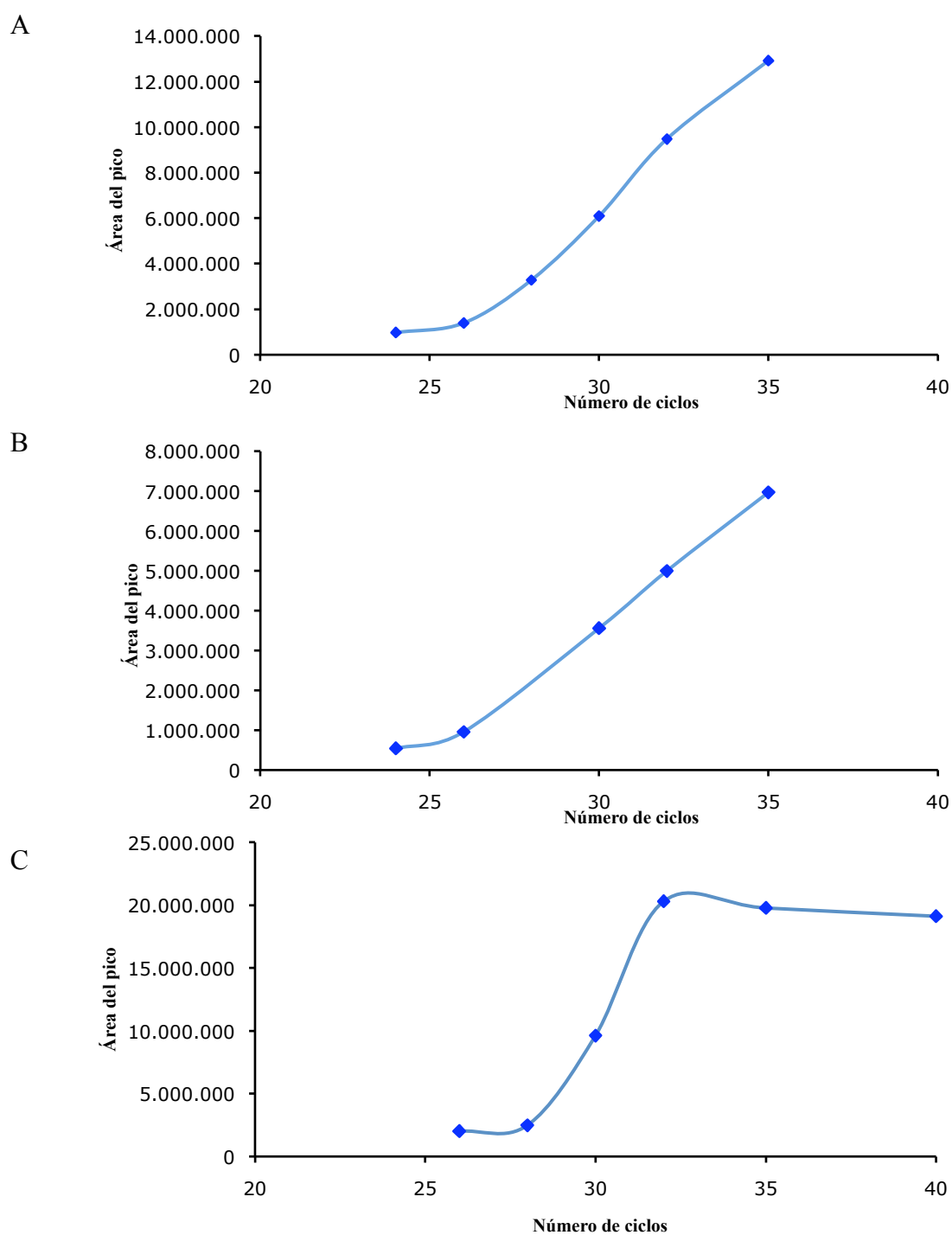


Figura 18. Curvas de amplificación A) Curva de amplificación del gen PR2 (glucanasa) con los iniciadores preliminares B) Curva de amplificación del gen Efl α con los iniciadores definitivos C) Curva de amplificación del gen PR3 (quitinasa) con los iniciadores definitivos. Se distingue el comportamiento típico de una reacción de PCR con una tendencia sigmoide. El inicio de la amplificación es claramente exponencial, la segunda fase es lineal hasta llegar a la fase de meseta por disminución del rendimiento de la reacción.

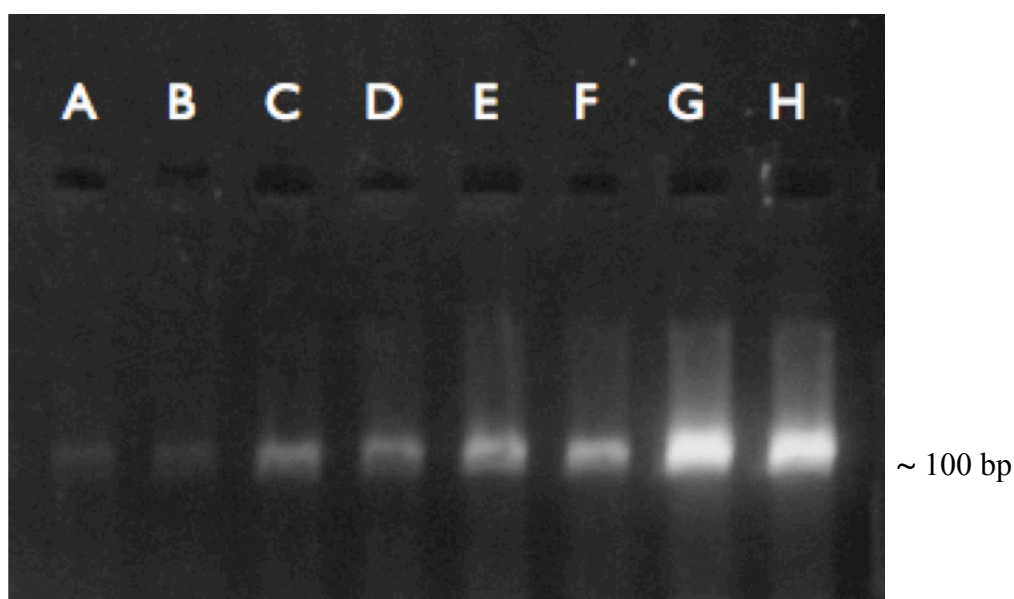


Figura 19. Determinación del número de ciclos óptimo de PCR para EF1α con los iniciadores preliminares. A) 22 ciclos, B) 24 ciclos, C) 26 ciclos, D) 28 ciclos, E) 30 ciclos, F) 32 ciclos, G) 35 ciclos, H) 40 ciclos.

