



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de aislamientos de *Botrytis cinerea* de rosa en la Sabana de Bogotá

Tatiana Gómez Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2013

Caracterización de aislamientos de *Botrytis cinerea* de rosa en la Sabana de Bogotá

Tatiana Gómez Rodríguez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitopatología

Directora: Ph.D Celsa García Domínguez

Codirectora: MSc. Marcela Esterio Grez

Línea de Investigación: Fitopatología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2013

Dedicatoria

A mi esposo por su amor y apoyo

A mis padres y hermano por sus enseñanzas de vida

Agradecimientos

A Bayer Cropscience por la financiación económica de este proyecto gracias a la alianza corporativa con GR Chia SAS y a su programa Bayalianza.

A la Dra Marcela Esterio Grez y al Dr. Jaime Auger, profesores de la Universidad de Chile, por compartir sus experiencias y conocimiento para el desarrollo de este estudio. Al igual que a su equipo Evelyn Silva, Cecilia Ramos, Isabel Rodriguez y María José Araneda.

A GR Chia SAS en cabeza de su Vicepresidente técnico Juan Carlos Gonzalez y a Rodrigo Astaiza Director MIPE por su apoyo y visión en la importancia de este estudio en el desarrollo de la floricultura Colombiana.

A las empresas Flores de Bojacá y Flores La Mana por el patrocinio de las pasantías para el desarrollo operativo del proyecto.

A mi directora de tesis Celsa García por su dedicación, liderazgo científico, dirección y aportes.

Al Dr. Juan José Filgueira, Ximena Buitrago y Melissa Rincón del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Militar Nueva Granada por el apoyo científico prestado en el desarrollo de metodologías.

A la Universidad Nacional de Colombia por facilitarme el acceso y utilización de las instalaciones que necesité en el transcurso del desarrollo del proyecto y por su contribución a mi formación profesional y personal.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional por su apoyo.

A Edgar Benítez por su apoyo en el proceso estadístico.

A Rosa Lilia Ferrucho, Oscar Oliveros y Germán Arbelaez por su contribución en la mejora del trabajo.

RESUMEN

Gómez Rodríguez, T. 2013. Caracterización de aislamientos de *Botrytis cinerea* de rosa en la Sabana de Bogotá.

El Moho gris causado por *Botrytis cinerea* es una de las principales enfermedades que afectan al cultivo de rosa en Colombia. Este patógeno causa lesiones en diferentes tejidos de la planta, lo que reduce la producción y calidad de las rosas. El manejo de la enfermedad se realiza de manera integrada, considerando prácticas culturales, físicas y un intensivo programa de aplicaciones de fungicidas, no obstante esto no es suficiente para su control. Una de las posibles razones podría ser consecuencia de la diversidad presente en *B. cinerea* producto de eventos de anastomosis que pueden producirse entre las hifas del hongo y que dan lugar a células multinucleadas y generalmente heterocarióticas y/o a la presencia/ausencia de los elementos genéticos transponibles Boty y Flipper. Hasta el momento existen antecedentes de la caracterización de poblaciones de *B. cinerea* en diferentes cultivos en el mundo pero no en *Rosa* sp. en Colombia. Es por ello que el objetivo principal de estudio fue caracterizar fenotípica y genéticamente poblaciones del hongo recuperadas a partir de flores, tallos y hojarasca, procedentes de seis fincas de producción de rosa (cv. Tressor2000) localizadas en la Sabana de Bogotá. Los parámetros fenotípicos evaluados fueron: tipo de micelio, capacidad para formar esclerocios, nivel de esporulación en medio PDA y virulencia sobre pétalos de *Rosa* sp. La caracterización genética comprendió correspondencia genotípica mediante amplificaciones parciales de los transposones Boty y Flipper y pertenencia de los aislamientos al Grupo I (*Botrytis pseudocinerea*) y Grupo II (*Botrytis cinerea sensu stricto*) mediante PCR-RFLP y enzima HhaI. En total se analizaron 270 aislamientos monospóricos (45 por finca y 15 por tipo de tejido). Se encontró una alta variabilidad morfológica aunque esta no estuvo asociada al origen del aislamiento (flor, tallo y hojarasca) pero si con el factor finca. En cuanto a virulencia, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) por origen de la muestra y por finca, evidenciando que los aislamientos provenientes de tallo son más virulentos que los de flor y hojarasca, y que la virulencia es diferencial por finca. En cuanto a la variabilidad genética, los ensayos de PCR señalan al Grupo II (*Botrytis cinerea sensu stricto*) como el único presente en la población

colombiana. No se detectó el Grupo I (*Botrytis pseudocinerea*). La variabilidad encontrada en los aislamientos no se encontró asociada con el origen de la muestra pero si con la finca de donde provienen., El genotipo *transposa* estuvo presente en el 59% de los aislamientos analizados, seguido por *boty* con el 31% y el 10% por los genotipos *vacuma* y *flipper*. Los resultados obtenidos confirman por primera vez en el cultivo de rosas en Colombia la existencia de variabilidad biológica y genotípica de poblaciones de *B. cinerea* lo cual podría explicar por qué las estrategias de control no otorgan los resultados esperables y señala la necesidad de profundizar más en el conocimiento de éstas con el fin de optimizar el control y con ello obtener una mayor rentabilidad del cultivo de rosa.

Palabras clave: **caracterización fenotípica, caracterización genética, genotipos, transposones, *transposa*, *vacuma*, *flipper*, *boty*, virulencia.**

ABSTRACT

Gómez Rodríguez, T. 2013. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates rose of Colombian Andean highlands.

Botrytis cinerea (Bc) is the main pathological problem in colombian rose production systems. The damage caused by this pathogen on the petals reduces the marketable product value. Currently, gray mold control is based on an integrated disease management, that includes cultural practices and intensive fungicide program. Nonetheless, the problems associated with this disease have increased over time. Despite the economic impact of gray mold on the Colombian rose production, the knowledge on Bc populations is scarce. The variability in *B. cinerea* can be the result of hyphae anastomosis that give rise to multinucleated and heterokaryotic cells. Also, the genetic variation could be attributed to the presence of transposable elements (TE) boty/flipper on the Bc fungal genome. There are reports about the genetic characterization of Bc populations in other South American regions, but not on the Colombian rose/*B. cinerea* pathosystem. The objective of this study was to characterize the biological and genetically variability of the Bc populations recovered from different rose tissue (flowers, stems, and leaf litter) from six rose greenhouses located in three geographical areas of Colombian Andean highlands. Cultivar Tressor 2000 was the object of sampling. The variables evaluated were virulence on rose petals, type of mycelium, sclerotia formation and sporulation in culture medium. The genotypic characterization and Bc group correspondence, was obtained by means of PCR amplification of the boty and flipper TE, and PCR-RFLP of the Bc-*hch* gene, respectively. 270 single-spore isolates were analyzed. High morphological variability was found but this was not associated with the source of the isolate whether it was flower, stem and leaves. However, this variability was found associated with the greenhouse of origen. Regarding virulence, significant differences ($p < 0.05$) were found and associated with the isolate origin of rose tissue and with the greenhouse. Isolates originated from rose stems are more virulent than from flower and leaves. Virulence was also associated with greeninhouse. All isolates belong to group II (*B. cinerea* sensu stricto) none of the

isolates were *B. pseudocinerea*. 39% of isolates corresponded to *transposa* genotype (flipper+/boty+), 31% to *boty* (flipper-/boty+), 5% to *vacuma* (flipper-/boty-) and the remaining to *flipper* (flipper+/boty-). Genotypes could not be differentiated neither by origin of rose tissue nor by greenhouse. This is the first genetic study carried out in *Botrytis* spp. populations in rose in Colombia.

Keywords: phenotypic characterization, genetic characterization, genotype, *transposa*, *vacuma*, *flipper*, *boty*, disease

CONTENIDO

RESUMEN

LISTA DE FIGURS

LISTA DE TABLAS

INTRODUCCION

HIPOTESIS	16
1 REVISION DE LITERATURA	18
1.1 Aspectos básicos de la producción de rosas en Colombia	18
1.2 Aspectos básicos de la biología de <i>Botrytis</i> en rosa	19
1.2.1 <i>Botrytis cinerea</i>	19
1.2.2 Proceso de infección y producción de síntomas	21
1.2.3 Caracterización de poblaciones de <i>Botrytis</i> sp.	23
2 MATERIALES Y METODOS	28
2.1 Zona de estudio (marco geográfico).....	28
2.2 Selección del cultivar	29
Figura 5. Informe de porcentaje de ramos rechazados por síntomas de Moho gris, por variedad. Período Julio-Diciembre 2012 en una comercializadora en EE.UU	30
2.3 Obtención de muestras.....	30
2.4 Metodología	32
2.4.1 Aislamiento y purificación de <i>Botrytis cinerea</i>	32
2.4.2 Caracterización fenotípica	32
2.4.3 Caracterización genética de <i>B. cinerea</i>	37
2.4.4 Análisis estadístico de datos para establecer correlación entre características fenotípicas y genéticas:	41
3 RESULTADOS	41
3.1 Caracterización fenotípica	41
3.1.1 Caracterización morfológica	41
3.1.2 Virulencia	53
3.2 Determinación genética:	57
3.2.1 Determinación de Grupo de <i>Botrytis</i>	57
3.2.2 Determinación de genotipos de <i>Botrytis cinerea</i>	58
3.2.3 Análisis secuenciación Genotipos	64
3.3 Análisis comparativo de características morfológicas y genéticas de <i>B. cinerea</i>	66
4 DISCUSION DE RESULTADOS	69
4.1 Caracterización fenotípica	69
4.1.1 Caracterización morfológica:	69
4.1.2 Virulencia	73
4.2 Caracterización genética:	73
4.2.1 Determinación de Grupo de <i>Botrytis</i>	73
4.2.2 Determinación de genotipos	73
4.2.3 Análisis secuenciación.....	76
4.3 Análisis comparativo de características fenotípicas y genéticas de <i>B.cinerea</i> ..	76

5. CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFIA

Lista de Figuras

Figura 1. Sistema de producción de rosa en la Sabana de Bogotá.	19
Figura 2. Ciclo de la enfermedad Moho gris causada por <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de rosa.....	22
Figura 3. Ubicación de la zona de estudio de poblaciones de <i>Botrytis cinerea</i> en rosa	29
Figura 4. Lesiones causadas por <i>Botrytis cinerea</i> en flores en la planta (A) y en flores en poscosecha (B) de rosa cultivar Tressor2000.....	31
Figura 5. Informe de porcentaje de ramos rechazados por síntomas de Moho gris, por variedad.....	32
Figura 6. Esquema de modelo del muestreo de <i>Botrytis</i> sp. en invernaderos comerciales de rosa en la Sabana de Bogotá.....	33
Figura 7 Ubicación del tipo de tejido en muestras con Moho gris en plantas de rosa en la Sabana de Bogotá.....	34
Figura 8. Escalas de evaluación utilizadas en la caracterización morfológica de los aislados de <i>B. cinerea</i> , según parámetros analizados	34
Figura 9. Evaluación de virulencia de <i>Botrytis</i> sp. en pétalos de rosa cv Tressor2000.	35
Figura 10. Clústeres de agrupación de las características morfológicas de 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> de rosa de 6 fincas de la Sabana de Bogotá.....	43
Figura 11. Porcentaje de aislamientos por tipo de tejido (flor, tallo y hojarasca) según tipo de micelio.	44
Figura 12. Porcentaje de aislamientos por finca según tipo de micelio.....	46
Figura 13. Porcentaje de aislamientos por tipo de tejido según distribución de esclerocios en el medio.	47
Figura 14. Porcentaje de aislamientos según distribución de esclerocios en el medio por origen de los aislamientos.....	49
Figura 15. Caracterización morfológica según capacidad formadora de esclerocios por tipo de tejido	51
Figura 16. Capacidad formadora de esclerocios por finca	52
Figura 17. Número de aislamientos según el nivel de esporulación por tipo de tejido.....	53
Figura 18. Tipo de esporulación por finca	54
Figura 19 .Porcentaje de área afectada (virulencia) según el tipo de morfología de colonia.....	54
Figura 20. Porcentaje de área afectada (virulencia) por tipo de tejido	55
Figura 21. Virulencia (porcentaje de área afectada) por finca	56
Figura 22. Amplificado del fragmento parcial del gen <i>Bc-hch</i>	57
Figura 23. Resultado de la digestión con la enzima <i>Hhal</i>	58
Figura 24. Amplificación del fragmento del transposón Flipper.	59
Figura 25. Amplificación del fragmento del transposón Boty	59
Figura 26. Correspondencia genotípica de <i>B. cinerea</i> obtenidos a partir tres tipos de tejido: flor, tallo y hojarasca de seis fincas de rosa cv Tressor2000 localizadas en la Sabana de Bogotá.....	61
Figura 27. Resultados de la correspondencia genotípica de <i>B. cinerea</i> recuperados a partir de los 3 tipos de tejido de rosa cv Tressor2000 en seis fincas de la Sabana de Bogotá.	61
Figura 28 Probabilidad predicha de que el genotipo <i>boty</i> se presente en la finca QA.	63

Figura 29. Probabilidad predicha de que el genotipo *transposa* se presente en la finca QA..... 63

Figura 30. Probabilidad predicha de que el genotipo *vacuma* se presente en la finca MG..... 64

Figura 31. Cromatograma de la secuencia de la amplificación de la banda correspondiente al transposón Boty. 65

Figura 32. Temperatura promedio por finca año 2011, 2012 y 2013 presentada en el invernadero de cada finca de donde se realizaron los aislamientos de *B.cinerea*.....73

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones de amplificación por PCR de los primers Boty y Flipper de <i>Botrytis cinerea</i>	Error! Bookmark not defined.
Tabla 2. Análisis estadístico de tipo de micelio de 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 3. Análisis estadístico de caracterización morfológica distribución de esclerocios de 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 4. Análisis estadístico de la capacidad formadora de esclerocios de 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa de seis fincas de la Sabana de Bogotá.	Error! Bookmark not defined.
Tabla 5. Análisis estadístico del tipo de esporulación 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa de seis fincas de la Sabana de Bogotá.....	53.
Tabla 6. Análisis estadístico de la virulencia por tipo de tejido de 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 7. Análisis estadístico de virulencia por tipo de tejido	Error! Bookmark not defined.
Tabla 8. Análisis estadístico de caracterización genotipos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 9. Valores de identidad del BLAST de los aislamientos amplificados para los aislamientos <i>B.cinerea</i> correspondientes a los transposones Flipper y Boty.	66
Tabla 10. Correlación del nivel de esporulación con la capacidad formadora de esclerocios (CFE) para los genotipos <i>boty</i> (B), <i>flipper</i> (F), <i>transposa</i> (T) y <i>vacuma</i> (V)	Error! Bookmark not defined.
Tabla 11. Correlación del nivel de esporulación con la capacidad formadora de esclerocios para el genotipo <i>transposa</i> en los 270 aislamientos de <i>B.cinerea</i> de rosa provenientes de seis fincas productoras en la Sabana de Bogotá.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 12. Caracterización morfológica según tipo de micelio por tipo de tejido de 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá	Error! Bookmark not defined.
Tabla 13. Caracterización morfológica según distribución de esclerocios en el medio de 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa de seis fincas de la Sabana de Bogotá.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 14. Caracterización morfológica según tipo de esporulación por tipo de tejido de 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa de seis fincas de la Sabana de Bogotá	Error! Bookmark not defined.
Tabla 15. Caracterización morfológica según capacidad formadora de esclerocios de 270 aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de cultivos de rosa de seis fincas de la Sabana de Bogotá	Error! Bookmark not defined.
Tabla 16. Caracterización morfológica según virulencia por tipo de tejido provenientes de cultivos de rosa de seis fincas de la Sabana de Bogotá.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 17. Cultivares sembrados y Numero de aplicaciones realizadas en el invernadero de donde fueron realizados los aislamientos de <i>B.cinerea</i> por finca.....	87

INTRODUCCION

El Moho gris es uno de los principales problemas fitopatológicos que afectan la producción de rosas en Colombia, ya que puede llegar a ocasionar hasta un 40% de pérdidas si no se previene y controla a tiempo. *Rosa* spp. es el cultivo de mayor área sembrada en Colombia con el 28% del total del área sembrada (Anónimo, 2013).

Esta enfermedad es causada por *Botrytis cinerea* Pers Fr: [teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel]. Es un hongo ascomycete y sus elementos estructurales constitutivos de las células, tales como sus organelos, el núcleo y las vacuolas son típicas de este filo (Elad, 2007). Su reproducción es fundamentalmente asexual, sin embargo, hay reportes de reproducción sexual en algunos cultivos. Diferentes estudios han reportado que posee una gran variabilidad fisiológica y genética (Diolez *et al*, 1995; Martinez, 2000; Muñoz, 2002; Fournier y Giraud, 2002). La variabilidad fisiológica está principalmente basada en las diferencias en características de colonia, crecimiento miceliar, intensidad de esporulación, virulencia y resistencia a fungicidas (Martinez *et al.*, 2003). La variabilidad genética ha sido principalmente atribuida a la naturaleza multinucleada de los conidios, a los compartimentos hifales y a que el micelio puede ser heterocariótico (Elad *et al.*, 2007). Parte de esta variación es debida a la presencia de transposones (Levis, 1997). La presencia/ausencia de dos transposones Boty y Flipper ha sido reportada para determinar genotipos de *B. cinerea* en cultivos de vid, kiwi, arándanos, tomate, entre otros (Giraud, 1997).

Algunos antecedentes registran que la variabilidad genética de las poblaciones de *Botrytis* es menor en condiciones de cultivo bajo invernadero que cuando se cultiva a campo abierto. Esto debido a que la dispersión de las poblaciones del hongo bajo invernadero es menor y se exponen a una mayor presión de selección por fungicidas, lo que puede intensificar los problemas de resistencia. Al aire libre se producen migraciones naturales entre las poblaciones por lo que existe un combinación de estas y se presenta menor riesgo a que las poblaciones con

menor sensibilidad (resistentes) sean más estables y se incrementen en un tiempo menor (Esterio M, 2013).

En diferentes cultivos agrícolas, principalmente en vid, se ha evidenciado que los diferentes estados fenológicos del cultivo relacionados con las condiciones climáticas debido a la estacionalidad, favorecen o limitan el desarrollo de la enfermedad. En el caso de rosas, se ha determinado que existe una mayor o menor susceptibilidad al ataque del hongo dependiendo de los cultivares. Por ejemplo los cultivares de rosa roja, que son los de mayor área sembrada en Colombia, como Freedom, presentan menores pérdidas causadas por *Botrytis* comparada con los cultivares de color blanco, rosado, amarillo y naranja (Datos internos GR Chía, 2012)

En el cultivo de rosa, el patógeno infecta cualquier órgano de la planta y en todos los estados de desarrollo del cultivo. El hongo ataca principalmente tejidos viejos, con heridas o débiles, matando las células del hospedero desde los estadios más tempranos de la infección, lo que lleva a un daño extenso de los tejidos. Los síntomas iniciales aparecen como lesiones acuosas. A medida que el patógeno invade los tejidos se generan los conidios, los cuales son de coloración grisácea, característica de la presencia del patógeno, ocasionando la enfermedad conocida como moho gris (Elad, 2007). A pesar de las acciones que se toman permanentemente para manejar la enfermedad, las pérdidas ocasionadas en las diferentes etapas del proceso productivo (cultivo y poscosecha) siguen siendo importantes. Adicionalmente debido al sistema de producción bajo invernadero, monocultivo y las condiciones climáticas de la Sabana de Bogotá facilitan la agresividad y presencia de *Botrytis* durante todo el proceso productivo, haciendo que las acciones para su control sean de manejo diario.