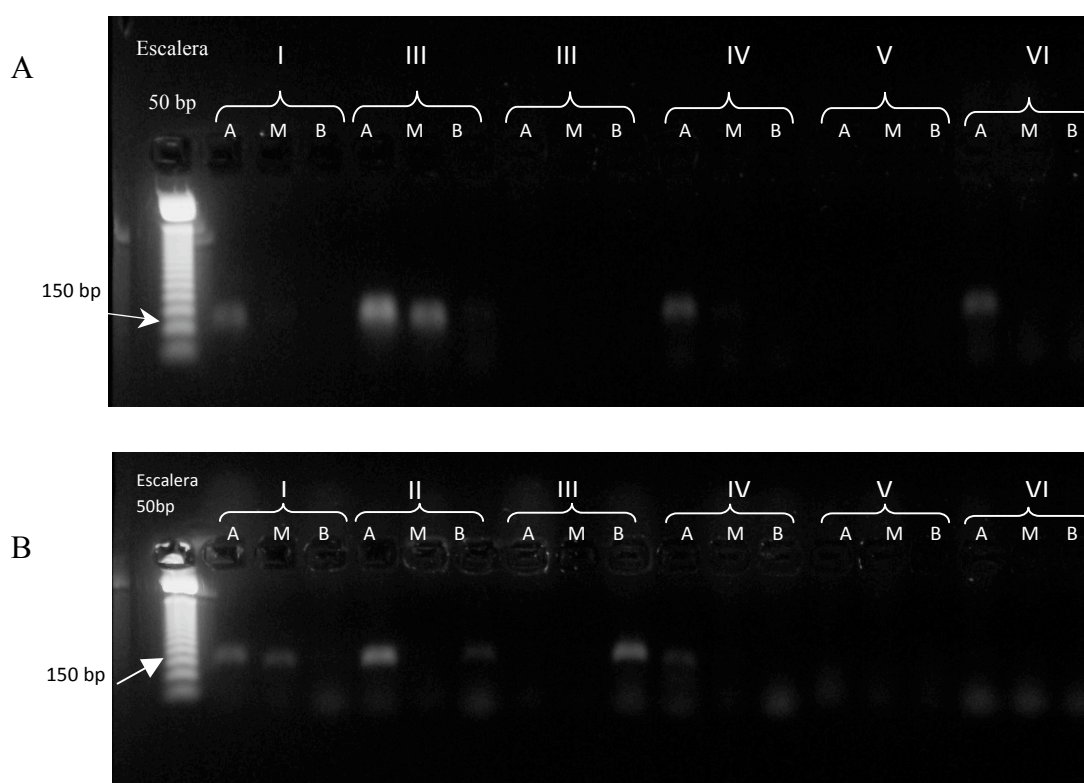


Figura 20. Optimización de los iniciadores definitivos. Los números romanos corresponden a las diferentes mezclas de reacción empleadas. “A” corresponde a una concentración de magnesio alta de 4mM, “M” a una concentración media de 3mM y “B” a una concentración baja de 2mM. A) Iniciadores del factor de elongación 1 alfa B) Iniciadores del gen de la Quitinasa.

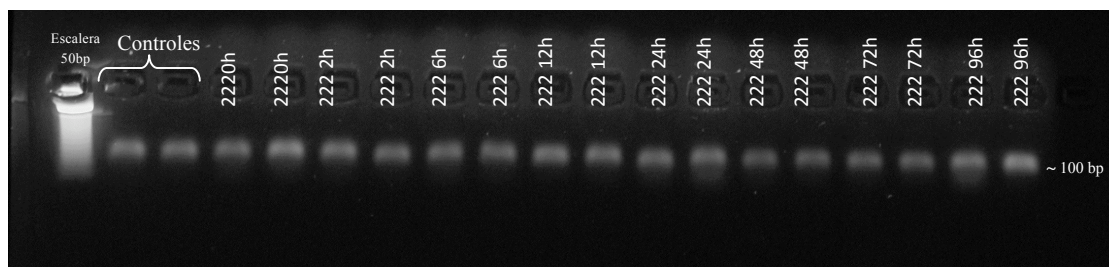


Figura 21. Validación del gen EF1 α como gen constitutivo. Se utilizó como templado para las reacciones de PCR 5 μ L de ADNc (sintetizado a partir de 1 μ g de ARN total) de cada uno de los intervalos de tiempo (0,2,6,12,24,48,72 y 96 horas después de la infección) del genotipo 222. Las reacciones se realizaron por duplicado y se separaron en un gel de agarosa al 2%.

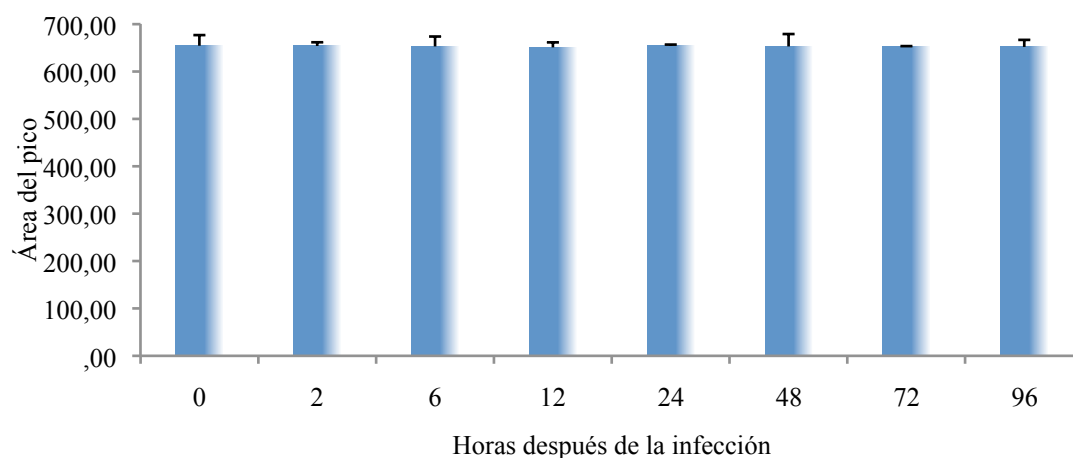


Figura 22. Medias calculadas a partir de las áreas de los picos de intensidad para las amplificaciones del gen EF1 α . Las áreas de las bandas resultantes de la electroforesis de los productos de PCR para todos los intervalos de tiempo se determinaron mediante el programa ImageJ v. 1.42q. Las barras de error representan la desviación estándar.

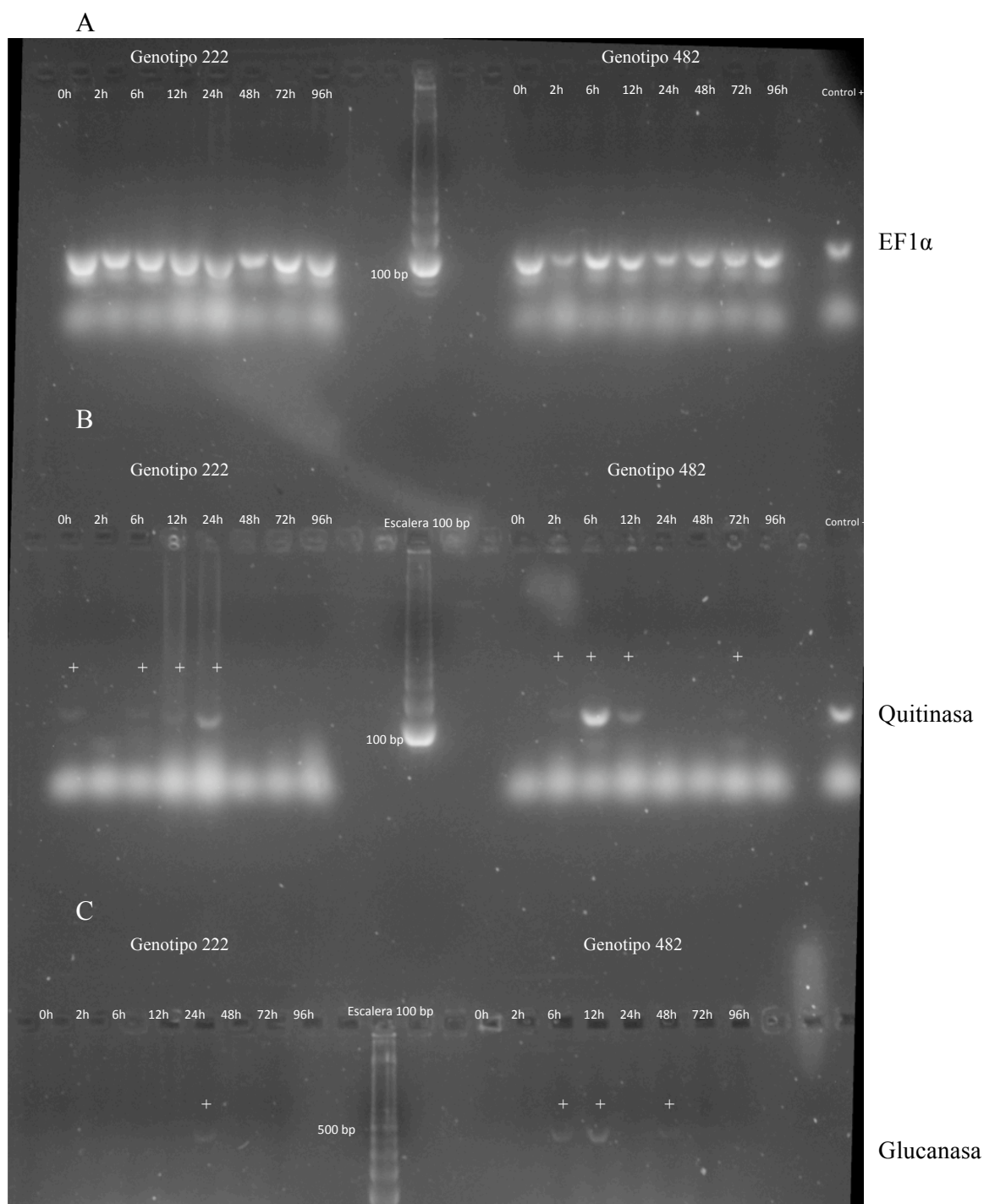
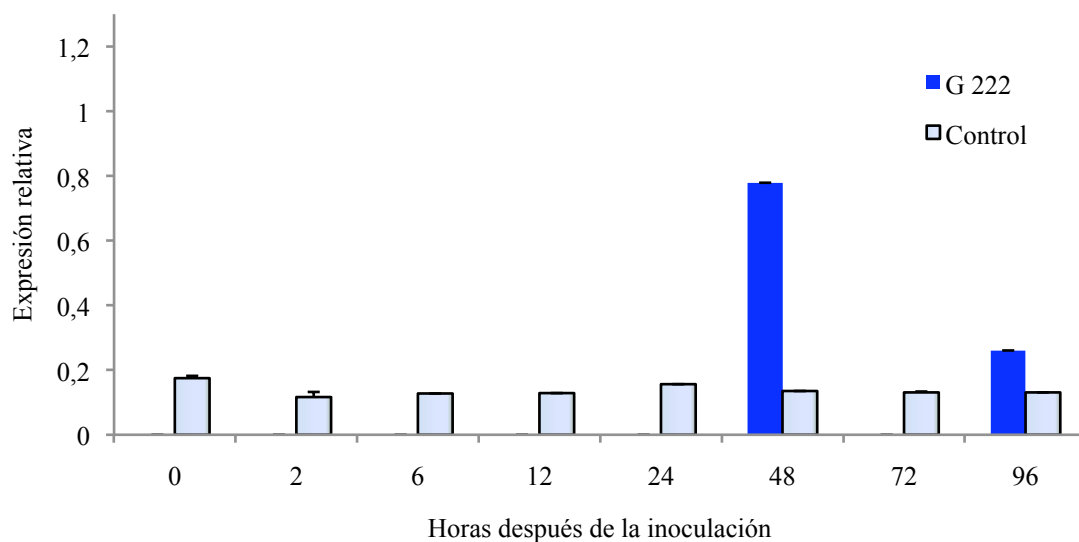


Figura 23. Productos de PCR de los genes marcadores de respuesta a patógenos de las plantas que fueron inoculadas con *Botrytis cinerea*. Se muestran las amplificaciones en ocho intervalos de tiempo para los genotipos 222 (resistente) y 482 (susceptible). A) EF1 α B) Quitinasa C) Glucanasa.