Este trabajo pretende contribuir a la comprensión de las poblaciones de *Botrytis cinerea* recuperadas desde rosa en Colombia en cuanto diversidad fisiológica basada en las características de morfología de colonia, intensidad de esporulación, producción de esclerocios y virulencia. Como también respecto a la variabilidad genética de las poblaciones del patógeno en rosa basada en la presencia/ausencia de los transposones Boty y Flipper, para con ello obtener mayores antecedentes sobre su epidemiología, lo cual a su vez permita

desarrollar estrategias más eficientes de control integrado de la enfermedad causada por *B. cinerea* en rosa bajo invernadero

HIPOTESIS

En Colombia no existen antecedentes respecto de la diversidad genética en el patógeno asociado con esta enfermedad. Los trabajos sobre moho gris en rosa u otros cultivos en los cuales es importante, se han abordado sin considerar la posible diversidad intrapoblacional para las variables estudiadas, por ejemplo resistencia a fungicidas. Sin embargo, trabajos realizados fuera de Colombia han mostrado que las poblaciones de estos patógenos son genéticamente diversas y tienen un alto potencial evolutivo.

En esta investigación se consideraron las siguientes hipótesis:

- i) las diferencias en los resultados del manejo de la enfermedad que se observa entre fincas puede ser el resultado de poblaciones distintas del patógeno
- ii) En vid se encontró que al final del ciclo productivo anual, las variantes del patógeno habían segregado por órgano infectado. En este trabajo se buscó explorar esta tendencia en el cultivo de rosa, por lo que se utilizaron aislamientos provenientes de diferentes partes de la planta (flor, tallo y hojarasca)

Con el fin de entender un poco mejor al patógeno y plantear estrategias de manejo en el cultivo de rosa, se involucraron variables biológicas y genéticas de *B. cinerea*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar fenotípica y genéticamente aislamientos de *B. cinerea* asociadas con plantas de rosa en hojarasca, tallo y flor, en seis fincas de la Sabana de Bogotá.

Objetivos Específicos

Caracterización fenotípica:

1. Evaluar si existen diferencias morfológicas en los aislamientos de *B. cinerea*, obtenidos a partir de tres tipos de tejido: hojarasca, tallos y flores de rosa de seis fincas productoras en la Sabana de Bogotá.
2. Evaluar si existen diferencias en la virulencia de aislamientos de *B. cinerea* obtenidos a partir de tres tipos de tejido: hojarasca, tallos y flores de rosa de seis fincas productoras en la Sabana de Bogotá.

Caracterización genética:

1. Evaluar si existen diferencias en la composición genética de los aislamientos de *B. cinerea* obtenidos a partir de tres tipos de tejido: hojarasca, tallos y flores de rosa de seis fincas productoras en la Sabana de Bogotá.

1 REVISION DE LITERATURA

1.1 Aspectos básicos de la producción de rosas en Colombia

El cultivo de rosas en Colombia es una de las principales actividades económicas de la producción agrícola de exportación. En la floricultura colombiana la producción de rosas corresponde al 28% del total del área sembrada de 6800 hectáreas totales (Anónimo, 2013).

El sistema de producción tradicionalmente se ha realizado sobre suelo con riego por goteo. Sin embargo, la producción en condiciones de hidroponía ha venido remplazando al sistema tradicional y en la actualidad es el sistema de producción más utilizado en Colombia. Este cambio se ha propiciado por los beneficios de optimización de área, nutrición y manejo de plagas de suelo que conllevan a una mejor calidad y productividad. La producción se realiza bajo cubierta (invernadero) con diferentes grados de tecnología para el control de las variables ambientales. El sistema de cubierta más frecuente es plástico. Aun cuando la rosa es una planta perenne, en el sistema de producción colombiano una planta tiene una vida útil de 8 a 15 años. Se siembran aproximadamente 6,5 plantas/m² o 380 plantas por cama en doble hilera sobre contenedores plásticos que contienen sustrato y son cubiertos por mulch plástico blanco o por cascarilla de arroz cruda que mejora las condiciones de humedad del sustrato y facilita el manejo de malezas en el cultivo. Dependiendo de la variedad de rosa desde el momento de poda hasta la primera cosecha de la flor son aproximadamente 750 a 820 grados días (equivalentes a 70-80 días calendario) (Figura 1)

Los cultivares se dividen en rosa roja y rosa de "color". Los más susceptibles a *Botrytis* son los denominados Rosa Color, principalmente los cultivares de color rosado con un 43% de los ramos rechazados por lesiones causadas por *B. cinerea* durante el período julio-diciembre 2012, naranja con un 11%, amarillo 9% y blanco 3% (Datos internos GR Chía).



Figura 1. Sistema de producción de rosa en la Sabana de Bogotá. A. Camas en sistema hidropónico con sustrato de cascarilla de arroz, plantas de 8 semanas. B. Mismo sistema que A, plantas de 4 meses.

Durante el proceso de producción se generan residuos de cosecha por caída de hojas y cortes permanentes de los tallos de producción que favorecen la presencia permanente de *Botrytis* en el cultivo. Se considera que los principales reservorios del patógeno son la hojarasca que se encuentra en el tercio bajo de las plantas sobre las camas, los tallos de corte en donde se ocasionan heridas debidas al corte de estos para la cosecha de la flor y la flor.

1.2 Aspectos básicos de la biología de *Botrytis* en rosa

1.2.1 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea es un hongo ascomiceto responsable de la enfermedad Moho gris en cientos de plantas dicotiledóneas (Elad *et al.*, 2007) causando en muchos casos la pérdida total del cultivo. *Botrytis* es uno de los hongos patógenos y saprófitos con la mayor distribución geográfica que afecta una amplia variedad de especies de plantas. Esta enfermedad es muy común en diferentes tipos de flores de exportación cultivadas bajo invernadero. Moho gris es uno de los principales problemas en la producción de rosas de corte en Colombia en donde puede ocasionar pérdidas importantes tanto en cultivo como en Poscosecha (Datos internos GR Chía SAS)

El hongo actúa principalmente como saprófito y necrótrofo que inicialmente se establece en partes de plantas en descomposición o debilitadas y posteriormente se extiende al resto del tejido sano de la planta. Puede ser un invasor secundario

atacando plantas ya infectadas por otro patógeno. También es considerado un patógeno primario debido a que puede penetrar directamente en sus hospedantes a través de la cutícula mediante la producción de enzimas que degradan los componentes de ésta. En el caso de ornamentales puede atacar los diferentes tejidos de la planta incluyendo hojas, tallos y flores, durante la fase de campo o en el transporte y almacenamiento de la flor en poscosecha. También los tejidos senescentes que permanecen en las plantas sanas facilitan la invasión de los tejidos sanos vecinos.

La alta humedad en el ambiente que humedece los tejidos genera un medio propicio para el desarrollo rápido del hongo. Si se mantiene la alta humedad por largos periodos, el hongo puede esporular formando masas grises sobre el tejido afectado. Es frecuente que la infección sea imperceptible al momento del corte y empaque de la flor pero las nuevas condiciones que se presentan durante el almacenaje y transporte favorecen el desarrollo del hongo.

Normalmente se refiere al hongo por el nombre de su fase asexual debido a que la fase sexual no se observa frecuentemente. El teleomorfo (fase sexual) es conocido como *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (o sus sinónimos: *Haplaria grisea* Link, *Botrytis vulgaris* Link.:Fr., *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel). Posee cuerpos reproductivos llamados apotecios que contienen ascos y ascosporas (Kerssies, 1994; Giraud, 1997).

El micelio de *B. cinerea* está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos que se multiplican mediante división citoplasmática, siendo común que tenga lugar una división nuclear sin que se haya producido división citoplasmática. Esto da lugar a hifas cenocíticas con un elevado y variable número de núcleos. *Botrytis cinerea* se caracteriza por sus conidióforos ramificados y regularmente se encuentran sobre la superficie de los tejidos infectados. Estos se originan principalmente de la masa hifal aunque también pueden hacerlo a partir de los esclerocios. Produce dos tipos de conidios microconidios y macronidios. Los micronidios no cumplen ningún papel en infecciones a los tejidos vegetales. Estos son los gametos masculinos unicelulares, son espermacios que corresponden a la reproducción sexual del hongo. Los macroconidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo. Estos son hialinos, unicelulares, ovoides, multinucleados con 3 a 18

núcleos. Son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo (Elad, 2007).

En ocasiones el patógeno forma esclerocios aplastados e irregulares o hemisféricos de color negro que se desarrollan sobre o debajo de la epidermis del tejido infectado. Los esclerocios son las principales estructuras de resistencia de *B. cinerea*. Son de morfología plano-convexa cuyas dimensiones oscilan entre 1 y 15 mm de sección longitudinal dependiendo de las condiciones de cultivo. Las formas y tamaños dependen del aislamiento (Elad, 2007).

1.2.2 Proceso de infección y producción de síntomas

Los conidios que se forman a partir de esclerocios o de micelio en residuos de cosecha o infecciones activas en el hospedero son la fuente para el inicio de las infecciones. El micelio, los esclerocios y los conidios tienen diferentes habilidades para la supervivencia y la dispersión. También las funciones de estas estructuras varían dependiendo del ecosistema y clima donde se está generando la infección. Se ha investigado poco la supervivencia del micelio de especies de *Botrytis* bajo condiciones naturales. Hay algunas pruebas que señalan que el micelio de ciertas especies de *Botrytis* puede sobrevivir por periodos considerables en bulbos, semillas y otras partes vegetativas de la planta (Coley-Smith, 1980).

Posterior a la penetración de la cutícula de la epidermis del hospedero, el hongo invade el tejido subepidérmico, inter e intracelularmente para establecer la infección. El hongo mata las células huésped antes de que sean invadidas. Entendiendo como patogenicidad la habilidad del patógeno para causar enfermedad y como virulencia el grado de patogenicidad del hongo (Agrios, 2005), las enzimas que atacan a las sustancias pécticas en la pared celular vegetal desempeñan un papel importante en la patogenicidad. *B. cinerea* secreta enzimas de degradación de la pared celular durante las etapas tempranas de la infección, se conoce que las poligalacturonasas (BcPGs) son necesarias para la plena virulencia de *B. cinerea* codificadas por el gen *endopoligalacturonasa 1*. Estudios han mostrado que hay seis (6) isoenzimas de endopoligalacturonasas, y cada una de estas tiene una actividad específica. BcPG1 y BcPG2, están involucradas con virulencia (Elad *et al.*, 2007).

De forma general, el ciclo de infección puede considerarse dividido en varias etapas. Primero la adhesión de los conidios sobre la superficie del huésped inmediatamente después de su hidratación. Posteriormente la germinación de los conidios si las condiciones son favorables como la temperatura, presencia de nutrientes exudados en la cutícula, edad y concentración del inoculo y edad del tejido. En promedio la infección se logra entre 5–8 h, durante las cuales el conidio debe permanecer húmedo. Luego se da la penetración del tejido vegetal, bien a través de heridas o de aberturas naturales, o mediante la participación de distintas enzimas, la secreción de toxinas o combinación de estas. Cuando esta fase se ha dado, se genera la muerte de las células adyacentes al punto de penetración dando lugar a la formación de una lesión primaria. Una vez vencidas las defensas de la planta se inicia la diseminación en el tejido vegetal circundante, originando la colonización y la maceración. Finalmente se da la esporulación del hongo sobre el tejido macerado, produciéndose una nueva generación de conidios que están listos para ser dispersados e iniciar un nuevo ciclo de infección (Elad, 2007) (Figura 2).

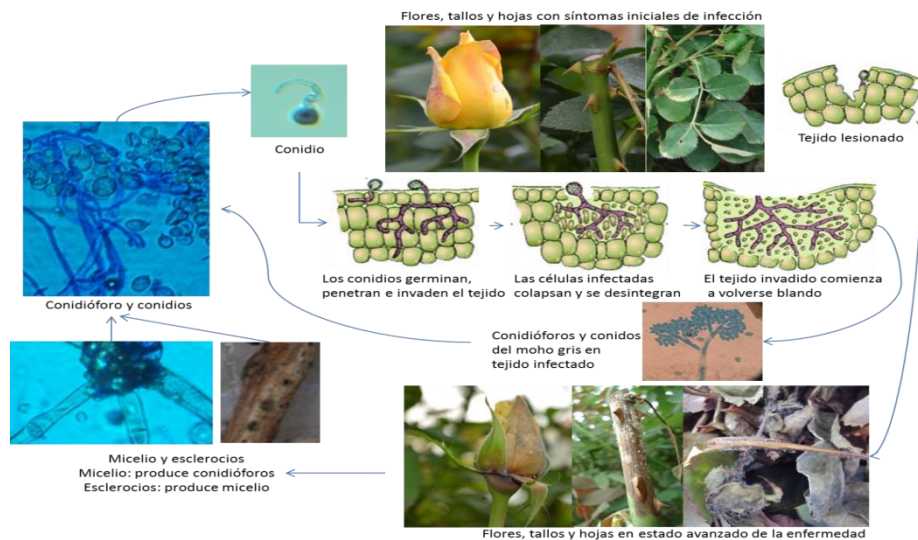


Figura 2. Ciclo de la enfermedad moho gris causada por *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosa (Gómez, T).

1.2.3 Caracterización de poblaciones de *Botrytis* sp.

Se presume que el potencial evolutivo de una población de un patógeno se refleja en la estructura genética de su población. Las poblaciones de patógenos con un alto potencial evolutivo tienen más probabilidades de superar la resistencia genética de sus hospederos. Los patógenos con mayor riesgo de superar los genes de resistencia tienen un sistema de reproducción mixta, un alto flujo génico, tamaños de gran población efectiva y tasas de mutación altas. Los patógenos de riesgo menor son aquellos con estricta reproducción asexual, bajo potencial de flujo genético, pequeña población efectiva, tamaños y tasas de mutación baja (Mc Donald and Linde, 2002). *Botrytis* se considera un hongo con un alto potencial evolutivo. Aunque la reproducción sexual no juega un papel importante en su ciclo de vida, es un hongo con alto potencial de flujo genético por su amplio rango de hospederos y por su distribución geográfica. Gindler en 1979 establece que la variabilidad es posible explicarla principalmente por la anastomosis que pueden producirse entre las hifas del hongo y que dan lugar a células multinucleadas y generalmente heterocarióticas. En 1932, Hansen y Smith, observaron cómo los núcleos de una cepa podían migrar al interior de las células de otra por anastomosis de hifas vecinas, produciendo así, un micelio heterocariótico.

Tres conceptos de especies han sido destacados en los hongos, aunque con diferentes matices de interpretación: el morfológico basado en la apariencia, el biológico basado en el entrecruzamiento, y el filogenético basado en el concepto de ancestro común (Brasier, 1997; Harrington y Rizzo, 1999; Taylor *et al.*, 2000). Jarvis (1977, 1980) y Laurel (1980) generaron diversos estudios en donde proporcionan exámenes amplios de la taxonomía y la genética de *Botrytis* spp. Las especies de *Botrytis* se han delimitado principalmente sobre la base de las características morfológicas y culturales asociadas con la especificidad del huésped (Hennebert, 1973; Jarvis, 1977, 1980). Las características como tamaño y forma de esclerocios y tamaño de conidios son útiles en la delimitación de algunas especies, pero muchas otras especies son morfológicamente similares y las condiciones de cultivo influyen significativamente en la variación. (Jarvis 1977) En ornamentales en Colombia, el poder patogénico del hongo *Botrytis cinerea* sobre las principales especies de flores de exportación, se estudió en clavel,

pompón, crisantemo, rosa y statice. Encontrando que los aislamientos provenientes de pompón presentaron colonias con formación abundante de esclerocios y esporulación escasa; los aislamientos obtenidos de rosa y clavel presentaron colonias con esporulación abundante y formación escasa de esclerocios. Los aislamientos provenientes de statice produjeron colonias con esporas y esclerocios. Todos los aislamientos inoculados fueron patogénicos en flores de rosa, clavel, pompón, crisantemo y statice, pero mostraron una respuesta diferencial en su agresividad y en su patogenia, de acuerdo con la procedencia del aislamiento. Las diferencias morfológicas de los distintos aislamientos se deben a la presencia de razas fisiológicas del hongo (Chaves y Henao, 1983).

Actualmente ésta caracterización fenotípica ha estado asociada también a la sensibilidad de algunos ingredientes activos utilizados para el control de la enfermedad (Esterio, 2005).

Otro enfoque para definir especies biológicas consiste en determinar la distribución de la variación alélica para definir poblaciones que se están entrecruzando. Este enfoque se ha aplicado a *B. cinerea* utilizando marcadores de ADN y apoya la propuesta de que *B. cinerea*, como actualmente es reconocido, comprenden dos poblaciones distintas de poblaciones entrecruzadas, ellas son *B. pseudocinerea* y *B. cinerea* sensu stricto. El acercamiento a la sistemática filogenética ha sido impulsado por los avances en la secuenciación del ADN, pero para *Botrytis* este enfoque está poco desarrollado. La región ITS del DNA ribosomal ha sido ampliamente utilizada para la determinación de especies de hongos, pero la variación en la región ITS dentro de *Botrytis* es baja, limitando su utilización en este género (Nielsen *et al.*, 2001).

El desarrollo de técnicas moleculares ha revolucionado la genética de poblaciones de hongos proporcionando numerosos marcadores genéticos fácilmente disponibles. Técnicas como RAPD y AFLP son convenientes y permiten explorar simultáneamente el polimorfismo de ausencia/presencia de sitios de restricción y la ocurrencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias. También permiten generar una gran cantidad de información en breve plazo, sin requerir del conocimiento previo de las secuencias genómicas amplificadas, pero están limitados por las dificultades de escasa reproducibilidad.

Los microsátélites son marcadores multialélicos que ofrecen numerosos polimorfismos con alta reproducibilidad y conveniencia; se han desarrollado para *B. cinerea* (Fournier *et al.*, 2002), pero no se aplican ampliamente. Estudios que han utilizado RAPD y RFLP en *B. cinerea* han reconocido 50 o más marcadores polimórficos.

Los hongos en general y *B. cinerea* en particular, poseen una variedad de elementos genéticos extracromosómicos incluyendo los cromosomas de las mitocondrias, plásmidos y elementos transponibles (Rosewich y Kistler, 2000). Una de las razones de las variaciones en la dinámica poblacional en *B. cinerea* son consecuencia de la presencia de elementos móviles llamados transposones (Elad, 2007).

Los elementos transponibles son secuencias genómicas repetitivas, ubicuas y abundantes en organismos eucariotas que son capaces de moverse de una localización cromosómica a otra. Al hacerlo, a menudo se replican a sí mismos. La capacidad de replicación de elementos de transposición es la esencia del éxito evolutivo y tiene importantes implicaciones para la dinámica entre los elementos y sus hospederos (Bowen, 2002).

Estudios moleculares realizados evidenciaron la presencia de dos de estos elementos en el genoma de *B. cinerea*; el primer transposón descubierto correspondió a un retrotransposón de 6 kilo bases (kb) denominado Boty con un marco de lectura abierto con secuencias homólogas a la transcriptasa inversa y dominios en RNasa H en los genes *pol* (Diolez *et al.*, 1995), el segundo a un transposón de 1842 pares de bases (pb) denominado Flipper identificado como una secuencia de inserción dentro de la región codificante del gen de la nitrato reductasa que codifica potencialmente para una transposasa (Levis *et al.*, 1997).

Con base en estos elementos, inicialmente fue posible distinguir dos genotipos de *B. cinerea*: genotipo *transposa* (Flipper+/Boty+), que posee ambos transposones y genotipo *vacua* (Flipper-/Boty-), que carece de estos (Giraud *et al.*, 1997). Posteriormente, se detectó la presencia de aislamientos del patógeno que sólo presentaban uno de estos elementos, el correspondiente al retrotransposón Boty, cuyos aislamientos se denominaron como *boty* (Flipper-/Boty+) y el genotipo *flipper* (Flipper+/Boty-) (Muñoz *et al.*, 2002; Giraud *et al.*, 1999).

Estudios en vides viníferas realizados en la región de Champagne (Francia) establecieron que los genotipos *transposa* y *vacuma* se presentan en simpatria, es decir que ambos genotipos coexisten al mismo tiempo (Muñoz *et al.*, 2002; Giraud *et al.*, 1999; Giraud *et al.*, 1997). Además, las subpoblaciones estudiadas presentaron una alta variabilidad genética, que se atribuye en parte a la potencial recombinación genética ocurrida en la naturaleza. En estos estudios, también se estableció que los aislamientos genotipo *transposa* se comportan de manera más estable y uniforme que los aislamientos genotipo *vacuma* y que los genotipos *transposa* se asocian preferentemente a infecciones del racimo (Martínez *et al.*, 2005) y aunque su presencia es estable durante todo el año, tiende a incrementarse hacia la cosecha, presentando una menor capacidad saprófita y mayor habilidad patogénica que los aislamientos *vacuma*. Los genotipos *vacuma* se presentan como una población menos estable, más heterogénea y asociada preferentemente a infecciones de follaje, presentándose en mayor proporción al inicio del período vegetativo de la vid (brotación a floración) y corresponderían a poblaciones migratorias (Martínez *et al.*, 2005; Giraud *et al.*, 1999; Giraud *et al.*, 1997). Posteriormente y al igual que en Francia, se detectó un tercer aislamiento que presenta en su genoma sólo al transposón Boty; este aislamiento se denominó *boty*, y se presenta en una baja proporción, predominando al igual que *vacuma* en brotación y floración, y estando genéticamente más relacionado con este último genotipo (Ramos y Salinas, 2003; Cofré y Estévez, 2002; Muñoz *et al.*, 2002). Ma y Michailides (2005) detectaron tanto *transposa*, *vacuma* y *boty* en estudios en uva, kiwi, calabaza y guisantes en California.

Se ha establecido una mayor similitud en aislamientos colectados desde un mismo hospedero, lo que señalaría cierto grado de especificidad entre las poblaciones de *B. cinerea* y los distintos hospederos en estudios realizados mediante las técnicas de RFLP y RAPD (Muñoz *et al.*, (2002); Giraud *et al.*, (1999) y Thompson y Latorre, (1999)).

Estudios posteriores realizados en Chile por Esterio *et al* (2011), con los marcadores moleculares para identificación de transposones Boty y Flipper, muestran la predominancia de algunos genotipos en las diferentes etapas del cultivo y su relación asociada a poblaciones tratadas y no tratadas con fungicidas definidos para el control de *Botrytis*.

En el cultivo de *Rosa* sp. en Ecuador se ha detectado la variabilidad genética del hongo frente a la respuesta de algunos aislamientos a los fungicidas sistémicos más eficaces que se aplican en su contra en las provincias de Pichincha y Cotopaxi. Este trabajo se realizó con la finalidad de implementar medidas adecuadas de control químico (Chamorro, 2007).

Además se ha evidenciado un comportamiento diferencial de los genotipos con respecto a su sensibilidad a ciertos ingredientes activos de fungicidas. Giraud *et al.* (1999) en Francia fueron los primeros en determinar que tanto *B. cinerea* genotipo *transposa* como genotipo *vacuma* presentaban resistencia a carbendazim y a diethofencarb. Solo *transposa* se comportaba como resistente a vinclozolin y que sólo algunos aislamientos *vacuma* presentaban resistencia a fenhexamid. Albertini *et al.* (2002) detectaron dos aislamientos del genotipo *flipper* resistentes a fenhexamid y posteriormente Ma y Michailides (2005) detectaron cuatro aislamientos de un total de 234 aislamientos de *B. cinerea* genotipo boty con resistencia a fenhexamid. En Chile, al analizar el comportamiento de sensibilidad a la dicarboximida iprodione en aislamientos de *B. cinerea* recuperados desde tres zonas productoras de uva de mesa, se detectó que sólo los pertenecientes al genotipo *transposa* presentaban resistencia a este fungicida (Esterio *et al.*, 2011). Milicevic *et al.* (2006), determinaron que el mayor porcentaje de fenotipos resistentes a los fungicidas benomyl, vinclozolin, dichlofluandil, pyrimethanil, fenhexamid y fludioxonil, corresponde al genotipo *transposa* y el porcentaje más pequeño de fenotipos resistentes a los aislamientos *flipper*.

Mediante PCR-RFLP, Fournier *et al.* en el 2002 caracterizaron el gen *Bc-hch* de *B. cinerea*, homólogo al gen *Nc-het-c* de incompatibilidad vegetativa en *Neurospora crassa*. El gen *Bc-hch* se utilizó como marcador poblacional, determinando una nueva estructura poblacional de *B. cinerea*, conformada por el Grupo I y el Grupo II (*Botrytis cinerea* sensu stricto), los que serían genéticamente aislados, sin posibilidad de intercambio genético entre ellos. Recientemente Walker *et al.* (2010) propusieron que el Grupo I correspondería a una nueva especie de *Botrytis* denominada *Botrytis pseudocinerea* que se encontraría conviviendo en el mismo nicho ecológico que *Botrytis cinerea* (*sensu stricto*). Aislados de *B. cinerea* pertenecientes al Grupo I han sido detectados en un bajo número en aislamientos provenientes de Francia (Albertini *et al.*, 2002), California

(Ma y Michailides, 2005), Alemania (Kretschmer y Hahn, 2008), Hungría (Fekete *et al.*, 2010), Chile (Auger *et al.*, 2012).

2 MATERIALES Y METODOS

El aislamiento y purificación de las cepas de *Botrytis* sp. del cultivar Tressor2000 se realizó en el laboratorio de Sanidad vegetal de GR Chía. Los análisis de caracterización genética por PCR se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Antonio Angarita Zerda de la Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias Agrarias, sede Bogotá.

2.1 Zona de estudio (marco geográfico)

El estudio se realizó en el departamento de Cundinamarca, Colombia. Está ubicado en el centro del país cerca a Bogotá, D.C., esta zona es conocida como la Sabana de Bogotá.

El sitio de muestreo del estudio correspondió a tres zonas geográficas de la Sabana de Bogotá, dos fincas por zona. Zona norte: finca Quality Flowers (QA) (5°03'21.56''N 73°48'19.68''O) ubicada en el municipio de Sesquilé y finca Flores el Tandil (TN) (4°59'17,58''N 73°59'36.85''O) ubicada en el municipio de Zipaquirá; zona centro: finca MG Consultores (MG) (4°54'17.02''N 74°03'45.40''O) y finca Flores la Valvanera (VL) (4°52'28.99''N 74°03'45.39''O) ubicadas en el municipio de Chía y zona occidente: finca Mountain Roses (MO) (4°43'21.88''N 74°6'55.35''O) ubicada en el municipio de Madrid y finca Pardo Carrizosa (SB) (4°48'25.04''N 74°18'18.39''O) ubicada en el municipio de Facatativá (Figura 3).

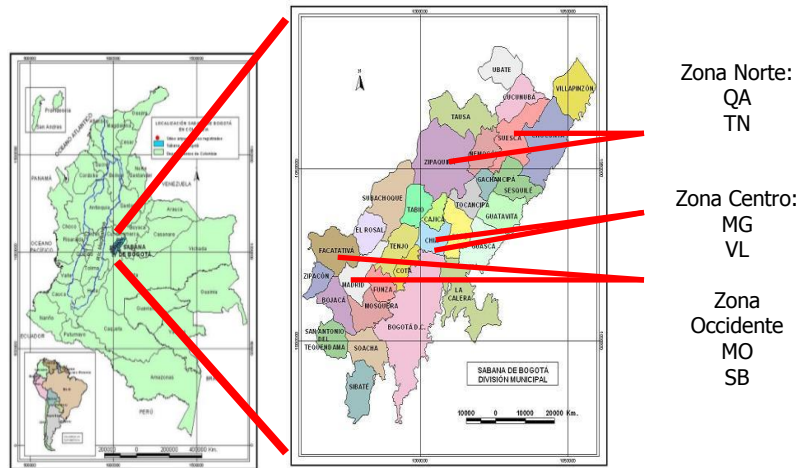


Figura 3. Ubicación de la zona de estudio de poblaciones de *Botrytis cinerea* en rosa

2.2 Selección del cultivar

Se seleccionó el cultivar Tressor2000 con características de susceptibilidad moderada a *Botrytis* sp. Este cultivar es clasificado como rosa color novedad amarilla con pérdidas promedio de ramos rechazos (Figura 5), la cual presenta fácil distinción de los síntomas ya sea en campo o en poscosecha cuando es atacado por *Botrytis* sp. (Figura 4).



Figura 4. Lesiones causadas por *Botrytis cinerea* en flores en la planta (A) y en flores en poscosecha (B) de rosa cultivar Tressor2000

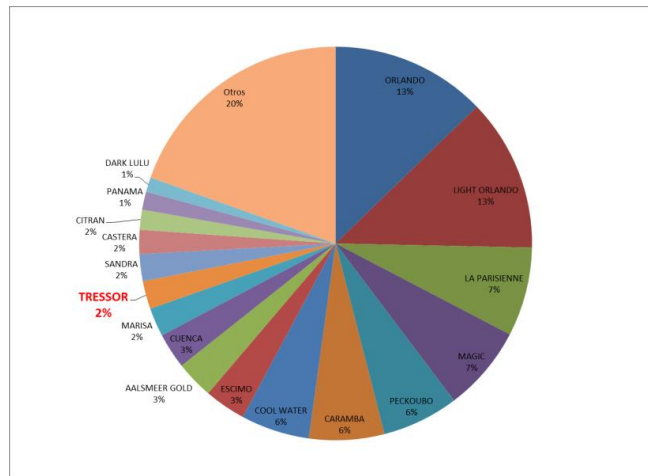


Figura 5. Informe de porcentaje de ramos rechazados por síntomas de Moho gris, por variedad. Período Julio-Diciembre 2012 en una comercializadora en EE.UU

2.3 Obtención de muestras

El muestreo se realizó durante el mes de diciembre de 2011. Se colectaron hojas secas desprendidas y que se habían acumulado en la superficie de las camas de producción (hojarasca), y de tallos y flores de plantas del cultivar Tressor2000 con signos esporulantes de Moho gris. En el resto del documento, la denominación “tipo de tejido” se usará para referirse al origen las muestras descritas con relación a la planta. Cada muestra se empacó individualmente, estas se llevaron al laboratorio de Sanidad Vegetal de GR Chía SAS. para hacer el aislamiento del patógeno.

Se seleccionó un invernadero por cada finca, dos fincas por cada zona (norte, centro y occidente) (Figura 4). En cada invernadero se colectaron 15 muestras de hojarasca, 15 muestras de tallo y 15 muestras de flor para un subtotal de 45 muestras por finca y un total de 270 muestras (Figura 6 y Figura 7).



Figura 6. Esquema de modelo del muestreo de *Botrytis* sp. en invernaderos comerciales de rosa en la Sabana de Bogotá

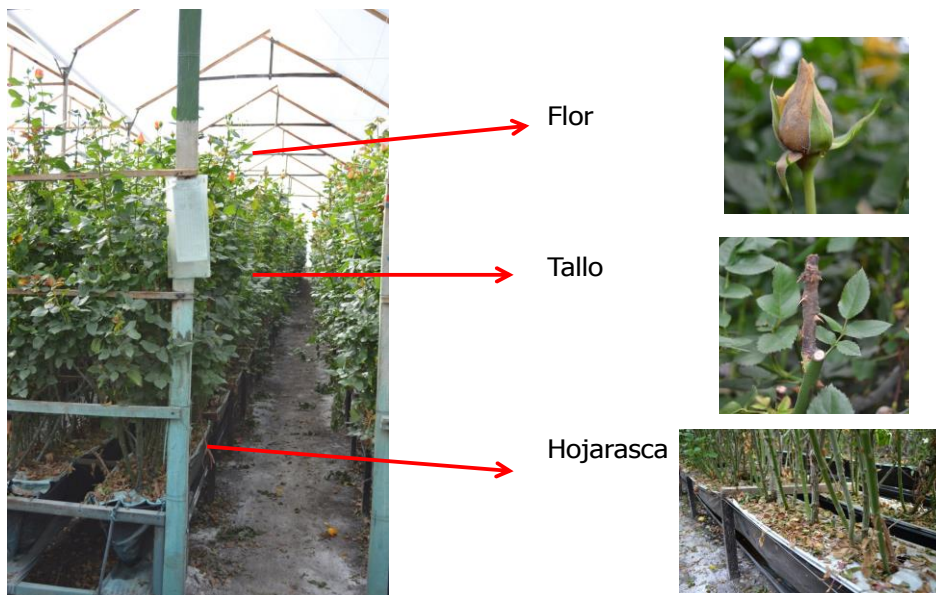


Figura 7 Ubicación del tipo de tejido en muestras con Moho gris en plantas de rosa en la Sabana de Bogotá

2.4 Metodología

2.4.1 Aislamiento y purificación de *Botrytis cinerea*

Cada muestra de material vegetal, se colocó independientemente en una caja plástica con una rejilla plástica en la base. Sobre la superficie de la rejilla se colocó una toalla de papel humedecida con agua destilada estéril y sobre esta, la muestra de tejido con síntomas. Esta cámara húmeda se mantuvo a 25 °C en oscuridad durante cinco días. Posterior a este tiempo se recuperó con un asa, el hongo que había esporulado sobre el tejido (*Botrytis* sp) se sembró en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Malta (AM), y luego se incubó durante cinco días a 25 °C.

Posteriormente, se verificó la presencia de *Botrytis* sp. en el medio de cultivo PDA o AM, identificando macroscópicamente colonias de micelio de color gris.

Para purificar el aislamiento se realizaron cultivos monospóricos del hongo, tomando una suspensión de conidios del hongo en una concentración de 1×10^5 conidias/ml sembrando 1 ul en el medio de cultivo Agar–Agua (AA) que se encontraba en una lámina portaobjetos.

Esta lámina se llevó a incubación 25 °C por 48 horas, tiempo al que se observó al microscopio y se tomó una conidia germinada con ayuda de bisturí. La conidia se sembró en medio AM y se llevó a incubación a 25 °C en oscuridad por cinco días. Este mismo procedimiento se realizó para obtener 15 aislamientos por tipo de tejido por finca.

Los aislamientos se almacenaron a 4°C en oscuridad durante 15 días.

2.4.2 Caracterización fenotípica

2.4.2.1 Caracterización morfológica:

El comportamiento *in vitro* de los aislamientos se evaluó en cajas de Petri con AM y mantenidas en oscuridad continua por un tiempo máximo de 21 días a 20 °C en oscuridad, según metodología descrita por Martínez *et al.* (2003). Las variables evaluadas fueron


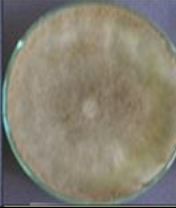



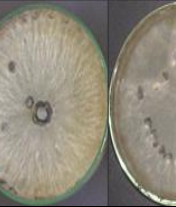






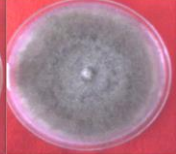
1. Aspecto miceliar
2. Esporulación

3. Capacidad formadora de esclerocios

Con tal propósito se colocaron en forma invertida sobre placas de Petri con AM, discos de 5 mm de diámetro de cada uno de los aislamientos que se encontraban en AM de 4 a 5 días de edad. Las placas de Petri así sembradas se mantuvieron en incubación a 20 °C en oscuridad continua. Se prepararon tres repeticiones por aislamiento correspondiendo cada una de éstas a una placa de Petri (unidad experimental).

Las evaluaciones del aspecto miceliar, esporulación y producción de esclerocios de los distintos aislados se efectuaron mediante observaciones visuales realizadas luego de 21 días post siembra.

Posterior a este tiempo, cada placa de Petri de cada uno de los aislamientos se clasificó con respecto a aspecto miceliar y capacidad de producir esclerocios según Martínez *et al.* (2003 b), clasificándose cada repetición en categorías o clases morfológicas “miceliares” o “esclerociales” cuando presentaron un predominio de la misma. Se evaluó la capacidad de formar esclerocios (**Cfe**) en cada uno de los aislamientos considerados, se evaluó visualmente utilizando también una escala arbitraria compuesta por cuatro niveles (0 a 3), en donde el nivel **0** correspondió a ausencia total de esclerocios en el cultivo y **3** al valor más alto de producción de esclerocios. También y según el nivel de esporulación (**€**) que presentaron los aislados en cada una de las repeticiones, éstos se clasificaron en cuatro niveles arbitrariamente establecidos (0 a 3), en donde **0** correspondió a ausencia total de esporulación y **3** a esporulación profusa (mayor al 50% de la superficie de placa de Petri) (Martínez *et al.*, 2003) (Figura 8).