A



B

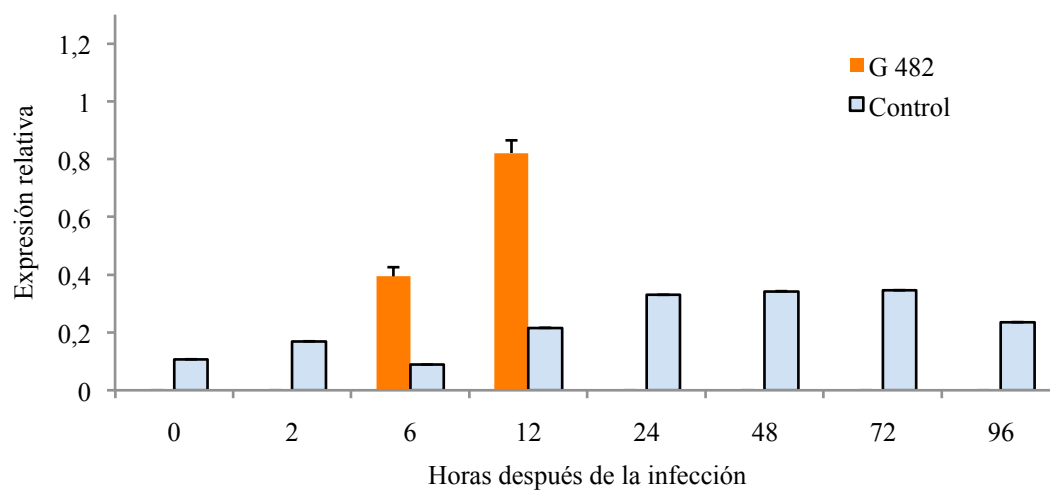
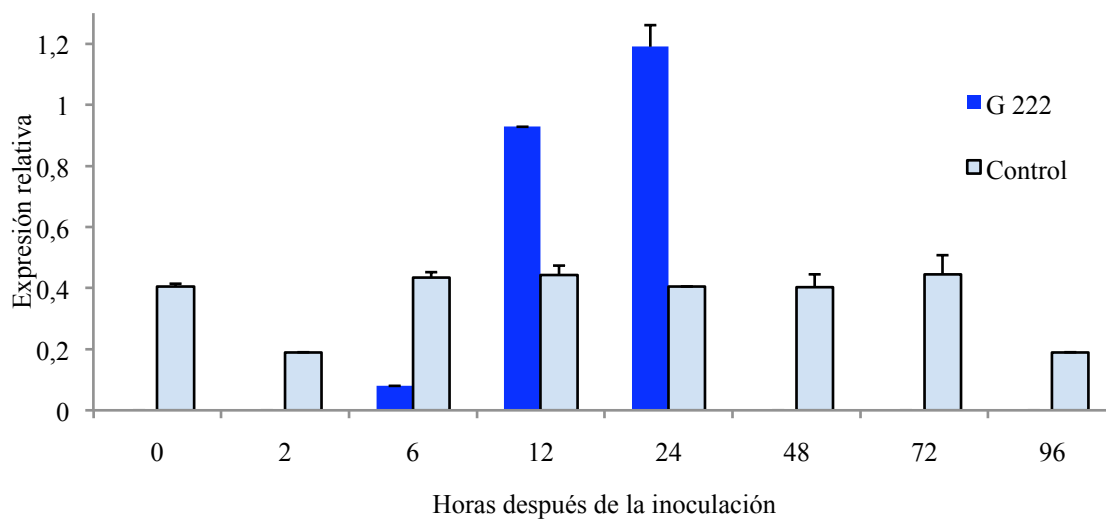


Figura 24. Expresión relativa temporal del gen de la glucanasa en el genotipo resistente y en el susceptible. A) Genotipo resistente 222 (azul) B) Genotipo susceptible 463 (tomate). Los valores de expresión relativa corresponden a las medias calculadas a partir de los valores de las áreas de los picos obtenidas a partir de la intensidad de las bandas del gen de la glucanasa normalizada con el área de la banda del gen constitutivo (EF1 α) y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

A



B

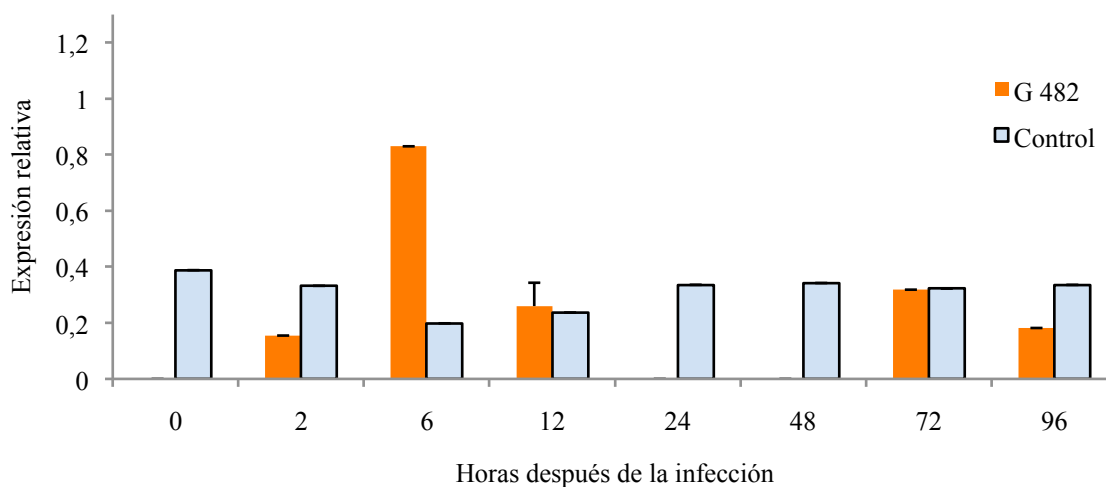


Figura 25. Expresión relativa temporal del gen de la quitinasa en el genotipo resistente y en el susceptible. Los valores de expresión relativa corresponden a las medias calculadas a partir de los valores de las áreas de los picos obtenidas a partir de la intensidad de la bandas del gen de la glucanasa normalizada con la el área de la banda del gen constitutivo (EF1 α) y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