Parámetros analizados		Escala de Evaluación (Clases)			
1° Clasificación Morfológica	a) Miceliar (M)	M-I	M-II	M-III	M-IV
		Micelio corto	Micelio suelto	Crecimiento en masa	Micelio grueso y lanudo
					
		S-0	S-I	S-II	S-III
	Ninguna formación de esclerocios	Esclerocios formados en borde de placa de Petri	Esclerocios grandes dispuestos radialmente en placa de Petri	Esclerocios grandes distribuidos irregularmente en placa de Petri	Esclerocios numerosos y pequeños, desuniformemente distribuidos
					
b) Esclerocial (S)*					
2° Nivel de Esporulación (€)*		€ 0	€ 1	€ 2	€ 3
		Ausencia de esporulación (0% €)	Esporulación escasa (1 – 10% €)	Esporulación débil (10% < € < 50%)	Esporulación profusa abundante (€ > 50%)
					
3° Capacidad formadora de Esclerocios (Cfe)*		Cfe-0	Cfe-1	Cfe-2	Cfe-3
		Ausencia de esclerocios (0/placa de Petri)	Escasa producción de esclerocios (1 a 15/ placa de Petri)	Moderada producción de esclerocios (15 a 30/ placa de Petri)	Alta producción de esclerocios (Nº > 30/ placa de Petri)

* Valores establecidos en este estudio, considerando los niveles previamente establecidos, considerando los criterios de Martínez *et al* (2003 b).

Figura 4. Escalas de evaluación utilizadas en la caracterización morfológica de los aislados de *B. cinerea*, según parámetros analizados: 1° Clase Miceliar (a) ó Esclerocial (b), 2° Nivel de esporulación y 3° Capacidad formadora de esclerocios (Martínez *et al.*, 2003 b).

2.4.2.2 Determinación de virulencia

Esta capacidad se determinó para cada uno de los aislamientos de *B. cinerea*, mediante ensayo *in vivo* realizado sobre discos de pétalos de rosa del cultivar Tressor2000 en el que se consideró el siguiente diseño:

- a) Inoculación pétalos sin herida: dos pétalos por aislamiento
- b) Número de repeticiones: 3
- c) Diseño de ensayo: Este es un diseño en bloques cíclicos generalizados con siete montajes, cada uno de 50 cajas. Se utilizó el procedimiento estadístico OPTEx del programa SAS v9.2 para la aleatorización de las unidades experimentales (SAS, 2002)
- d) Un testigo, correspondiente a 6 pétalos, sin herida no inoculados sobre las cuales se depositó solo agua destilada estéril.

Previo a las inoculaciones los pétalos fueron desinfectados superficialmente mediante inmersión por un minuto en hipoclorito de sodio de uso doméstico (2%), enjuagados en agua destilada estéril y secadas sobre papel absorbente estéril. Los discos de pétalos se colocaron en cajas de cultivo de células de seis pozos. En cada caja se evaluaron tres aislamientos y dos pétalos por aislamiento. La inoculación se realizó con una gota de 10 μ L de una concentración de 1×10^5 conidias/mL, colocada en el centro del pétalo. El inóculo de cada monospóricico se preparó a partir de cultivos puros del hongo de siete días de crecimiento. Posterior a la inoculación, los pétalos se incubaron a 20 °C en oscuridad. Las evaluaciones de porcentaje de área afectada de cada disco de pétalo se efectuaron a las 72 horas de incubación. De cada pétalo se tomó una fotografía y con programa Asses 2.0 APS se determinó el área afectada sobre el total del área del pétalo comparativamente con los pétalos testigo (Figura 9).

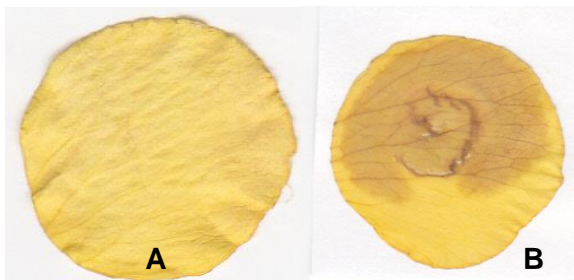


Figura 5. Evaluación de virulencia de *Botrytis* sp. en pétalos de rosa cv Tressor2000 testigo (A) y pétalo infectado (B) por *B. cinerea* aislamiento 26.

2.4.2.3 Análisis estadístico de caracterización fenotípica: morfológica y virulencia

Para la caracterización de las variables morfológicas: 4 tipos micelios (4 variables binomiales), 5 tipos de formación de esclerocios (5 variables dicotómicas), nivel de esporulación (1 variable ordinal) y capacidad formadora de esclerocios (1 variable ordinal), se emplearon técnicas de agrupación multivariada mediante la estimación de matrices de distancia de variables ordinales y nominales mediante el algoritmo propuesto por Gower (SAS, 2002).

Para la selección del número final de grupos se utilizaron los estadísticos pseudo T y pseudo F (SAS, 2002) que ayudan en la identificación del número de grupos óptimos que retiene la mayor cantidad de variación. Para cada uno de los clúster identificados se evaluó la frecuencia de las 11 variables utilizadas.

Para el análisis estadístico de los resultados de las características morfológicas y de virulencia se utilizó el método de regresión logística lineal múltiple para las variables binarias por el método de máxima verosimilitud y procesos de selección de variables mediante la metodología stepwise. Para su interpretación las variables seleccionadas fueron transformadas a valores de ODDS. ODDS es una relación de proporciones, es la probabilidad de que ocurra un evento frente a que no ocurra.

Para las variables ordinales de nivel de esporulación y capacidad formadora de esclerocios se aplicaron técnicas de regresión múltiple y métodos de selección de variables por el método STEPWISE (SAS, 2002).

La información se digitalizó en tablas de Excel para procesarla para análisis estadístico en el programa SAS.

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza para determinar diferencias estadísticas entre variables por medio de la técnica de regresión logística que evalúa simultáneamente el efecto de las variables localidad, finca y tipo de muestra contra cada característica morfológica y virulencia. Se generaron gráficos de acuerdo a las necesidades y se establecieron correlaciones con las variables definidas.

2.4.3 Caracterización genética de *B. cinerea*

2.4.3.1 Obtención de ADN genómico de *B. cinerea*:

Obtención de biomasa: Se cultivó micelio de cada uno de los distintos aislamientos de *B. cinerea* en medio líquido AM a 23 °C sin agitación. El micelio se cosechó a los 4 a 5 días de incubación, cuando ya se había formado una capa superficial de crecimiento miceliar. Esta capa se lavó con agua destilada estéril, se secó entre dos trozos de papel absorbente y posteriormente guardó en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Las muestras se liofilizaron (Esterio *et al*, 2002).

El micelio de *B. cinerea* para extracción de ADN se liofilizó en equipo de liofilización Labconco a 0,09 mBar a una temperatura de -47 °C durante 48 h. Los aislamientos liofilizados se almacenaron a -20 °C.

Extracción de ADN: Se realizó utilizando el protocolo de obtención de ADN genómico DNeasy 96 plant Kit ref 69181. Para determinar la integridad del ADN cromosomal y la ausencia de ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con tinción con bromuro de metilo por 1 hora a 95 voltios, en buffer Tris Borato EDTA (TBE) 1X (Sambrook *et al*, 1989). Para visualizar el ADN obtenido los geles fueron dispuestos en un transiluminador Biorad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software170-8195.

2.4.3.2 Determinación de Grupo Genético de *Botrytis*

Por medio de la técnica de PCR se amplificó una región del gen *Bc-hch* (Fournier *et al.*, 2002) de todos los aislamientos. Se utilizaron como control ADN de aislamientos franceses de *B. cinerea* correspondientes al Grupo I (*Botrytis pseudocinerea*) y chilenos correspondientes al Grupo II (*Botrytis cinerea*). Se utilizaron los primers: 262: 5'AAGCCCTTCGATGTCTTGA3' y 520L: 5'ACGGATTCCGAAGTAAGTAA3'; los que amplifican un fragmento de 1171 pb.

Para diluir los los primers 262 y 520L estos se centrifugaron por 2 minutos y se preparó con agua ultrapura una dilución de 100 mM. Se dejaron resuspendidos a 4 °C por 1 hora y se preparó una dilución a 10 mM, se alicuotaron y se almacenaron a -20 °C. El ensayo de PCR se realizó en un volumen total de 20 µL: conteniendo 2 µL de ADN; 1,2 µL de cada primer; 5,6 µL agua ultrapura y 10 µL

de GoTaq ADN polimerasa marca Invitrogen. El ensayo de PCR correspondió a 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 min 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C. La verificación de las reacciones de amplificación del producto de 1171 pb se efectuó en geles de agarosa al 2% con bromuro de metilo, con un marcador de peso molecular de 100 pb marca Invitrogen y 10µL del producto de PCR. La electroforesis se realizó por un período de 2 horas 15 minutos a 70 voltios y 400 amperios. Luego el gel se dispuso en un transiluminador Biorad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software170-8195 evidenciando una banda a 1171 pb.

Posteriormente se procedió a realizar la digestión con enzima de restricción. Para ello se preparó el mix de enzima: Agua ultrapura 12 µL, buffer enzima 10X 2 µL, enzima HhaI 0,8 µL. La digestión se realizó en un volumen total de 20 µL: conteniendo 15 µL de mix de enzima HhaI marca Invitrogen y 5 µL de producto de PCR. Se llevó a Incubación 1 hora y 30 minutos a 37 °C en el termociclador. La verificación de las reacciones de restricción se efectuó en geles de agarosa al 2%, con tinción con bromuro de etidio con un marcador de peso molecular de 100 pb. La electroforesis se realizó por un período de 2 horas 15 minutos a 70 voltios y 400 amperios. Posteriormente los geles fueron dispuestos en un transiluminador Biorad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software170-8195. El análisis de las bandas obtenidas como resultado de los ensayos se realizó sobre la base de los dos patrones de restricción diferentes que poseen los distintos grupos de *B. cinerea* según Fournier, 2002:

- a. Grupo I *B. pseudocinerea*: cinco bandas de peso 601, 287, 155, 119, 84 y 9 pb.
- b. Grupo II *B. cinerea*: seis bandas de tamaño 517, 287, 155, 119, 84 y 9pb.

2.4.3.3 Correspondencia genotípica de aislamientos de *B. cinerea*

Por medio de la técnica de PCR se amplificaron los transposones Boty y Flipper. Se utilizaron los primers: F14 5'GCACAAAACCTACAGAAGA3' Y F304 5'ATTCGTTTCTTGACTGTA3' para el transposón Flipper y los primers LTR98 5'AGGCTGTAGAATCACCAACG3' y LTR728 5'CGGTATTTCTGGTTGGCA3' para

Boty; los que amplifican los productos de 648 pb y de 1250 pb (transposones Boty y Flipper, respectivamente).

Para diluir los los primers F14, F304, LTR98 y LTR728 estos se centrifugaron por dos minutos y se preparó con agua ultrapura una dilución de 100 mM. Se dejaron resuspendidos a 4 °C por una hora y se preparó una dilución a 10 mM, se alicuotaron y se almacenaron a -20 °C.

El ensayo de PCR simple se realizó en un volumen total de 20 uL para cada pareja de primers: conteniendo 2 µL de buffer 10X marca Invitrogen, 1,2 µL MgCl₂ 3mM, 0,8 µL mix DNTP marca Invitrogen, 13,9 µL agua ultra pura, 0,3 µL Taq polimerasa marca Invitrogen, 1 µL DNA y 0,4 µL Primer F14, 0,8µL Primer F304 o 0,4 µL Primer LTR 98, 0,8 µL Primer LTR728. Las condiciones de amplificación por PCR se presentan en la tabla1.

Tabla 1. Condiciones de amplificación por PCR de los primers Boty y Flipper de *Botrytis cinerea* (Fournier, 2002).

Número de ciclos	Reacción	Temperatura (°C)	Período de tiempo
4	Denaturación	95	3 min
	Hibridación	60	1 min
	Elongación	72	2 min
35	Denaturación	94	1 min
	Hibridación	60	1 min
	Elongación	72	1 min 30 seg
1	Incubación final	72	5 min

La verificación de las reacciones de amplificación de los productos de 648 pb y de 1250 pb (transposones Boty y Flipper, respectivamente) se efectuó en geles de agarosa al 2% con tinción con bromuro de etidio, utilizándose como carga 20 µL de cada mezcla de reacción amplificada más 4 µL de buffer de carga 6×, considerándose un marcador de peso molecular de 100 pb. La electroforesis se realizó por un período de 2 horas 15 minutos a 70 voltios y 400 amperios. Posteriormente los geles fueron dispuestos en un transiluminador Biorad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software170-8195.

El análisis de las bandas obtenidas como resultado de los ensayos se realizó sobre la presencia de las bandas correspondientes a la ausencia y/o presencia de uno o los productos de 648 pb transposón Boty y 1250 pb transposón Flipper que poseen los distintos genotipos de *B. cinerea*:

<i>transposa</i> (Flipper+/Boty+)	2 bandas 1250pb y 648pb
<i>vacuma</i> (Flipper-/Boty-)	Ninguna banda, ni en 1250pb ni 648pb
<i>boty</i> (Flipper-/Boty+)	No banda en 1250pb, 1 banda en 648pb
<i>flipper</i> (Flipper+/Boty-)	1 banda en 1250pb no banda en 648 pb

2.4.3.4 Análisis de secuencia de los transposones Boty y Flipper

Este procedimiento se realizó para validar las secuencias de los nucleótidos de las bandas amplificadas correspondientes a los transposones Boty y Flipper. Se tomaron al azar tres aislamientos positivos para el transposón Boty y tres aislamientos positivos para el transposón Flipper. Siguiendo el protocolo descrito anteriormente por medio de la técnica de PCR se amplificaron los transposones Boty y Flipper. Se corrió un gel de agarosa al 10% con tinción con bromuro de etidio, con un volumen de muestra de 20 µL. Posterior a la amplificación de las bandas definidas para cada uno de los aislamientos se realizó la purificación de bandas amplificadas siguiendo el protocolo del kit Invitrogen PureLink Quick Gel Extraction Kit Cat # K2100. Para validar la purificación de las bandas se corrió un gel de agarosa al 10%. Las bandas purificadas fueron enviadas a la empresa de secuenciación Macrogen. La edición de las secuencias se realizó con el programa Geneious R6.0.6.

2.4.3.5 Análisis estadístico de datos caracterización genética

Se realizó un análisis para cada genotipo determinándose el grado de relación entre los factores genotipo-finca y genotipo-tipo de tejido.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la caracterización genética de los aislamientos de *B. cinerea* se efectuó con análisis de regresión logística y método de selección de parámetros Stepwise para cada genotipo determinándose el grado de relación entre los factores genotipo-finca y genotipo-

tipo de tejido. La información se digitalizó en tablas de Excel para procesarla para análisis estadístico en el programa SAS.

Se generaron gráficos de acuerdo a las necesidades y se establecieron correlaciones con las variables definidas.

2.4.4 Análisis estadístico de datos para establecer correlación entre características fenotípicas y genéticas:

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se aplicó el análisis Discriminante el cual se utiliza frecuentemente para un conjunto de observaciones que contienen una o más variables cuantitativas y una clasificación de grupos que definen variables de observaciones. El procedimiento desarrolla un criterio discriminante para clasificar cada observación en uno de los grupos. Para este estudio los grupos de clasificación correspondieron con la caracterización genotípica de los aislamientos en sus cuatro variantes y las observaciones a discriminar correspondieron con las características morfológicas evaluadas sobre los mismos.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterización fenotípica

3.1.1 Caracterización morfológica

3.1.1.1 Formación de grupos – clústeres

Esta caracterización se realizó basada en las clases morfológicas arbitrariamente establecidas en este estudio, considerando los criterios de Martinez *et al* (2003).

De acuerdo con el análisis estadístico de técnicas de agrupación multivariada mediante el algoritmo propuesto por Gower en el cual se busca la identificación del número de grupos óptimos que retiene la mayor cantidad de variación, se identificaron 6 clústeres en los que agruparon los 270 aislamientos de *B.cinerea*

de rosa en seis fincas en la Sabana de Bogotá. Para cada uno de los clúster (Figura 10) se evaluó la frecuencia de las 11 variables que componen la caracterización morfológica descrita anteriormente.

Para la variable tipo de micelio

MI (micelio corto). Fue el menos frecuente representando solo el 4,44% de todos los aislamientos. MI no se presentó en los clúster 2 y 6. Para el resto de clústeres los valores fueron similares entre 2 y 4 aislamientos que lo presentaron.

MII (micelio suelto). Estuvo presente en el 9,66% de los aislamientos. El clúster con mayor presencia de aislamientos con MII fue el 3 el cual presentó el 14,9% de las muestras de este clúster y representa el 40,74% del total de los aislamientos.

MIII (micelio con crecimiento en masa). Estuvo presente en el 47,04% de los aislamientos. En proporciones similares para los seis clústeres que variaron entre el 43% y el 51% para cada clúster.

MIV (micelio grueso y lanudo) estuvo presente en el 38,9% de los aislamientos. Los clúster 1 y 3 presentaron esta característica en el 32,9% y el 26,7% de sus aislamientos. Los más bajos porcentajes los obtuvieron los clústeres 2 y 6 con el 8,6% y el 5,7% respectivamente.

Para la variable distribución de esclerocios

S0 (no formación de esclerocios). Estuvo presente en el 66,7% de los aislamientos en porcentajes similares para todos los clústeres, entre el 50% y 76%.

S1 (esclerocios formados en el borde de la caja de Petri). Fue el menos frecuente de los tipos de distribución, solo se halló en 1 aislamiento que representa el 0,4% de los aislamientos y estuvo en el clúster 4.

S2 (esclerocios grandes formados en forma radial). Estuvieron presentes en el 7% de los aislamientos. Los clústeres 2 y el 6 presentaron porcentajes de este tipo de distribución en 16,7% y 12,5% de sus aislamientos respectivamente. Los demás clústeres oscilaron entre el 3% y 10% de los aislamientos.

S3 (esclerocios grandes y de formación irregular). Estuvieron presentes en el 7,4% de los aislamientos siendo el clúster 2 el de mayor incidencia de esta característica con el 33,3% de sus aislamientos. Los demás clústeres presentaron porcentajes de esta característica oscilando entre el 3 y 7%.

S4 (esclerocios pequeños e irregulares). Estuvo presente en el 18,5% de los aislamientos. Se destaca el clúster 2 que no presentó este tipo de característica y los clústeres 1 y 5 presentaron porcentajes del 25% y 29% respectivamente.

Para la variable capacidad formadora de esclerocios

Considerando 1 como el mayor valor, el clúster 2 obtuvo el mayor valor de capacidad formadora de esclerocios con un 0,85. Seguido por el clúster 6, 5 y 1 (0,75, 0,73 y 0,72 respectivamente). Los de menor capacidad formadora de esclerocios fueron los clúster 3 y 4 (0,52 para ambos).

Para la variable nivel de esporulación

Teniendo en cuenta 3 como el mayor valor, el nivel más alto promedio de esporulación fue conseguido por los aislamientos del clúster 2 con 2,06. Seguidos de los de los clústeres 1, 5 y 6 con 1,9, 2,0 y 1,9 respectivamente. Los clústeres 3 y 4 presentaron los más bajos niveles de esporulación con promedios de 1,8 y 1,7 respectivamente.

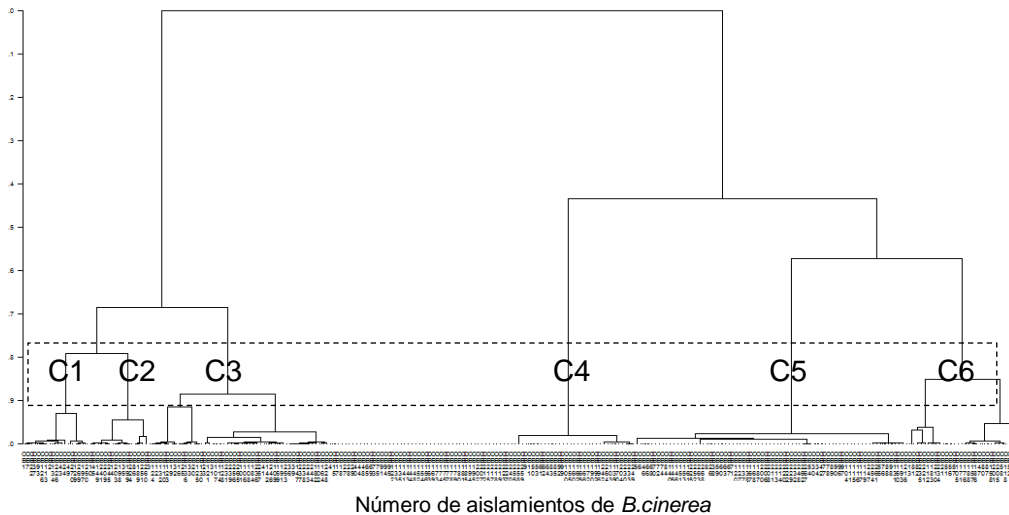


Figura 6. Clústeres de agrupación (C1: clúster 1, C2: clúster 2, C3: clúster 3, C4: clúster 4, C5: clúster 5 y C6: clúster 6) de las características morfológicas de 270 aislamientos de *B. cinerea* de rosa de 6 fincas de la Sabana de Bogotá.

3.1.1.2 Clasificación de aislamientos como miceliar/esclerocial

La clasificación morfológica del tipo de colonia se realizó teniendo en cuenta el tipo de micelio y la capacidad formadora de esclerocios que presentaron los aislamientos. Si el aislamiento presenta una ausencia o baja formación de

esclerocios (S0 a S3) se caracterizó como colonia miceliar (M) y colonias con muchos esclerocios (S4) se caracterizaron como esclerociales (S). En este estudio bajo las condiciones experimentales que se presentaron, la mayoría fueron colonias miceliar con un 84% independientemente del tipo de tejido y la finca de donde fueron aisladas. El restante 16% correspondió a colonias esclerociales.

3.1.1.3 Tipo de micelio:

Los tipos de micelio que más se presentaron en los aislamientos de *B. cinerea* fueron MIII crecimiento en masa y MIV micelio grueso y lanudo con un promedio de 46% y 40% respectivamente. Seguido por los de tipo MII micelio suelto con el 10% y MI micelio corto con el 4%.

Relación de tipo de micelio según tipo de tejido

En el análisis de regresión logística de tipo de micelio y tipo de tejido no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). En los tres tipos de tejidos (hojarasca, tallo y flor) de donde se realizaron los aislamientos el mayor porcentaje se presentó en aislamientos con el micelio tipo MIII (50%, 42% y 42%) respectivamente, seguido por los de micelio tipo MIV con (39%, 43% y 43%). En menor frecuencia los aislamientos con el tipo micelio MII (9%, 9% y 11%) y los aislamientos con micelio tipo MI (2%, 6% y 3%) (Figura 11).

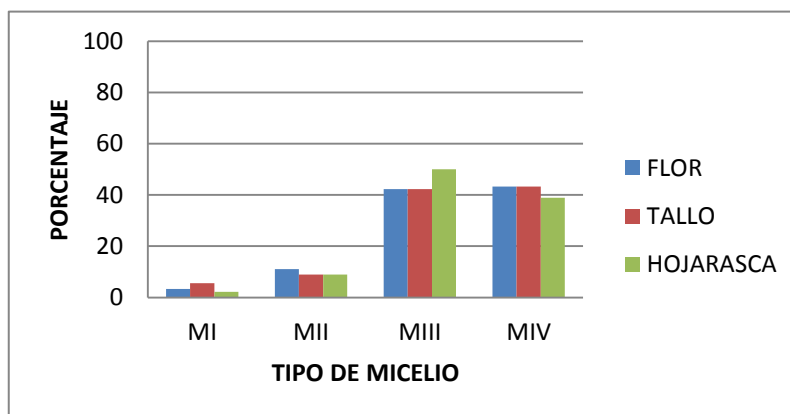


Figura 7. Porcentaje de aislamientos por tipo de tejido (flor, tallo y hojarasca) según tipo de micelio (MI: micelio corto, MII: micelio suelto, MIII: micelio crecimiento en masa y MIV: micelio grueso y lanudo) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá.

Relación de tipo de micelio según finca

Se presentaron diferencias significativas entre fincas ($p < 0,05$) para algunas de las clases de tipo de micelio.

MI (micelio corto). En este tipo de micelio no se detectaron diferencias significativas entre fincas. No se identificaron predictores que afectaran la probabilidad de ocurrencia de este tipo de micelio, es decir, este tipo de micelio tiene un comportamiento aleatorio con relación a las variable medida (MI).

MII (micelio suelto). En la finca VL este tipo de micelio tuvo un ODDS ratio (forma de expresar la proporción de veces que un suceso ocurra frente a que no ocurra) de 3,8. Un OR = 3,8 debemos leerlo como 3,8:1 lo que significa que en VL la presencia del micelio MII es 3,8 veces mayor que en las otras fincas evaluadas. En la finca MO el ODDS ratio fue de 2,83 respecto a las otras cuatro fincas muestreadas. Para las otras fincas el análisis no mostró significancia.

MIII (micelio con crecimiento en masa). En la finca SB el ODDS ratio fue de 2,35. Para las otras fincas el análisis no mostró significancia.

MIV (micelio grueso y lanudo). En la finca MG el ODDS ratio fue de 2,01 y en TN de 2,6. Para las otras fincas el análisis no mostró significancia (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis estadístico de tipo de micelio (MI micelio corto, MII micelio suelto, MIII micelio crecimiento en masa y MIV micelio grueso y lanudo) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá. Predictor: variable explicativa. ODDS: relación de probabilidades. LI IC ODDS: valor inferior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza. LS IC ODDS: valor superior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza

TIPO MICELIO	PREDICTOR	ODDS	LI ODDS	IC	LS ODDS	IC
MI	NS					
MII	VL	3,84	1,48		9,95	*
	MO	2,83	1,03		7,78	*
MIII	SB	2,35	1,21		4,6	*
MIV	MG	2,01	1,04		3,9	*
	TN	2,6	1,4		5,1	*

* $P < 0.05$

NS: No diferencia significativa

En las seis fincas (QA, TN, MG, VL, MO y SB) de donde se colectaron los aislamientos la mayor frecuencia de aislamientos que se presentó fue en aislamientos del tipo MIII (49%, 36% y 38%, 36%, 47% y 64% respectivamente) y los de tipo MIV (36%, 56%, 49%, 47%, 38% y 27%). En menor frecuencia los aislamientos con tipo MII (11%, 9%, 4%, 13%, 16% y 4%) y los de tipo MI (4%, 0%, 9%, 4%, 0% y 4%) (Figura 12).

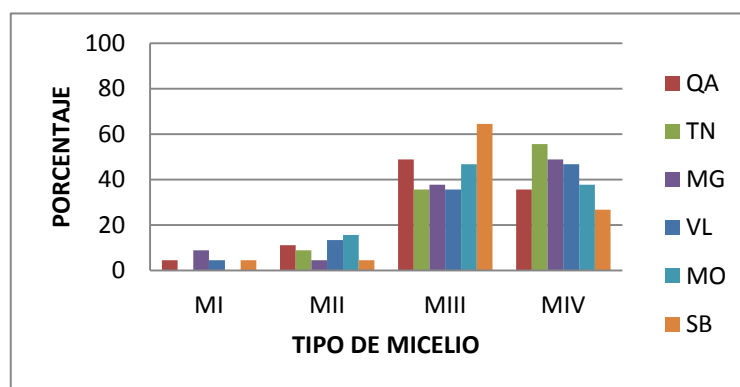


Figura 8. Porcentaje de aislamientos por finca (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) según tipo de micelio (MI: micelio corto, MII: micelio suelto, MIII: micelio crecimiento en masa y MIV: micelio grueso y lanudo) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá.

3.1.1.4 Distribución de esclerocios en caja de Petri

La distribución de esclerocios que más se presentó en los aislamientos de *B. cinerea* fue S0 ninguna formación de esclerocios con el 66%. Seguida por S4 esclerocios numerosos pequeños y con distribución irregular en la caja de Petri con el 19% y S3 esclerocios grandes e irregulares y S2 esclerocios grandes ubicados radialmente en la caja de Petri con el 7,4% y 7% respectivamente. En menor porcentaje fue el nivel S1 con esclerocios ubicados en el borde de la caja de Petri con el 0,4%.

Relación distribución de esclerocios según tipo de tejido

De acuerdo con la distribución de esclerocios, es posible señalar que no se presentaron diferencias significativas según el tipo de tejido ($p > 0,05$). En los tres tipos de tejidos (hojarasca, tallo y flor) de donde se realizaron los aislamientos la

mayor frecuencia de aislamientos que se presentó fue del tipo S0 (67%, 66% y 67% respectivamente). Seguido por los del tipo S4 con (20%, 18% y 20%) y en menor frecuencia los de tipo S2 y S3 con un promedio de 7% y S1 solo se presentó con un 1% (Figura 13).

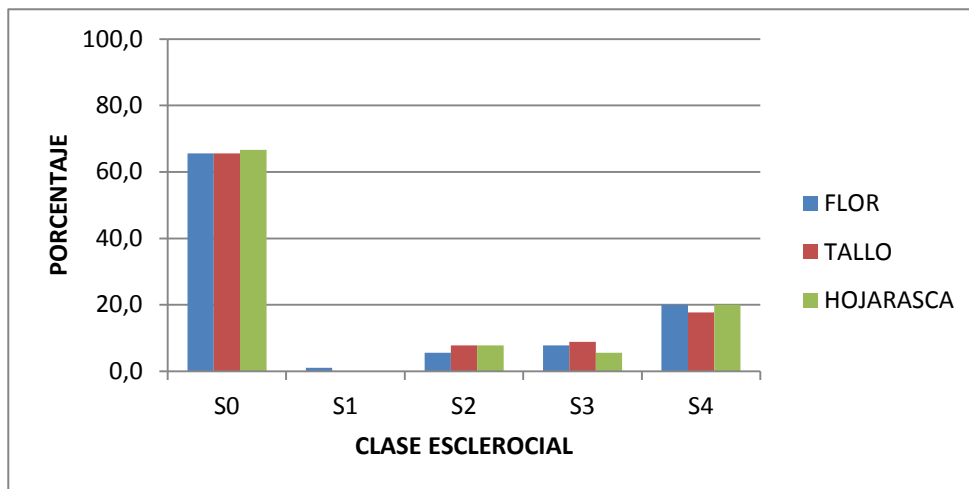


Figura 9. Porcentaje de aislamientos por tipo de tejido (flor, tallo y hojarasca) según distribución de esclerocios en el medio (S0 ninguna formación de esclerocios, S1 esclerocios en el borde de la caja de Petri, S2 esclerocios grandes y distribución radial en la caja de petri, S3 esclerocios grandes y con distribución irregular y S4 esclerocios pequeños y con distribución irregular) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá.

Relación de distribución de esclerocios según finca:

De acuerdo con la distribución de esclerocios, los resultados obtenidos evidencian diferencias significativas según la finca de donde se realizaron los aislamientos ($p < 0,05$) (Tabla 3).

Para S0 (ninguna formación de esclerocios) en la finca VL se presenta un ODD ratio de 10,1, en MO 2,4 y en TN 6,4. Para las otras fincas el análisis no mostró significancia.

S1, esclerocios formados en el borde de la caja de petri solo se presentó en un aislamiento en la finca MG. Por la poca cantidad de aislamientos en los que se presentó el análisis estadístico lo considera una variable no estimable

Los esclerocios grandes y de formación radial en la caja de Petri (S2) en la finca MO tuvieron un ODDS ratio de 3,27. Para las otras fincas el análisis no mostró significancia.

S3 (esclerocios grande e irregulares) en la finca MG tuvieron un ODDS ratio de 3,84

Los esclerocios numerosos, pequeños e irregulares (S4) se presentaron en todas las fincas en proporciones similares menos en VL.

Tabla 3. Análisis estadístico de caracterización morfológica distribución de esclerocios (S0 ninguna formación de esclerocios, S1 esclerocios en el borde de la caja de Petri, S2 esclerocios grandes y distribución radial en la caja de petri, S3 esclerocios grandes y con distribución irregular y S4 esclerocios pequeños y con distribución irregular) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá. Predictor: variable explicativa. ODDS: relación de probabilidades. LI IC ODDS: valor inferior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza. LS IC ODDS: valor superior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza.

TIPO ESCLEROCIOS	PREDICTOR	ODDS	LI ODDS	IC	LS ODDS	IC
S0	VL	10,1	3,4		29,8	*
	MO	2,43	1,17		5,02	*
	TN	6,4	2,5		16,1	*
S1	NO ESTIMABLE					
S2	MO	3,3	1,2		8,8	*
S3	MG	3,84	1,5		10,03	*
S4	NO ESTIMABLE					

* P<0.05

En las seis fincas (QA, TN, MG, VL, MO y SB) de donde se realizaron los aislamientos la mayor frecuencia de aislamientos que se presentó fue los de tipo S0 (53%, 87%, 47%, 91%, 71% y 49% respectivamente). En menor frecuencia los de tipo S4 (36%, 11%, 27%, 0%, 11% y 31%). Seguidos por los de tipo S3 (11%, 0%, 18%, 4%, 2% y 9%) y los de tipo S2 (0%, 2%, 9%, 4%, 16% y 11%). Los de tipo S1 se presentaron con un 2% solo en la finca MG (Figura 14).

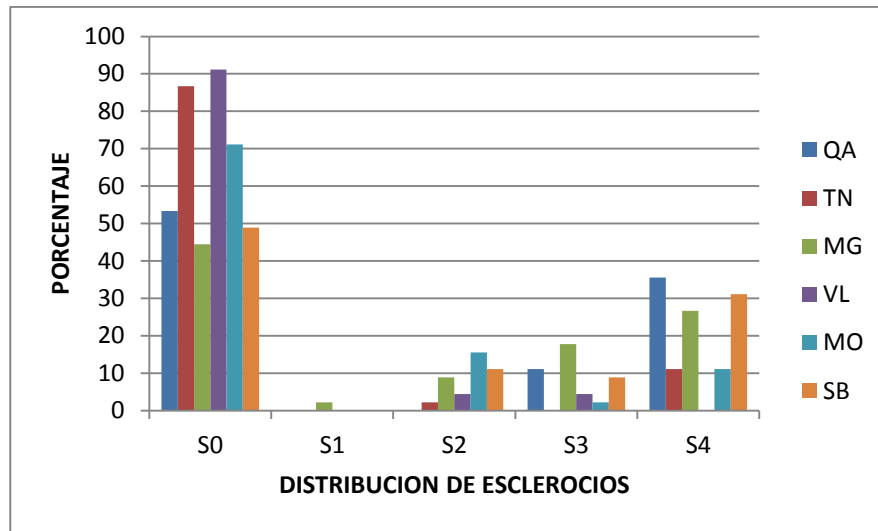


Figura 10. Porcentaje de aislamientos r según distribución de esclerocios en el medio (S0 ninguna formación de esclerocios, S1 esclerocios en el borde de la caja de Petri, S2 esclerocios grandes y distribución radial en la caja de petri, S3 esclerocios grandes y con distribución irregular y S4 esclerocios pequeños y con distribución irregular) por origen de los aislamientos (flor, tallo y hojarasca) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá

3.1.1.5 Capacidad formadora de esclerocios:

El mayor número de aislamientos se presentó en el tipo CFE0 ninguna capacidad formadora de esclerocios 179 aislamientos. El tipo CFE1 y CFE3 presentaron 40 y 34 aislamientos respectivamente. La menor cantidad de aislamientos se presentó en la CFE2 con 17 aislamientos.

Relación capacidad formadora de esclerocios según tipo de tejido

No se presentaron diferencias significativas según el tipo de tejido ($p > 0,05$) según la capacidad formadora de esclerocios de los aislamientos. En los tres tipos de tejido (hojarasca, tallo y flor) de donde se realizaron los aislamientos la mayor frecuencia de aislamientos que se presentó correspondió al tipo CFO con 60,59 y 60 respectivamente. Los de tipo CF1 con 12, 14 y 14 aislamientos, los de tipo CF3 con 15, 7 y 12 aislamientos y los de tipo CF2 con 3, 10 y 4 aislamientos se presentaron en una baja frecuencia (Figura 15).

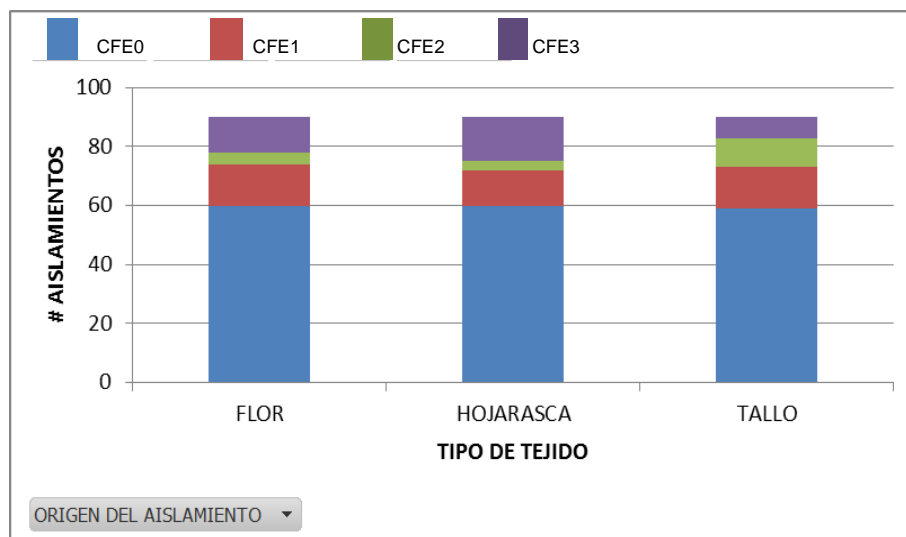


Figura 15. Caracterización morfológica según tipo de esporulación (CFO ausencia de esclerocios, CF1 escasa producción de esclerocios, CF2 moderada producción de esclerocios y CF3 alta producción de esclerocios) por tipo de tejido (flor, tallo y hojarasca) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá.