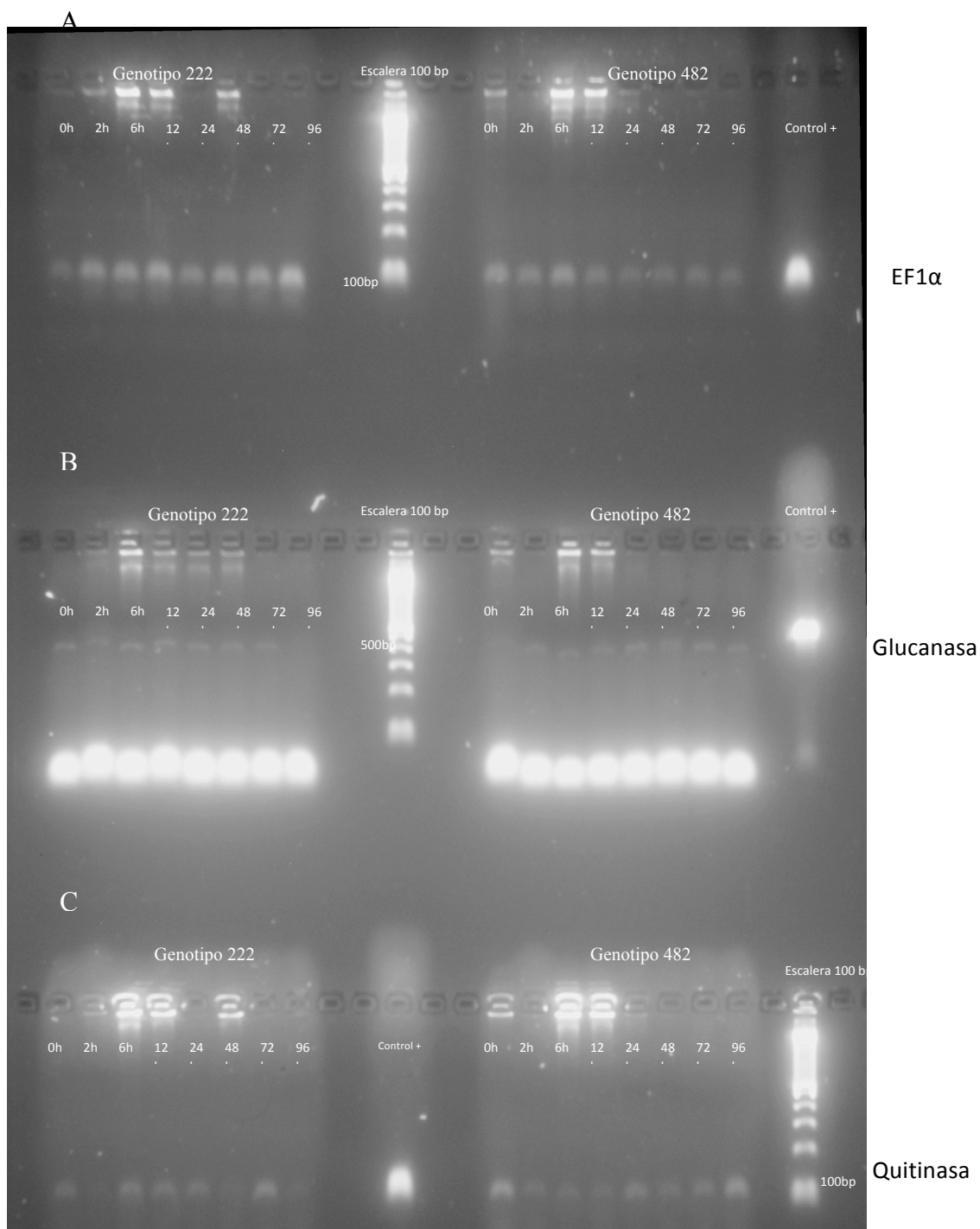


Figura 26. Productos de PCR de los genes marcadores de respuesta a patógenos de las plantas que no fueron inoculadas con *Botrytis cinerea*. Se muestran las amplificaciones en ocho intervalos de tiempo para los genotipos 222 (resistente) y 482 (susceptible). A) EF1 α B) Glucanasa C) Quitinasa.

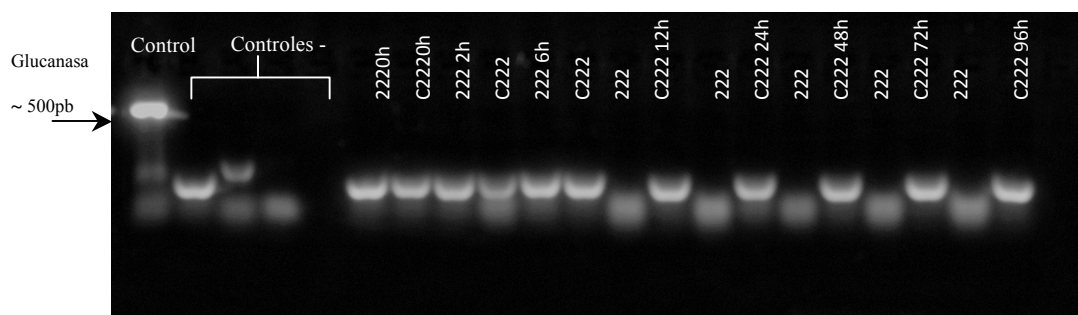


Figura 27. Prueba de contaminación del ADNc de *Rosa* con ADN genómico mediante PCR. Se presentan las amplificaciones con todas las muestras del genotipo 222 (prueba y control, a los siguientes intervalos de tiempo 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas post inoculación - hpi) utilizando los iniciadores para el gen de la glucanasa (~ 500 bp). Se empleó como templado las reacciones de retrotranscripción negativa (RT-).

10. TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores empleados para detectar la presencia de los retrotransposones “Boty” y “Flipper”. Para el retrotransposón *Boty* se emplearon dos sets de iniciadores diferentes.

Retrotransposón	Iniciador	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño amplificado
“Boty”	LTR98	5'-AGC CTG TAG AAT CAC CAA CG -3'	51,78	648 bp
	LTR728	5' -CGG TAT TTC TGG TTG GCA - 3'	48,04	
“Boty”	BotyF4	5'-CAG CTG CAG TAT ACT GGG GGA-3'	56,31	560 pb
	BotyR4	5'-GGT GCT CAA AGT GTT ACG GGA G-3'	56,7	
	F300	5'-GCA CAA AAC CTA CAG AAG A-3	49,9	
“Flipper”	F1550	5'-ATT CGT TTC TTG GAC TGT A-3'	48,5	1150 pb

A, Adenina, C; Citosina, C; Guanina, G; Timina, T; bp, pares de bases

Tabla 2. Códigos de los diez genotipos de *Rosa* spp. empleados para el estudio. Los códigos fueron establecidos por la empresa Esmeralda Breeding S.A. La clasificación de resistencia fue determinada mediante observaciones del personal de la empresa.

Genotipo	Clasificación Previa
414	Resistente
511	Resistente
370	Resistente
369	Resistente
361	Resistente
95	Resistente
463	Resistente
222	Resistente
482	Susceptible
419	Susceptible

Tabla 3. Información sobre los iniciadores preliminares. Los iniciadores se diseñaron para los genes candidatos como marcadores de defensa en contra de *Botrytis cinerea* sobre las regiones conservadas de las secuencias abajo reportadas, se incluyen sus números de accesoión y organismo al que corresponden. El factor de elongación 1 alfa fue empleado como gen constitutivo.

Nombre	Secuencia	Número de accesoión	Organismo	Iniciador	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño amplificado
PR 3	Quitinasa	EF576873.1	<i>Fragaria x</i>	PR3-F	5'-TACTCTCGCTGCCATCTTC-3'	51,09	446 bp
			<i>ananassa</i>	PR3-R	5'-AATCGGTCCTCTTCTTTG-3'	48,93	
			<i>Rosa</i>	PR2-F	5'- GGTAACCATTACTACCATCTTG -3'	51,11	
PR 2	Glucanasa	DQ285638.1	<i>roxburghii</i>	PR2-R	5'- CCATCCTCAACAACCACCTTC -3'	54,36	454 bp
			<i>Prunus</i>	DFN-F	5'-CGTGGCTTTTCGCCGCAGATG-3'	57,93	
DFN1	Defensina	AY078426.1	<i>persica</i>	DFN-R	5'-AGGCAAGGCAACTCACGAGGG-3'	58,26	257 bp
			<i>Rosa</i>	EF1-F	5'-AAGGCTGAGCGTGAGCGTGG-3'	57,93	
EF1a	EF1 α	AB370119.1	<i>hybrida</i>	EF1-R	5'-TGGCAGTCGAGCACTGGAGC-3'	57,93	866 bp

PR, "Pathogenesis Related"; DFN, Defensina; EF, Eflongation Factor; A, Adenina, C; Citosina, C; Guanina, G; Timina, T; bp, pares de bases