Capacidad formadora de esclerocios según finca

La capacidad formadora de esclerocios con respecto a la finca de donde se realizaron los aislamientos, mostró diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la finca VL se reduce la capacidad formadora de esclerocios en 0,96 unidades, en MO se reduce en 0,6 unidades y en TN se reduce en 0,8 unidades (Tabla 4, Figura 16).

Tabla 4. Análisis estadístico de la capacidad formadora de esclerocios (CFO ausencia de esclerocios, CF1 escasa producción de esclerocios, CF2 moderada producción de esclerocios y CF3 alta producción de esclerocios) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa de seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá.

NIVEL ESCLEROCIOS	PARAMETRO ESTIMADO	VALOR F	Pr >F
VL	-0,96	32,4	< 0,001
MO	-0,6	12,8	< 0,001
TN	-0,8	21,4	< 0,001

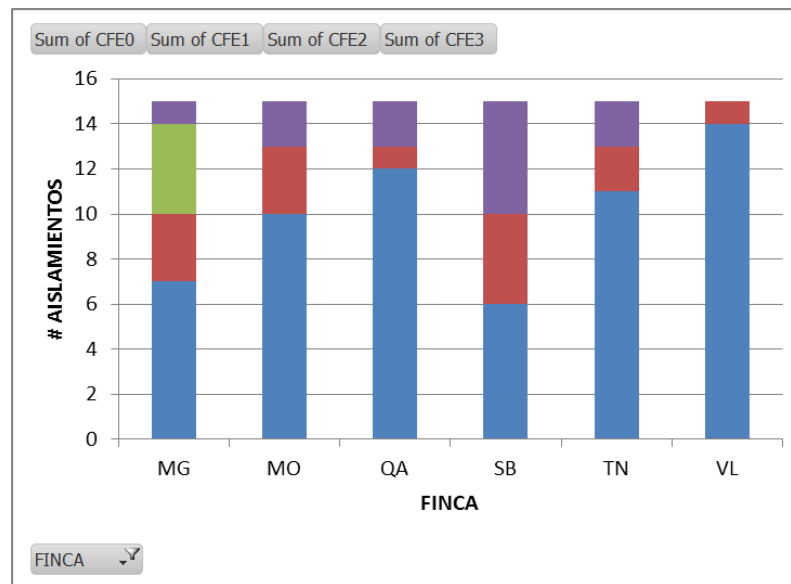


Figura 16. Capacidad formadora de (CFO ausencia de esclerocios, CF1 escasa producción de esclerocios, CF2 moderada producción de esclerocios y CF3 alta producción de esclerocios) por finca de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa de seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá.

3.1.1.6 Nivel de esporulación

El mayor número de aislamientos presentaron esporulación tipo E3: esporulación profusa y abundante (más del 50% de la caja de Petri) (95 aislamientos) y tipo E2 esporulación débil (del 10-50% de la caja de Petri) (87 aislamientos). Seguido por esporulación tipo E1 esporulación escasa (del 1 al 10% de la caja de Petri) y E0 ausencia de esporulación (0%) con 49 y 39 aislamientos respectivamente.

Relación nivel de esporulación según tipo de tejido

En la caracterización morfológica según nivel de esporulación no se presentaron diferencias significativas según el tipo de tejido del cual fue aislado ($p > 0,05$). En los tres tipos de tejidos (hojarasca, tallo y flor) de donde se realizaron los aislamientos el mayor número de aislamientos que se presentó correspondió al tipo E3 (32, 32 y 31 aislamientos respectivamente). Muy seguido por los de tipo E2 con 30, 27 y 30 aislamientos respectivamente. En menor frecuencia los de tipo

E1 (18, 17 y 14 aislamientos respectivamente) y por último los del tipo E0 ausencia de esporulación (10, 14 y 15 aislamientos respectivamente) (Figura 17).

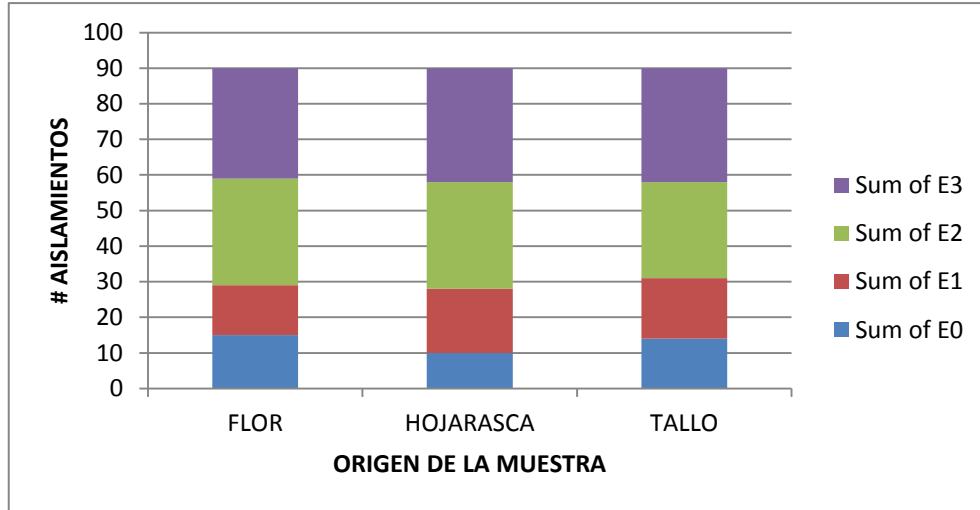


Figura 17. Número de aislamientos según el nivel de esporulación (E0: ausencia de esporulación 0%, E1 esporulación escasa 1 al 10% de la caja de Petri, E2 esporulación débil 10-50% de la caja de Petri y E3 esporulación profusa y abundante más del 50% de la caja de Petri) por tipo de tejido (flor, tallo y hojarasca) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá.

Relación nivel de esporulación según finca

En la caracterización morfológica según nivel de esporulación se presentaron diferencias significativas según la finca de donde se realizaron los aislamientos ($p < 0,05$).

En la finca QA y TN se reduce la esporulación de los aislamientos en 0,42 y 0,41 unidades (Tabla 4). Para las otras fincas los niveles de esporulación son similares (Tabla 5, Figura 18).

Tabla 5. Análisis estadístico del tipo de esporulación ((E0: ausencia de esporulación 0%, E1 esporulación escasa 1 al 10% de la caja de Petri, E2 esporulación débil 10-50% de la caja de Petri y E3 esporulación profusa y abundante más del 50% de la caja de Petri)) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa de seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá.

NIVEL ESPORULACION	PARAMETRO ESTIMADO	VALOR F	Pr >F
QA	-0,42	5,96	0,015
TN	-0,41	5,85	0,016

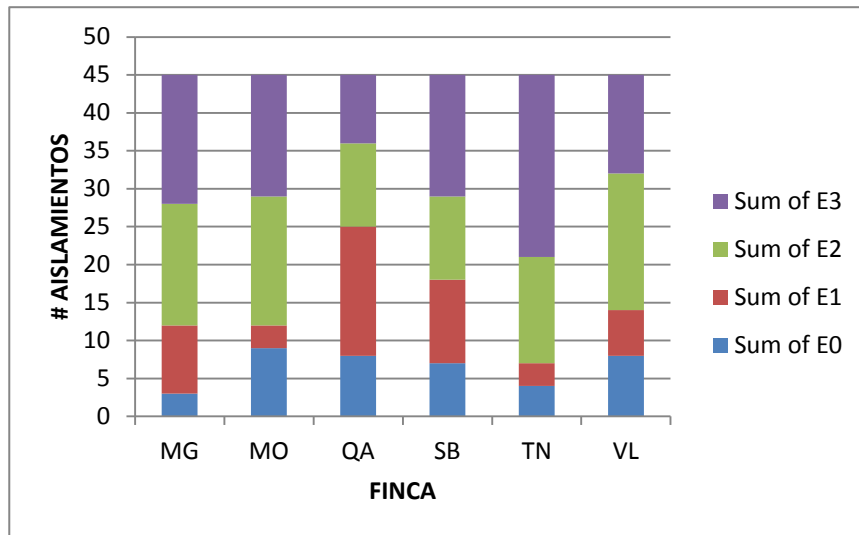


Figura 18. Tipo de esporulación (E0: ausencia de esporulación 0%, E1 esporulación escasa 1 al 10% de la caja de Petri, E2 esporulación débil 10-50% de la caja de Petri y E3 esporulación profusa y abundante más del 50% de la caja de Petri)) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa de seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá

3.1.2 Virulencia

Se presentó una alta virulencia en todos los aislamientos de *B. cinerea* analizado, independientemente de su origen (tejido) y procedencia (finca). Un promedio del 94% de área del pétalo fue afectada (Tabla 10).

Para el caso de *B. cinerea* aislada de rosas no se detectaron diferencias significativas en la virulencia que presentan las cepas miceliares (93,6% promedio) de la esclerociales (94% promedio) ($p > 0,05$) (Figura 19).

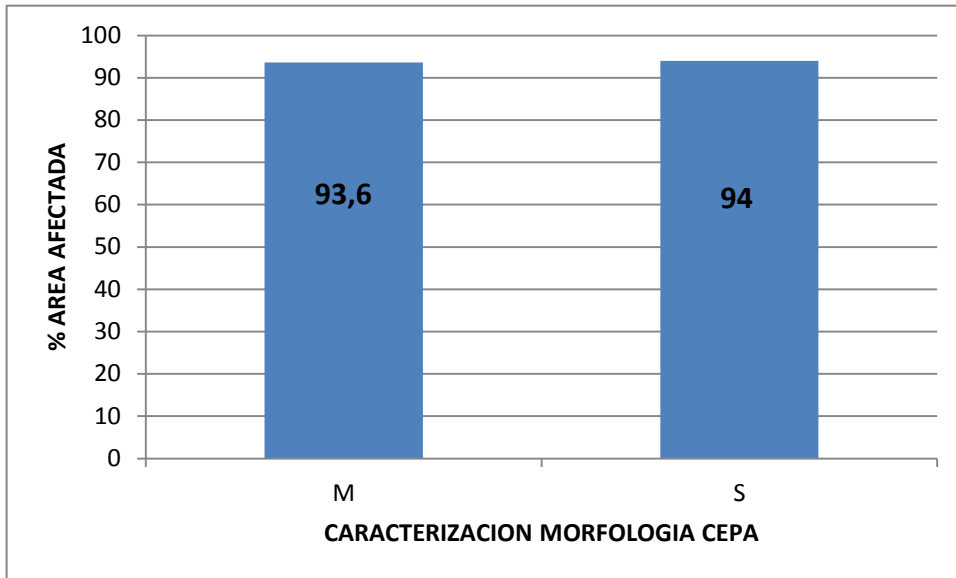


Figura 11 .Porcentaje de área afectada (virulencia) de 270 aislamientos de *B. cinerea* de rosa de seis fincas productoras de Sabana de Bogotá según el tipo de morfología de colonia. S: colonia tipo esclerocial. M: colonia tipo miceliar.

Virulencia según origen de los aislamientos

Teniendo en cuenta el tipo de tejido asociado con la planta se evidencia que se presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). De acuerdo con el análisis estadístico, se evidencia que los aislamientos de *B. cinerea* provenientes de flor y hojarasca presentan la misma virulencia, mientras que los provenientes de tallo presentan valores más altos con una relación de ODDS de 1,36. Significando que los aislamientos de tallo son 1,36 veces más virulentos que los aislamientos provenientes de flor y hojarasca (Tabla 6, Figura 20).

Tabla 4. Análisis estadístico de la virulencia por tipo de tejido (flor, tallo y hojarasca) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas de la Sabana de Bogotá. Predictor: variable explicativa. ODDS: relación de probabilidades. LI IC ODDS: valor inferior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza. LS IC ODDS: valor superior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza

TIPO DE TEJIDO	ODDS	LI IC ODDS	LS IC ODDS
FLOR	NS		
TALLO	1,36	1,229	1,506
HOJARASCA	NS		

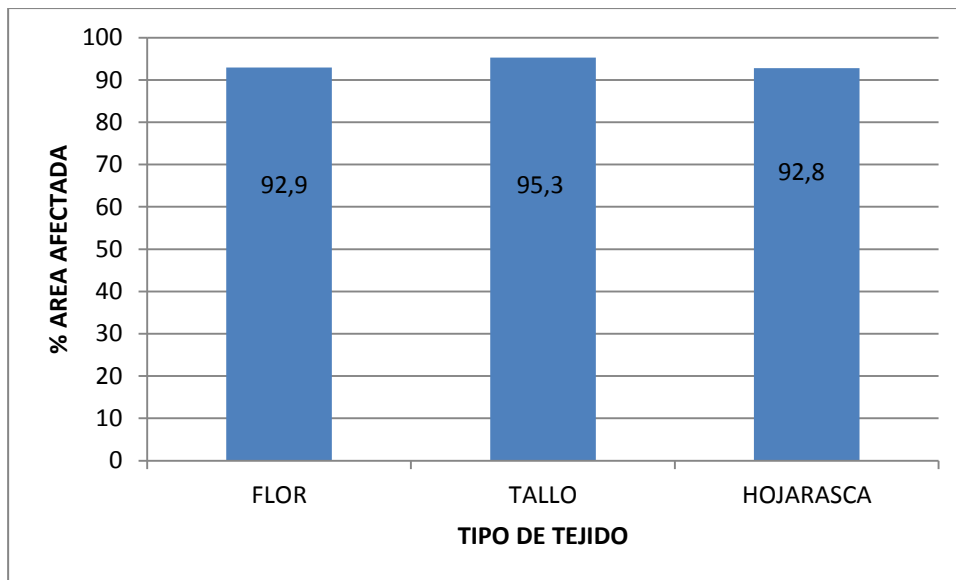


Figura 12. Porcentaje de área afectada (virulencia) por tipo de tejido (hojarasca, tallo y flor) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa de seis fincas de la Sabana de Bogotá

Virulencia según finca

Analizando la virulencia según la finca de donde se realizaron los aislamientos, se evidencia que se presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la finca MG la relación de ODDS es de -0.4, en SB de -0.73, en QA -0.8 y en TN de -0.6. Lo que implica que la virulencia de los aislamientos de provenientes de estas fincas es menor con respecto a las otras fincas (Tabla 7, Figura 21).

Tabla 5. Análisis estadístico de virulencia por tipo de tejido de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá. Predictor: variable explicativa. ODDS: relación de probabilidades. LI IC ODDS: valor inferior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza. LS IC ODDS: valor superior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza

FINCA	ODDS	LI IC ODDS	LS IC ODDS
QA	-0,77	0,663	0,894
TN	-0,624	0,541	0,719
MG	-0,395	0,347	0,449
VL	NS		
MO	NS		
SB	-0,725	0,626	0,839

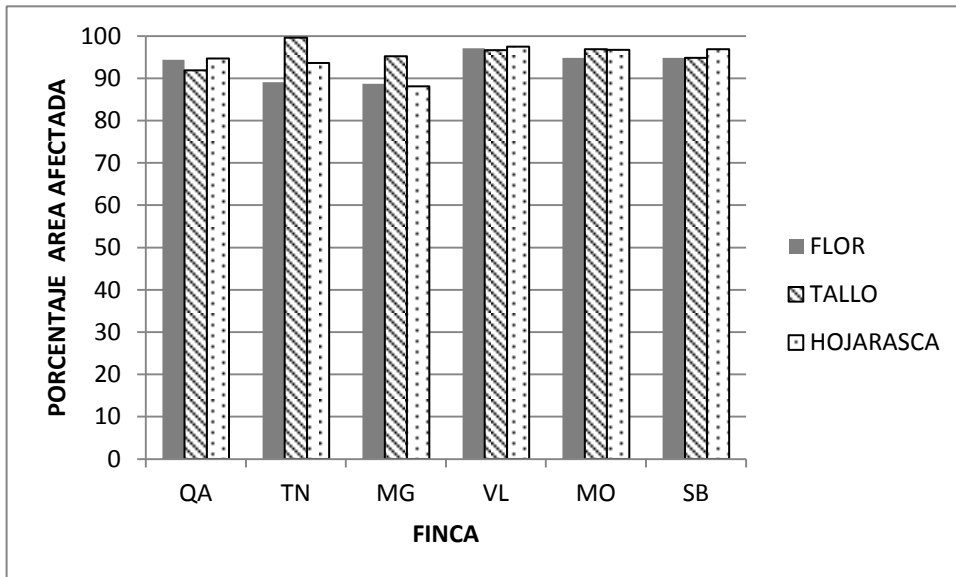


Figura 13. Virulencia (porcentaje de área afectada) por finca de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa de seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá

3.2 Determinación genética:

Para todos los aislamientos se obtuvo ADN de buena calidad y las amplificaciones por PCR y digestión enzimática fue óptima para identificar claramente las bandas correspondientes a la prueba.

3.2.1 Determinación de Grupo de *Botrytis*

En todos los aislamientos se detectó la presencia del gen *Bc-hch*. En la figura se observa el resultado de la amplificación parcial de gen *Bc-hch* correspondiente a 1171 pb de 15 de los 270 aislamientos (Figura 22).



Figura 14. Amplificado del fragmento parcial del gen *Bc-hch* correspondiente a 1171 pb. L: Ladder, escala 100 pb. C-: control negativo. Muestras 1 a 15: aislamientos de *Botrytis* sp. de rosa.

Posterior a la amplificación del fragmento parcial del gen *Bc-hch*, se procedió a realizar la digestión con la enzima *HhaI* para así determinar la correspondencia de grupo de *Botrytis* sp., para todos los aislamientos se evidenció una banda de 517, correspondiente al Grupo II (*Botrytis cinerea* sensu stricto) (Figura 23).

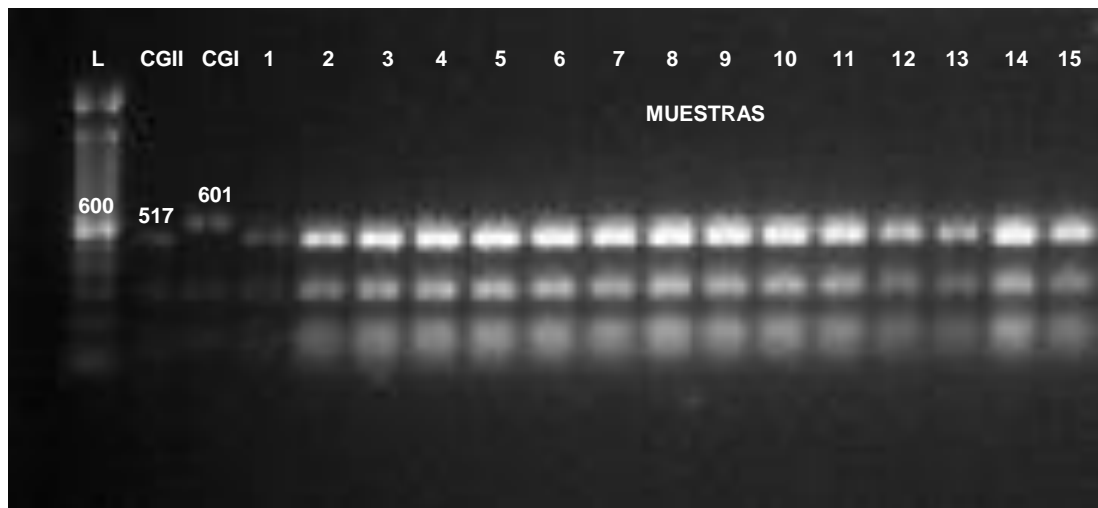


Figura 15. Resultado de la digestión con la enzima *HhaI* del fragmento parcial de 1171 pb del gen *Bc-hch* de *B. cinerea*. L: Ladder, escala 100 pb. C-: control negativo. CGII: control positivo, aislamiento chileno de *B. cinerea* para Grupo II. CGI: control positivo, aislamiento francés (INRA – Versailles) de *B. cinerea* para Grupo I. Muestras 1 a 15 aislamientos de *Botrytis* sp. colombianos de rosa.