Tabla 4. Cocteles de reacción utilizados para optimizar los componentes de la PCR para los iniciadores definitivos. En donde ^avolumen preliminar de la reacción es 30 µL (el volumen final será 40 µL), ^b volumen total = 105 µL suficiente para 3 + 0,5 reacciones, ^c coctel de reacción utilizado como control de contaminación de los componentes de la reacción al cual se agregó 35 µL de MgCl₂ 8 mM. ^dReactivo Q de la casa Qiagen[®]

Componentes	[Inicial]	[Final]	Volumen por Reacción ^a	Coctel de Reacción ^b (µL)						Control Componentes ^c
				I	II	III	IV	V	VI	
Buffer de reacción	10X	1X	4 µL	14	14	14	14	14	14	14
Iniciador 1	2,5 µM	0,25 µM ó 0,1 µM	4 µL ó 1,6 µL	5,6	14	5,6	14	5,6	14	14
Iniciador 2	2,5 µM	0,25 µM ó 0,1 µM	4 µL ó 1,6 µL	5,6	14	5,6	14	5,6	14	14
cDNA	Sin Diluir	Sin Diluir	2 µL	7	7	7	7	7	7	-
4dNTPs	10 µM	0,2 mM	0,8 µL	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8
Taq Polimerasa	5U/ml	1 U	0,2 µL	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
DMSO	100%	5%	2 µL	-	-	9	9	-	-	-
Reactivo Q ^d	5X	1X	8 µL	-	-	-	-	36	36	-
H₂O	-	-	hasta 30 µL	hasta 105	hasta 105	hasta 105	hasta 105	hasta 105	hasta 105	hasta 105

Tabla 5. Resultados del mejor alineamiento de las secuencias obtenidas para los retrotransposones de *Botrytis. cinerea* y los genes de defensa en *Rosa* spp. Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GenBank del NCBI empleando Blastn y secuencias no redundantes.

Secuencia	Descripción del resultado	Porcentaje de cobertura	Valor E	Identidad Máxima	Accesión
“Boty”	<i>B.cinerea</i> long terminal repeat DNA of retrotransposon Boty	63	0	94	X81790.1
“Flipper”	<i>Botryotinia fuckeliana</i> Flipper transposable element transposase	98	0	98	U74294.1
EF1-a	<i>Rosa hybrid</i> cultivar RhEF1A mRNA for elongation factor1-alpha	100	0	99	AB370119.1
PR2	<i>Rosa roxburghii</i> isolate S1A17 glucanase (PR2) gene	48	0	94	DQ285646.1
PR3	<i>Fragaria x ananassa</i> chitinase (CHI2) mRNA	69	2,00E-161	89	FJ424410.1
DFN	<i>Fragaria x ananassa</i> beta-1,3-glucanase (BG2-3) mRNA	34	1,00E-46	91	AY989819.1

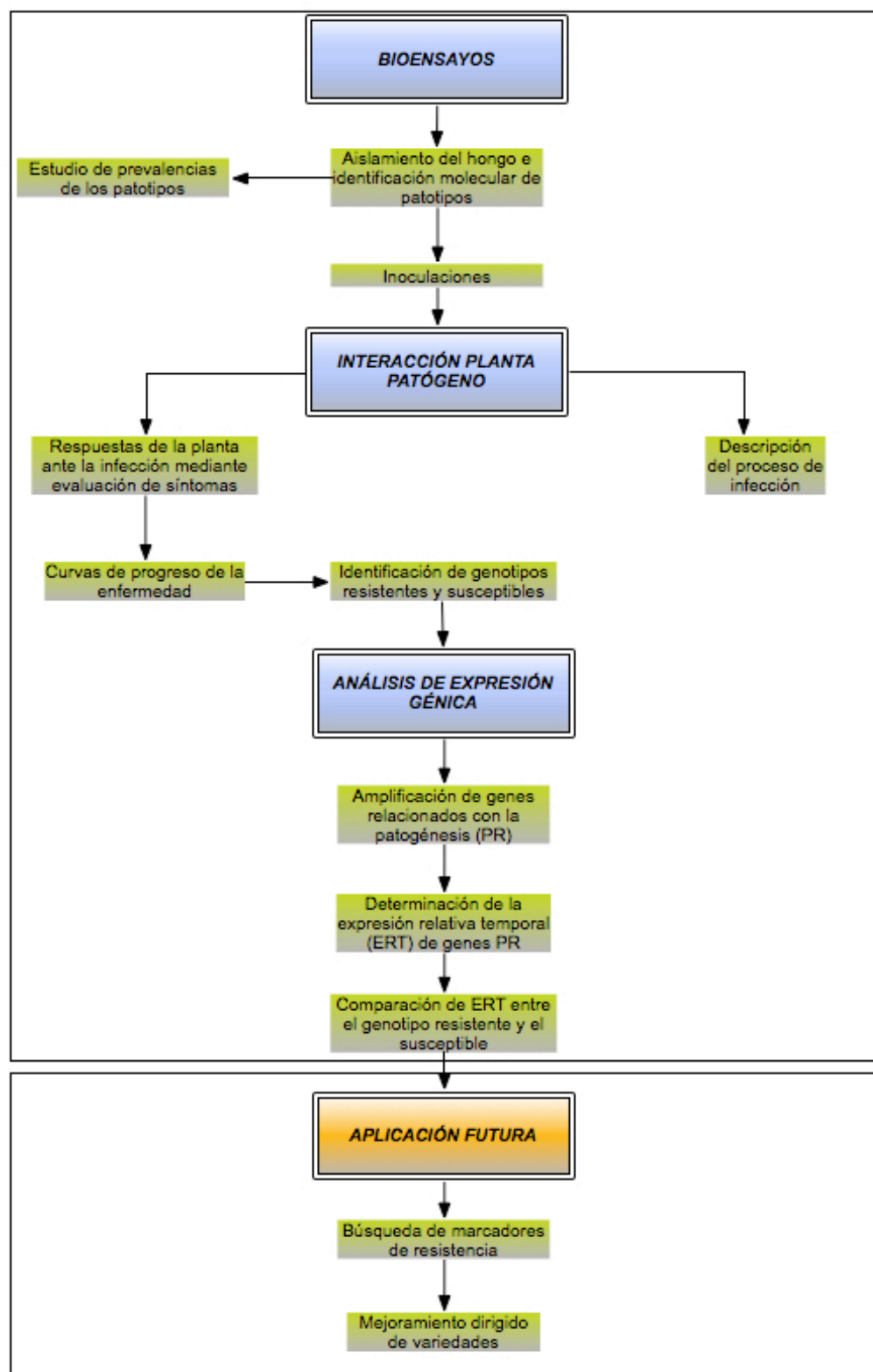
PR, “Pathogenesis Related”; DFN, Defensina; EF, Eflongation Factor; A, Adenina, C; Citosina, C; Guanina, G; Timina, T; bp, pares de bases

Tabla 6. Información sobre los iniciadores definitivos. Se los diseñó a partir de las secuencias obtenidas con los iniciadores preliminares de los genes candidatos como marcadores de defensa en contra de *Botrytis. cinerea* y el gen constitutivo.

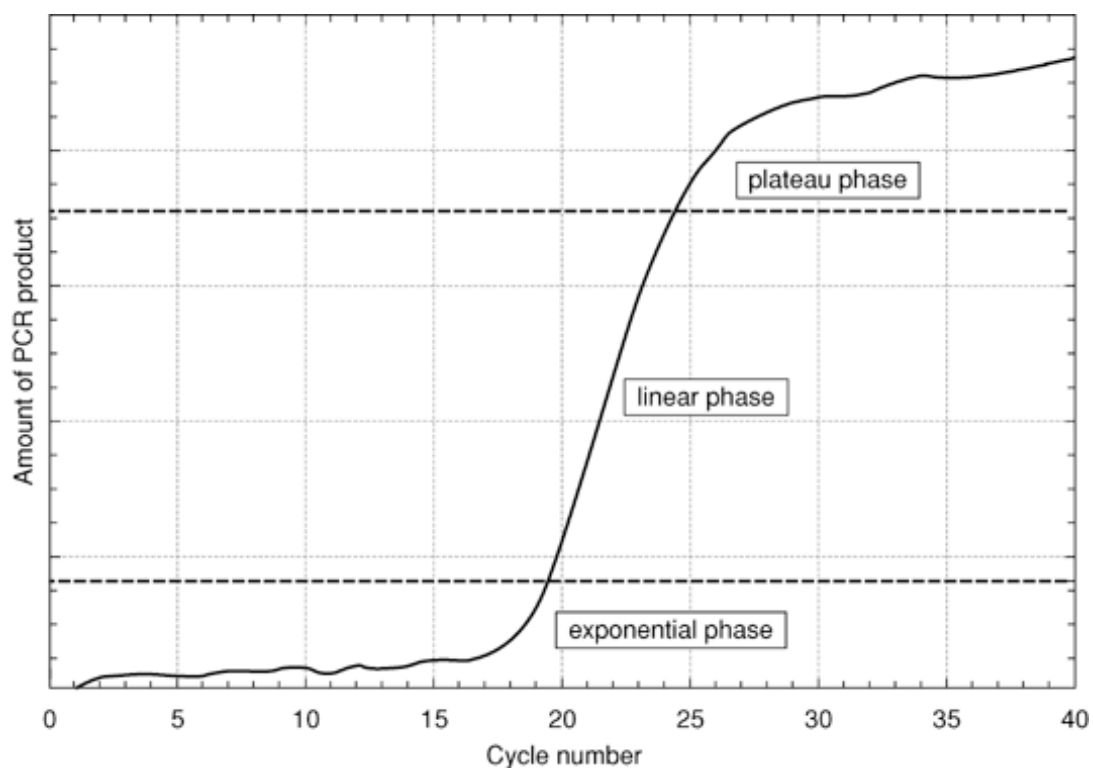
Secuencia	Nombre Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Tm °C	Tamaño bp	Tamaño producto
Quitinasa	CHI-F	CCC TGC AAA TGA TTT CTA CAC C	61,5	22	108 bp
	CHI-R	GCT GCA ATT TCA CGC CTT C	62,1	19	
	GLU-F	GCA TAT GCG TTT TCA CTT TAC C	60,5	22	
Glucanasa	GLU-R	AAT ATG CGT TGT TCA CTT CAC C	61,6	21	100 bp
	DFN2-F	GGAACAAGCTCATCCAAATCC	61,2	21	
DFN1	DFN2-R	TTCTTAGCCAAGGCAACTCAC	62,6	21	180 bp
EF1 α	EF-F	CTG CTT GCT TTC ACT CTT GG	61,3	20	96 bp
	EF-R	TTC ATC GTA CCT TGC CTT TG	60,4	20	

DFN, Defensina; EF, Eflongation Factor; A, Adenina, C; Citosina, C; Guanina, G; Timina, T; bp, pares de bases

11. ANEXOS



Anexo 1. Diagrama del flujo de trabajo de la investigación. El color azul representa las etapas realizadas en este trabajo. El color naranja una de las posibles aplicaciones a futuro de los resultados de esta investigación.



Anexo 2. Fases de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Tomado de: Padilla y colaboradores (2009).

Anexo 3. Secuencias consenso. A) Transposón “Boty”, B) Transposón “Flipper”, C) Factor de elongación 1- alfa, D) Gen de la proteína relacionada con la patogénesis 2, E) Gen de la proteína relacionada con la patogénesis 3, F) Defensina.

A

gtggctgttggccctgaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaggaaattaagcatgctgtatttactgggggacactaggcaccgaagg
aaagcctcaggcatgtatatagtattagtcataagatatcctagaacgtaggatacagttcctaggacaatagggtcctaggaaacaccgaacat
aactttgcaaaccttttcggaagtattatagtaataatccaggggattagccccaggataaaagataagctaggatacgggaagacacgggaa
ccggtatcacgtgatggccgctcccatcaatcccaccgattattatcaatgggatcagtgggatcccatcactcccaccactcccggtgagtgg
gatcgtagggacaacagagtacgaggggtctatataagagaatgggttcttatatgtagagcttcgtgctcaagagaacaatcattgttcatt
actatagttacgagaattgcaaccagttacaaccttattgaattcctacttgaagtctagtctaaaccactcgagagatctctagacacttccacgt
gacctagaggcagctcccgaacattttgagagcacctgcggttccggcgcccatccgagatggcgaccgcgagggtactggggag
gtaccaagggttgcggcctggaggctgccccgggggtctcctgggctacccggtgcttagatgaagaaatggcggggtgctccctt
acgcaatagtgaagcgggttctccttggctcctcttgcgtgcacttttggcgtatgtattgcggtgaaggtgggggtgctgtacgtgatct

B

cggggtaggagagctctagcaattggatttttagtacaggaagccctagggaactagccctacccatcgtcaaatacgagaattaggagagtc
attctcaacctcgaaggaggtgatttctctgggcaagcgtatgatacatagtttttggaaagaaaccagagattaagactaaaaggcaat
taaaacagataatgccgtatcaatgggtgcaactaccgaaattataagcaagttctttgaaaagtggattaccagcaattaaagcatatcaagccc
gaaaacagatggaatatggatgaagctgggtataatggaagccagggtctcaatggatgggtacttgggagttcaaacgcagctttttattcaga
aaaagcaaccgggttaagaacgtggacctcttttattgagtgatctcagctacgggaagagcacttttaccttgggtatattcaaaagtaaac
acttcaacaacaatggtttccattaaacttgataactatgaagggtgggagttcactgctacagataatgggtggactacggattctacaggtt
ggaatggctaaaagaggtgttttaaacccacaatcagcaccaactaccgaaagaagccaagactcctgtttggatgggcatgggagccaat
gaaaccactcaatttatgcttgaatgctcaagaataatatacacctcttatttttaaccacccatacatcgatgtactacaacctcttgattatcaat
attttcacctctgaaaaaagaatcagataccactcaatactctcgattcattgacggattctactccattggcaaaagaaactttctgctgcta
tcagaaagctagattaaaagcttcaacttcgaaatatcacttctgggtggaaggtcaggtttatggcctcaaaaccgcgctaaacctctttg
tccagattattgctcgaagacagtaatacaagaggtgtatatcaaaatcctgttcagatgatgatccgagcttcaatggaatatacattcatcttt
attgcatggaagccctcaaaaaggagtgatattcgaataatgctgatataatggagaaagtgtatgagaccgatattccaactcggcggc
tgcttttcgaaagatcaaaaaggattgagctag