3.2.2 Determinación de genotipos de *Botrytis cinerea*

En los 270 aislamientos analizados, el genotipo de mayor prevalencia fue *transposa* (T) con un promedio 58%, seguido en proporción por *boty* (B) con un promedio 31% y en una menor proporción aislados del tipo *vacuma* (V) y del tipo *flipper* (F) con un promedio 6 y 5% respectivamente.

En la figura 24 se evidencia en los aislamientos 1 a 11 la amplificación de una banda de 1250 pb correspondiente al transposón Flipper, excepto en la muestra 7, en donde no se generó la amplificación de la banda.

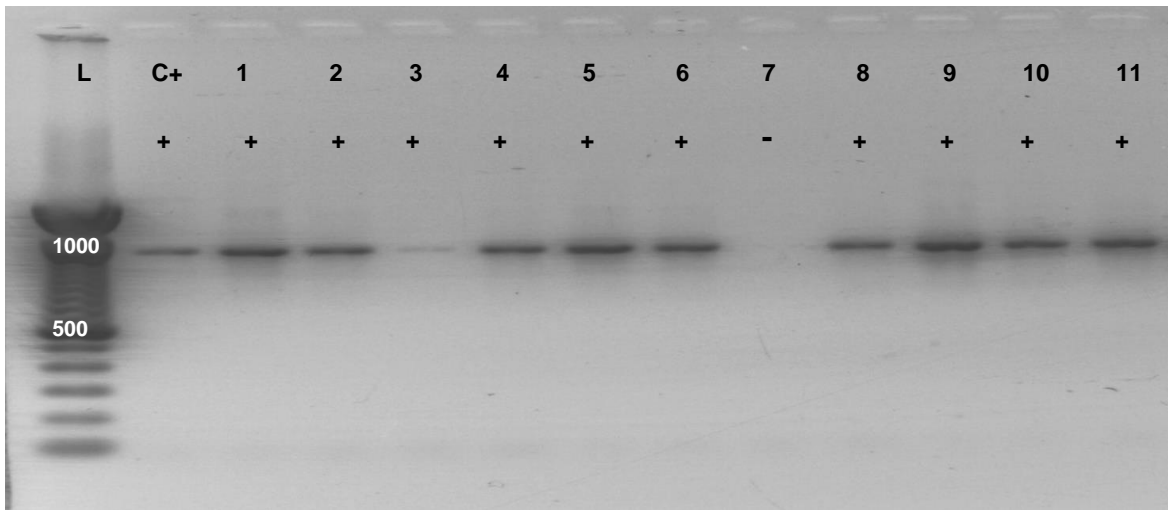


Figura 16. Amplificación del fragmento del transposón Flipper correspondiente a 1250 pb. C+: control positivo (aislamiento chileno positivo al transposón Flipper). Carriles 1 a 11: aislamientos colombianos de *Botrytis cinerea* de rosa. L: Ladder, escala 100 pb.

En la figura 25 se evidencia la amplificación de una banda de 648 pb correspondiente al transposón Boty, excepto en los carriles 7 y 10, en donde no se generó la amplificación de la banda.

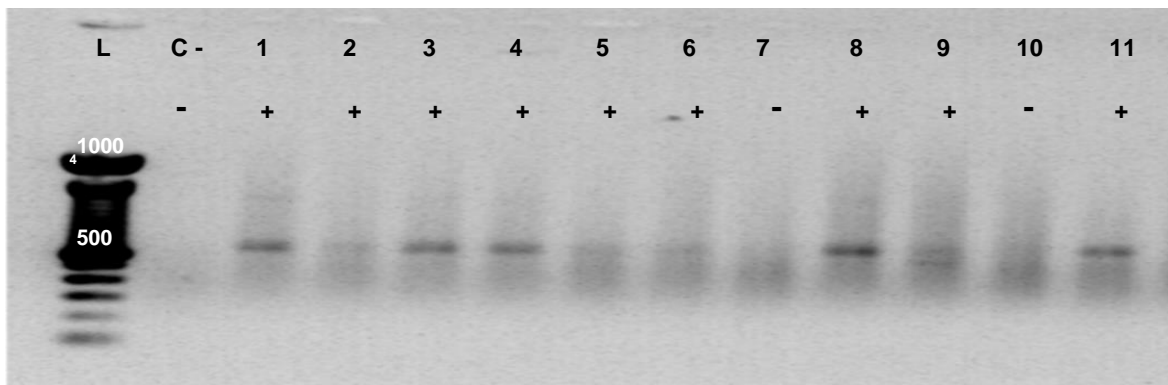


Figura 17. Amplificación del fragmento del transposón Boty correspondiente a 648 pb. C-: control negativo (agua). Carriles 1 a 11: aislamientos colombianos de *Botrytis cinerea* de rosa. L: Ladder, escala 100 pb.

La determinación de genotipo se definió basada en la presencia/ausencia de las bandas:

<i>transposa</i> (Flipper+ / Boty+)	1 banda de 1250 pb y 1 de 648 pb
<i>vacuma</i> (Flipper- / Boty-)	ninguna banda
<i>boty</i> (Flipper- / Boty+)	1 banda de 1250 pb
<i>flipper</i> (Flipper+ / Boty-)	1 banda de 648 pb

Por ejemplo, como se observa en las figuras anteriores, el aislamiento 1 que amplificó la banda de 1250 pb y la banda de 648 pb corresponde al genotipo *transposa*. El aislamiento 7 que no amplificó la banda de 1250 pb ni la banda de 648 pb corresponde al genotipo *vacuma*. El aislamiento 10 que amplificó la banda de 1250 pb y no amplificó la banda de 648 pb corresponde al genotipo *flipper*.

Esta asociación se realizó para cada uno de los 270 aislamientos de *B.cinerea* de rosa aislados de seis fincas productoras de la Sabana de Bogotá asignándoles a cada uno de ellos un genotipo (*transposa*, *boty*, *flipper* o *vacuma*) con base en las bandas amplificadas.

Según los resultados del análisis estadístico Stepwise no se encontró ninguna asociación entre los genotipos y la clase localidad. Sin embargo, si se encontró para Finca y Tipo de tejido; por lo que en la relación de resultados subsiguiente, solo se detallará para estos dos últimos.

Genotipo según Tipo de tejido

Según los resultados del análisis de frecuencia se encontró que en general para todos los tipos de tejidos (flor, tallo y hojarasca) el genotipo de mayor prevalencia fue *transposa* (T) con un 54%, 63% y 59% respectivamente. Seguido en proporción por *boty* (B) con 38%, 26% y 31%. Detectándose también pero en una menor proporción aislados del tipo *vacuma* (V) con 4%, 4% y 6% y el tipo *flipper* (F) con 3%, 7% y 4% en flor, tallo y hojarasca.

Con el análisis estadístico de Regresión Logística y método de selección de parámetros Stepwise se evaluó simultáneamente los factores Localidad, Tipo de tejido y Finca. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la relación de los factores Genotipo por Tipo de tejido. Es decir, la presencia de

cada genotipo es la misma en todos los tipos de tejido de donde se realizaron los aislamientos (Figura 26).

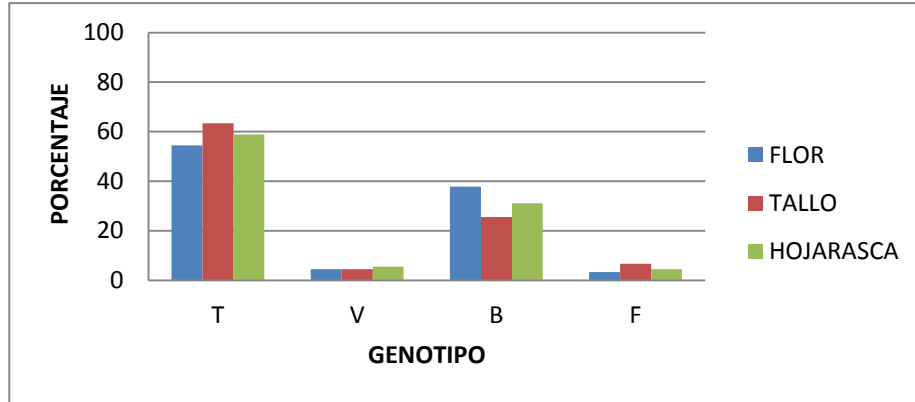


Figura 18. Correspondencia genotípica (*transposa* (T), *vacuma* (V), *Boty* (B) y *flipper* (F)) de 270 aislamientos de *B. cinerea* obtenidos a partir tres tipos de tejido: flor, tallo y hojarasca de seis fincas de rosa cv Tressor2000 localizadas en la Sabana de Bogotá.

Genotipo según Finca

El genotipo *flipper* no fue encontrado en las fincas MO y SB. En VL no hubo presencia del genotipo *vacuma* (Figura 27).

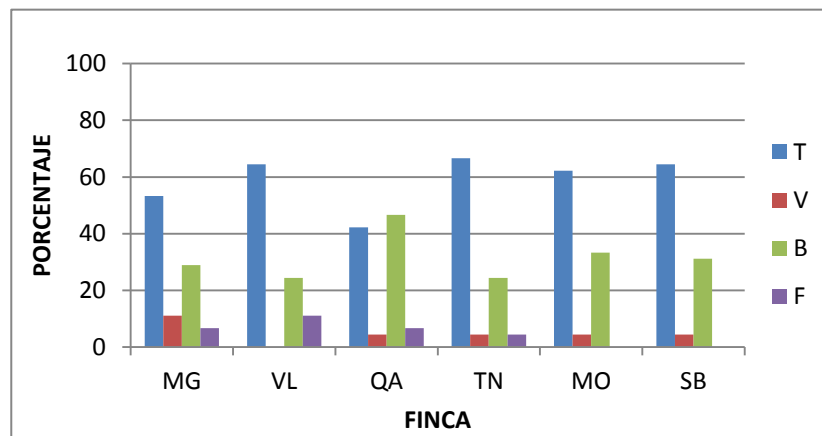


Figura 19. Resultados de la correspondencia genotípica (*transposa*, *vacuma*, *boty* y *flipper*) por finca de los 270 aislamientos de *B. cinerea* recuperados a partir de los 3 tipos de tejido de rosa cv Tressor2000 en seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá.

De acuerdo con el análisis estadístico Regresión Logística y método de selección Stepwise se analiza la probabilidad de encontrar un evento (en este caso la probabilidad de presencia de un genotipo). Teniendo en cuenta todas las variables analizadas; se determinó que la única variable que tiene una diferencia significativa es la variable Finca (Tabla 8).

Tabla 6. Análisis estadístico de caracterización genotipos (*transposa*, *boty*, *flipper* y *vacuma*) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá. Predictor: variable explicativa. ODDS: relación de probabilidades. LI IC ODDS: valor inferior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza. LS IC ODDS: valor superior del intervalo de confianza de la razón de odds al 95% de confianza

GENOTIPO	PREDICTOR	ODDS	LI IC ODDS	LS IC ODDS	
<i>boty</i>	FINCA QA	2,201	1,145	4,231	*
<i>transposa</i>	FINCA QA	0,444	0,232	0,850	*
<i>vacuma</i>	FINCA MG	3,391	1,055	10,893	*
<i>flipper</i>	NS				

* P<0.05

Dada que la presencia de aislamientos del genotipo *flipper* fue baja, el análisis estadístico determina que se puede presentar indistintamente en cualquiera de las fincas. No se encontraron factores de asociación.

La mayor probabilidad de encontrar el genotipo *boty* se presenta en la finca QA, se evidencia que para la finca QA hay 2,2 veces más probabilidad que haya este genotipo en esta finca que en otra del grupo (Figura 28).

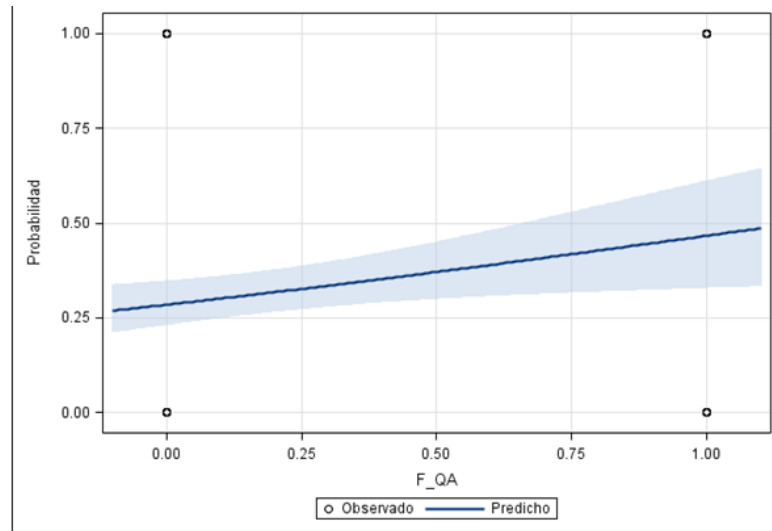


Figura 20 Probabilidad predicha de que el genotipo *boty* se presente en la finca QA. Análisis realizado con 270 aislamientos de *B. cinerea* recuperados de rosa cv Tressor2000.

En cuanto al genotipo *transposa* la menor probabilidad de encontrarlo se presenta en la finca QA. La relación es de 0,44 menos probable que este QA que en las otras fincas (Figura 29).

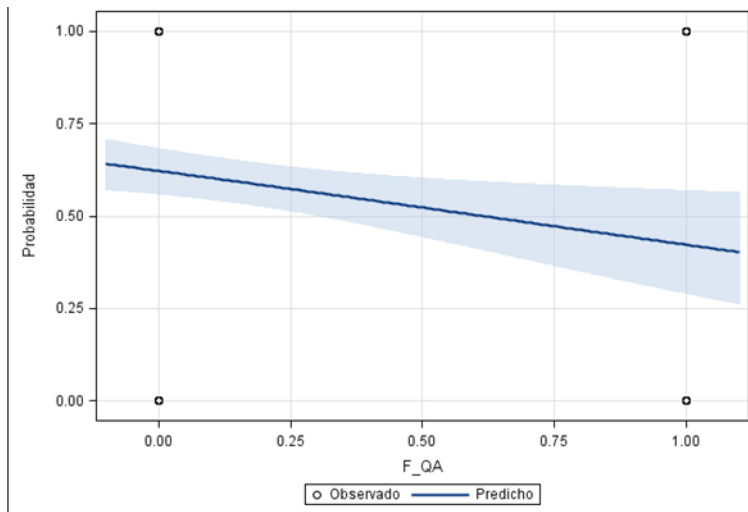


Figura 21. Probabilidad predicha de que el genotipo *transposa* se presente en la finca QA. Análisis realizado con 270 aislamientos de *B. cinerea* recuperados de rosa cv Tressor2000.

La mayor probabilidad de que se presente el genotipo *vacuma* se presenta en la finca MG. Se observa que es 3,3 veces más probable su presencia en MG que en el resto de las fincas (Figura 30).

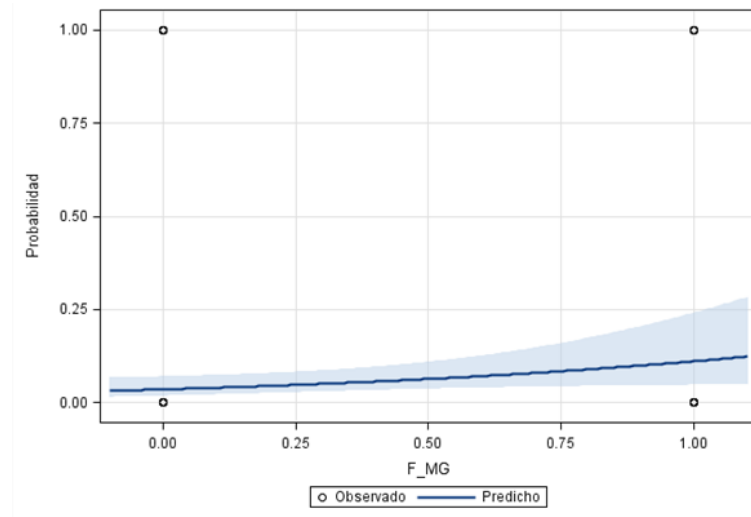


Figura 22. Probabilidad predicha de que el genotipo *vacuma* se presente en la finca MG. Análisis realizado con 270 aislamientos de *B. cinerea* recuperados de rosa cv Tressor2000.

3.2.3 Análisis secuenciación Genotipos

Para validar la secuencia de las bandas amplificadas correspondientes a los transposones Boty 648 pb y Flipper 1250 pb se purificaron las bandas de 3 aislamientos positivos para cada transposón. Estas bandas se enviaron a Macrogen (Corea) para secuenciación y los resultados del cromatograma muestran picos bien separados y con una altura adecuada (Figura 31).



Figura 23. Cromatograma de la secuencia de la amplificación de la banda correspondiente al transposón Boty en el aislamiento 4 de *B. cinerea* de rosa.

Con las secuencias obtenidas se generaron las secuencias consenso del aislado de cada primer usando el programa Genious6.0.6. Posteriormente se realizó un BLAST en el NCBI y se realizó el alineamiento de las secuencias usando el programa CLUSTALW2 EBI.

Para cada transposón amplificado se enviaron 3 muestras. Para el primer LTR98/LTR728 se encontró una correspondencia de las secuencias amplificadas con el retrotransposón Flipper con la secuencia de *Botrytinia fuckeliana* No. de accesión NCBI U74294_1 con una identidad del 97% para los dos aislamientos que se amplificaron, infiriendo que las secuencias amplificadas para la identificación del transposón Flipper corresponden con las reportadas (Tabla 9).

Para el primer F14/F304 se encontró una correspondencia de las secuencias amplificadas con el retrotransposón Boty con la secuencia de *B. cinerea* No. de accesión NCBI X81790.1 con una identidad del 95%, 97% y 96% para los tres aislamientos que se amplificaron, infiriendo que las secuencias amplificadas para la identificación del transposón Boty corresponden con las reportadas (Tabla 9).