C

cgtgagcgtggtatcaccattgatattgccttgggaagttgagaccaccaagtactactgcactgtcatcgatgctccggacatcgtgatttc
atcaagaacatgattactggtacctccaggctgattgtgccgtcctcatcatcgactccaccactggtggtttgaaagctggtatctccaaggat
ggtcagaccggtgagcacgctctgcttgccttctactcttgggtcgaagcagatgatttgcgtgtaacaagatggatgccaccactcccaagta
ctcaaggcaagggtacgatgaaattgtgaaggaggtcttctacctgaagaaggtgggtacaaccagacaaaattgccttgggtcccatct
ctggattcgagggtgacaacatgattgagaggtccaccaacctcgactggtacaaggccctaccctccttgaggcacttgaccaaatcaatg
agcccaagaggccctcagacaagccctccgctcctccacttcaggatgtgtacaagattggtggcattggaactgtgctgtgggctgtgtg
agactggtgtcatcaagcctggtatggtgtgacttttggccccactggactgactactgaagtttaagctgtggagatgaccacgaagctctc
caggaggtcttctggtgacaatgttgggttcaatgtgaagaatgtgtgctgaaggatcgaagcgtggtttgttgcacaaactccaaggat
gacctgccaaggaagctgtaacttcacctcacagggtcatcatgaaccatcctggccagattggaatggatatgctccagtgtc

A, Adenina, C; Citosina, C; Guanina, G; Timina, T

Anexo 3 (Continuación). Secuencias consenso. A) Transposón “Boty”, B) Transposón “Flipper”, C) Factor de elongación 1- alfa, D) Gen de la proteína relacionada con la patogénesis 2, E) Gen de la proteína relacionada con la patogénesis 3, F) Defensina.

D

atttcttttctttttctaccaacaaaaccaaagccacggcgtgggaggggaagtaaaattgtgtccagccaattttgcaaccttgggcgcga
gtcaaagtgaattaacaatgagtggcatgaagtagaccgagatgcgcagagcataatattcataccgctatatagaactttagaacgcgta
cagcgcgcacatccacgtcacaggacacagcgatagatacacttgttaccataatttccatcattcactggcttaagcgggtgtgaattcatttatt
acccattatcacctttttgcaacaatgatccaccatttttagccatatataccctaattcgccctagtcggtaacctgctgacataaaaccgcata
gcgttttctattaccagggtcaccgctccccatcggttaaccccaatgtccatctgtaccactacccctggtaagtgaacaacgcataattct
agttttatgtcagcaggggtaccgacataggcgaagtaggggtatatattggcaagaagtggatccattgttgcctaagaaggtgataattgg
ggtaataaatgaattgcagcatcgtgaatgcccatttgaaggaggggaagtttgggtaagagttgtatctattgctgtgacactttgacttga
gattggcggtgttaaccgcgttctgaatgttctgtatggcaggaagaagataatttgcctctgcagcatcagggtgtacttcattgccaacagcaa
tgtacttgaattgacatcagccgcgtaagggtgcacattttgtggaccgaattttagctgctgcagcatcagtgagctctgaagggtgtgtgg
gagggga

E

tcaccccgagctctagaccgtctcgcaaggccgcctcatcttccctctgtgaacctccccctcgcgggacgaagaacgctagcctattct
tactcttggcgccacttcagccttctttttcttctcactaccatgtttcttttccatctcatcatgggaagtgaggttcacagtagtatatttg
atcaacgaaaagctttacaacaaattgtttctacacaaggacgacacagcatgccctgcaaatgatttctacacctatcgtccttcatcgaggca
accaataactttccgagattcggcaccaccggaagtctagccactcgaaggcgtgaaattgcagcatttattgctcagatctctacaaaaccac
aggctgggtgggtacagcgcccgacggaccatactctgggggttgtgctttaaagaagaatcaatccgggaagcaactattcgacagcac
caacaaggagtgctcatctcctgaaaatcttacaaggaaaagaaccaattattgttctggtgatctggaagaaaaaggatgaattatc
gactatctcatggtctagactgatgcccgaaggataaggaccgattat

F

gaaatctcgtgagagcgtcgcgtttctatgacccctcctaaattcctaaccgccgaatccactcccttggctggatccatttccggaacaagct
catccaaatccccacccctttgaccgctccttgggggtccgttccgacccaatcctgcgtttcttctccagatttctatatccccaccactc
gcgtttgatcccgcgatctgtcacccttttctccccagtagcctcgtgagttgccttggctaagaattatcaccttcttaggcaacaatggat
caccacttcttccaatatataccctacttgcctatgtcggtaaccctgctgacataaaactagaatatgcgtttcacttcaccaggggtagt
ggtacaagatgga

A, Adenina, C; Citosina, C; Guanina, G; Timina, T

Anexo 4. ANOVA de los genotipos de Rosa por sus AUDPC (área debajo de la curva de progreso de la enfermedad)

ANOVA AUDPC					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,752E+06	9	861285,590	9,493	,001
Within Groups	907265,625	10	90726,563		
Total	8,659E+06	19			

Anexo 5. Subgrupos los genotipos de Rosa según sus AUDPC. Los subgrupos se determinaron con la prueba *a posteriori* de Tukey.

Genotipo	N	Subset para alfa = 0.05	
		1	2
222	2	175,000	
463	2		1.487,500
419	2		1.706,250
482	2		1.925,000
95	2		2.100,000
361	2		2.100,000
369	2		2.100,000
370	2		2.100,000
414	2		2.100,000
511	2		2.625,000
Sig.		1,000	,065

Anexo 6. Prueba de homogeneidad de varianzas de los valores de las áreas de los picos de intensidad de EF1 α . Los valores se obtuvieron a partir del cálculo de la intensidad de las bandas con el programa ImageJ v. 1.42q.

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,081E+16	7	8	2,932E-63

Anexo 7. ANOVA de los valores de las áreas de los picos de intensidad de EF1 α . Los valores se obtuvieron a partir del cálculo de la intensidad de las bandas con el programa ImageJ v. 1.42q.

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5468,750	7	781,250	,914	,541
Within Groups	6841,000	8	855,125		
Total	12309,750	15			