Tabla 7. Valores de identidad del BLAST de los aislamientos amplificados para los aislamientos *B.cinerea* correspondientes a los transposones Flipper y Boty.con respecto a las accesiones reportadas en GenBank

# AISLAMIENTO	Description	Ident	Accession
82LTR	Botryotinia fuckeliana Flipper transposable element transposase gene, complete cds	97%	U74294.1
219LTR	Botryotinia fuckeliana Flipper transposable element transposase gene, complete cds	97%	U74294.1
38F	B.cinerea long terminal repeat DNA of retrotransposon Boty	95%	X81790.1
157F	B.cinerea long terminal repeat DNA of retrotransposon Boty	97%	X81790.1
204F	B.cinerea long terminal repeat DNA of retrotransposon Boty	96%	X81790.1

3.3 Análisis comparativo de características morfológicas y genéticas de *B. cinerea*

El análisis de correlación entre las características morfológicas y genéticas de los aislamientos de *B. cinerea*, se realizó con el análisis estadístico discriminante.

No se logró establecer una resolución adecuada para asociar los genotipos *boty*, *flipper* y *vacuma* a partir de las variables morfológicas analizadas. Solamente se logró esta diferenciación en el genotipo *transposa*.

Las variables morfológicas nivel de esporulación (E) y nivel de esclerocios (CFE) fueron las que presentaron mayor correlación con respecto a los genotipos. Con este análisis se logró que el 73,6% de los aislamientos fueran clasificados correctamente en el genotipo *transposa*. Para el genotipo *vacuma* alcanzó el 30,8% para los genotipos *boty* y *flipper* el 15,29% y 15,38% respectivamente (Tabla 10).

Tabla 8. Correlación del nivel de esporulación (E) con la capacidad formadora de esclerocios (CFE) para los genotipos *boty* (B), *flipper* (F), *transposa* (T) y *vacuma* (V) identificados en los 270 aislamientos de *B.cinerea* de rosa provenientes de seis fincas productoras en la Sabana de Bogotá

NIVEL DE ESPORULACION	NIVEL DE ESCLEROCIOS	B	F	T	V	TOTAL
B	FRECUENCIA	13	0	51	21	85
	%	15,3%	0,0%	60,0%	24,7%	
F	FRECUENCIA	4	2	5	2	13
	%	30,8%	15,4%	38,5%	15,4%	
T	FRECUENCIA	18	0	117	24	159
	%	11,3%	0,0%	73,6%	15,1%	
V	FRECUENCIA	3	0	6	4	13
	%	23,1%	0,0%	46,2%	30,8%	
TOTAL	FRECUENCIA	38	2	179	51	270
	%	14,1%	0,7%	66,3%	18,9%	100%

El genotipo *transposa* fue el que mayor correlación presentó con respecto a las variables capacidad formadora de esclerocios (CFE) y nivel de esporulación (E). Se identificó que las características de los niveles E3 y E4 de esporulación y el nivel CF0 de esclerocios representan 59,12% del total de sus aislamientos. Evidenciando que la relación entre genotipo y característica morfológica es: nivel de esporulación E2 y E3 y nivel de esclerocios S0 para el genotipo *transposa* (Tabla 11).

Tabla 9. Correlación del nivel de esporulación (E0 ausencia de esporulación, E1 esporulación escasa, E2 esporulación débil y E3 esporulación abundante) con la capacidad formadora de esclerocios (CFE0 ausencia, CFE1 1-15 esclerocios en la caja de Petri, CFE2 15-30 esclerocios y CFE3 más de 30 esclerocios) para el genotipo transposa en los 270 aislamientos de *B.cinerea* de rosa provenientes de seis fincas productoras en la Sabana de Bogotá.

NIVEL DE ESPORULACION	NIVEL DE ESCLEROCIOS	CFE0	CFE1	CFE2	CFE3	TOTAL
E0	FRECUENCIA	11	4	1	3	19
	%	6,9%	2,5%	0,6%	1,9%	11,9%
	% FILA	57,9%	21,1%	5,3%	15,8%	
	% COLUMNA	9,5%	19,0%	10,0%	25,0%	
E1	FRECUENCIA	11	7	5	4	27
	%	6,9%	4,4%	3,1%	2,5%	17,0%
	% FILA	40,7%	25,9%	18,5%	14,8%	
	% COLUMNA	9,5%	33,3%	50,0%	33,3%	
E2	FRECUENCIA	36	4	3	2	45
	%	22,6%	2,5%	1,9%	1,3%	28,3%
	% FILA	80,0%	8,9%	6,7%	4,4%	
	% COLUMNA	31,0%	19,0%	30,0%	16,7%	
E3	FRECUENCIA	58	6	1	3	68
	%	36,5%	3,8%	0,6%	1,9%	42,8%
	% FILA	85,3%	8,8%	1,5%	4,4%	
	% COLUMNA	50,0%	28,6%	10,0%	25,0%	
TOTAL	FRECUENCIA	116	21	10	12	159
	% FILA	73%	13%	6%	8%	100%

4 DISCUSION DE RESULTADOS

En los 270 aislamientos de *B. cinerea* fue posible encontrar todos los caracteres biológicos evaluados, desde aislamientos sin esporulación hasta altamente esporulantes, desde aislamientos que no formaron esclerocios hasta aislamientos altamente esclerociales, con todas las formas miceliales descritas en la literatura, y todos los genotipos posibles por presencia de transposones. Sin embargo, la variación en virulencia sobre pétalos de rosa no fue amplia ya que todos los aislamientos fueron altamente virulentos.

Existen numerosas herramientas metodológicas para estudiar la diversidad en poblaciones de hongos, las utilizadas en este trabajo fueron informativas y permitieron caracterizar la situación de este patógeno en rosa en la Sabana de Bogotá.

La estructura de muestreo fue suficientemente comprensiva para hacer un barrido de las posibilidades de variabilidad para este hongo. Sin embargo, los resultados mostraron que el único factor que estructura a la población es el de finca, quizá por efecto del manejo propio que hace cada finca o por las condiciones ambientales que afectan la ubicación de la finca.

4.1 Caracterización fenotípica

4.1.1 Caracterización morfológica:

Según el análisis estadístico de clústeres en donde en total se logró agrupar los aislamientos de *B. cinerea* en seis grupos, se evidencia que hay una gran diversidad de poblaciones con respecto a las características morfológicas que presentan.

Estos resultados muestran que *B. cinerea* en rosa es un hongo con una alta variabilidad y que a pesar de que en Colombia no se ha reportado la fase sexual del hongo, es posible que según Gindle (1979) esta variabilidad sea posible explicarla principalmente por la anastomosis que pueden producirse entre las hifas del hongo y que dan lugar a células multinucleadas y generalmente heterocarióticas.

Los resultados de este estudio se correlacionan totalmente con los de Chaves *et al* (1985) que encontraron, en variedades de rosa, pompón, crisantemo, clavel y estatices, aislamientos esporulantes, esclerociales e intermedios. Los aislamientos provenientes de rosa y clavel se caracterizaron como productores de gran número conidias. Los aislamientos de pompón se distinguieron como formadores de esclerocios y los aislamientos obtenidos de estatices produjeron conidias y esclerocios. Concluyendo que en la Sabana de Bogotá, la especie *Botrytis cinerea* presenta una gran variabilidad morfológica.

4.1.1.1 Caracterización morfológica Tipo de micelio – tipo de esclerocios:

En este estudio bajo las condiciones experimentales que se presentaron, la mayoría de los aislamientos analizados correspondieron a colonias miceliales con un 84%, independientemente del origen de la muestra y finca de donde fueron aisladas.

Según la característica tipo de micelio la mayoría de los aislamientos (promedio de 47%) presentaron un micelio con crecimiento en masa. Según la característica tipo de esclerocios la mayoría de los aislamientos (promedio de 66%) no presentaron formación de esclerocios. A diferencia de lo reportado en estudios en otros cultivos como en vid por Martínez *et al* (2003) en donde predominan los aislamientos esclerociales. Esto tal vez es explicable desde el punto de vista de las condiciones climáticas de la Sabana de Bogotá en donde se cultiva la mayor área de rosa no corresponden con estacionalidad climática. La Sabana de Bogotá tiene una temperatura promedio de 13.5 °C, que puede oscilar entre los -5 °C y los 26 °C. Y la presencia de esclerocios en regiones templadas se da principalmente durante el otoño – invierno. Adicionalmente cabe aclarar que la condición del cultivo de rosa en la Sabana de Bogotá es bajo invernadero y no a campo abierto, lo cual modifica aún más las condiciones climáticas a las cuales está expuesto el hongo permanentemente. La temperatura promedio de un invernadero es de 22°C con máximas de 34°C y mínimas de 5°C (datos internos GR Chia SAS).

Se podría inferir que la supervivencia de *B.cinerea* en rosa en la Sabana de Bogotá es principalmente por micelio. Hay alguna evidencia de que el micelio de

ciertos tipos de *Botrytis* y especialmente de los más especializados en su parasitismo, puedan sobrevivir por períodos considerables en bulbos, semillas y otras partes vegetativas de la planta (Elad, 2007).

4.1.1.2 Nivel de esporulación

Según la característica tipo de esporulación, la mayoría de los aislamientos, un promedio de 35%, presentaron una esporulación profusa y abundante seguida por una esporulación débil 33%. La esporulación escasa o ausencia de esporulación fue menos frecuente, con un 18% y un 14% respectivamente.

Los conidios de *Botrytis* son generalmente considerados como los propágulos de corta vida en el campo y su supervivencia dependerá en gran medida de las temperaturas extremas, la disponibilidad de humedad, actividad microbiana y la exposición a la luz solar (Elad, 2007).

El hecho de que la mayoría de los aislamientos caracterizados hayan presentado una esporulación entre abundante y débil, independientemente del tipo de tejido de donde se hayan realizado los aislamientos reafirma el concepto de la importancia del control del inóculo en los tercios bajo y medio de la planta como fuente principal de inóculo del hongo como potencial para infectar la flor. Por ello se hace importante la labor de erradicación permanente de residuos vegetales presentes en el suelo (hojarasca), seguido por los tocones (tallos) (Sandon, 2005).

4.1.1.3 Capacidad formadora de esclerocios

La mayoría de los aislamientos, el 66% en promedio presentaron una nula capacidad formadora de esclerocios. Esto no es una característica común en *Botrytis* ya que se considera que todas las especies de *Botrytis* pueden llegar a formar esclerocios y que dependiendo del aislamiento y las condiciones culturales difieren en tamaño y forma. Los esclerocios se consideran como las estructuras más importantes involucrados en la supervivencia de las especies de *Botrytis* ya que pueden sobrevivir en periodos ambientales extremos, germinando posteriormente para producir conidióforos (Elad, 2007).

Como se explicó anteriormente las condiciones de cultivo bajo invernadero sumadas a las condiciones climáticas de la Sabana de Bogotá, pueden ser las

razones por las cuales los aislamientos presentaron una baja o nula capacidad formadora de esclerocios.

En general respecto a las características morfológicas no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) de acuerdo con el origen de la muestra (hojarasca, tallo y flor) pero si hubo diferencias entre las finca de donde se realizaron los aislamientos ($p < 0,05$). Para entender esta diferencia se analizó la variable climática de temperatura promedio en el invernadero de donde fueron realizados los aislamientos, presentada durante los años 2011, 2012 y 2013 en las seis fincas. Se observa que hay diferencias en las temperaturas promedio presentada en cada finca, lo que podría ser una de las razones de la variabilidad morfológica presentada por los aislamientos entre fincas (Figura 32).

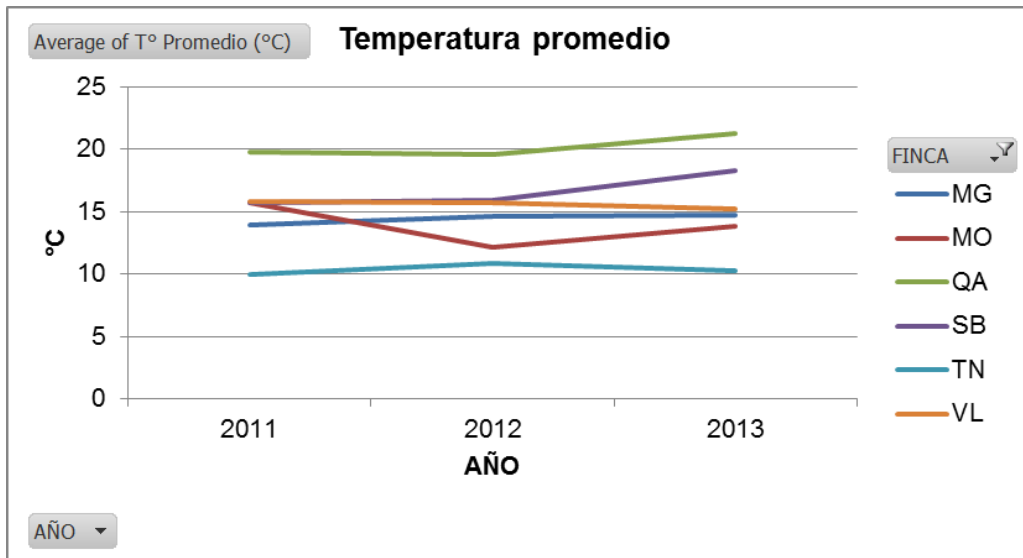


Figura 32. Temperatura promedio por finca año 2011, 2012 y 2013 presentada en el invernadero de rosa de cada finca de donde se realizaron los aislamientos de *B. cinerea*

4.1.2 Virulencia

Todos los aislamientos tuvieron un porcentaje de infección promedio de 92% del área afectada.

Se evidencia que la virulencia presenta diferencias con respecto a la finca de donde se realizaron los aislamientos. En algunas la virulencia de sus aislamientos fue superior con respecto a las otras.

Igualmente se encontró una diferencia significativa según el origen de la muestra, mostrando una mayor virulencia en los provenientes de tallo con respecto a los hojarasca y tallo. Esto reafirma la importancia de controlar la fuente de inóculo que se presenta en el tercio medio de la planta debido a los cortes permanentes de la flor que se realizan y a las condiciones de alta densidad de follaje que se encuentra en este tercio de la planta que hacen que las condiciones de humedad favorezcan la presencia del hongo. También muestra que los aislamientos de *B.cinerea* tienen un alto potencial de infectar todos los tejidos, reafirmando la importancia de controlar y disminuir las fuentes de inóculo presentes en hojarasca y tallo como inóculo potencial que pueda infectar la flor.

4.2 Caracterización genética:

4.2.1 Determinación de Grupo de Botrytis

En las poblaciones analizadas independientemente del origen de la muestra y/o finca de donde se realizaron los aislamientos, el 100% de los aislamientos analizados correspondieron al Grupo II *Botrytis cinerea* sensu stricto.

En general, la obtención de aislamientos pertenecientes al Grupo I de *B. pseudocinerea* han sido poco frecuentes, en Chile (Auger *et al*, 2011), en Europa (Fournier *et al*, 2003) y Estados Unidos (Ma y Michailides, 2005).

4.2.2 Determinación de genotipos

De acuerdo con la finca y con el tipo de tejido de donde fueron recuperados los aislamientos de *B.cinerea* se evidencia que en general para flor, tallo y hojarasca el genotipo de mayor prevalencia correspondió a *transposa* (T) (48% de 270 aislamientos). Seguido en proporción por *boty* (B) 32%. Detectándose también

pero en una menor proporción aislamientos del genotipo *vacuma* (V) y *flipper* (F) con un 10%. En diversos estudios genotípicos en otros cultivos a nivel mundial han evidenciado que existe una variabilidad en la frecuencia de genotipos en diferentes cultivos (Giraud *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 2002; Ma y Michailides, 2005; Chamorro 2005; Kuzmanovska, 2012).

Según la relación estadística genotipo-tipo de tejido se evidencia que las proporciones de los genotipos son las mismas independientemente del tipo de tejido de donde fueron recuperados los aislamientos. Las acciones de control químico y cultural, están enfocadas a los tres tercios de la planta confirmando que el manejo intensivo de la enfermedad reduce la variabilidad del hongo. Esto refuerza uno de los conceptos de manejo de *B.cinerea*, que enfatiza la reducción y eliminación del inóculo presente en todos los sustratos posibles para el desarrollo del hongo (tallos, hojas) con el objeto de minimizar la presencia del hongo en la flor.

Al considerar el factor finca es posible observar que hay diferencias en la probabilidad de la presencia de algunos genotipos en unas fincas con respecto a otras. Esto es importante dado que en vid el genotipo *transposa*, se caracteriza por ser más estable y homogéneo y por presentar un carácter más parasítico que el genotipo *vacuma*. *Vacuma* es menos estable, presenta un carácter más saprofítico y en Chile generalmente, se ha detectado asociado a plantas no sometidas a una alta presión de fungicidas. *Boty*, en cambio se presenta en menor proporción que los dos primeros pero se presenta preferentemente en plantas sometidas a una mayor presión de fungicidas (Esterio *et al.*, 2007).

Por otro lado, además se ha determinado que los genotipos de *Botrytis* presentarían una respuesta diferencial de sensibilidad a algunos botryticidas, por ejemplo sólo los aislados *transposa* y los *flipper* presentan algún nivel de resistencia a iprodione (dicarboximida), *vacuma* y *boty* se han comportado siempre sensibles a este fungicida (Giraud *et al.*, 1999; Esterio, 2005). En relación a anilinoimidazoles (pyrimethanil, cyprodinil) y carboxamidas (boscalid), resultados parciales aún no indican un efecto diferencial muy marcado hacia un determinado genotipo (Esterio *et al.*, 2006).

La variabilidad genética detectada en poblaciones del patógeno, podría explicar por qué es común que se presenten diferencias en los resultados de manejo de la enfermedad entre fincas.

Para resolver esta problemática se hace necesario seguir estudiando esta temática con mayor profundidad de manera tal de conocer más a las poblaciones locales predominantes de *Botrytis* y así lograr manejarlas más eficazmente.

A pesar de ello se puede inferir que las estrategias de manejo de la enfermedad causada por *B.cinerea* en rosa debería preferentemente enfocarse al control de los genotipos *transposa* y *boty* en cualquiera de las fincas evaluadas ya que con ello se estaría abarcando a la población predominante (aproximadamente el 90%) y en esa condición si sería esperable que similares estrategias de manejo generen resultados comparables. No obstante a lo anteriormente indicado, las pequeñas diferencias en la frecuencia de la presencia/ausencia de ciertos genotipos en las fincas muestreadas, señalaría la importancia de considerar la variable finca dentro de la definición detallada de muestreos a realizar y de las acciones de manejo a definir para cada una de ellas como por ejemplo la realización de pruebas de sensibilidad a fungicidas.

De la misma forma se debe tener en cuenta que la producción de rosas en Colombia se realiza bajo cobertura (invernadero) y que en un mismo invernadero se siembran diferentes cultivares con variada susceptibilidad a *B.cinerea*, lo cual podría influir en el resultado final por la diversidad de poblaciones que puedan estar presentes.

Los sitios de muestreo de este estudio se realizaron en invernaderos con variabilidad no solo en el número de cultivares sembrados en cada uno, sino también en el número de aplicaciones de fungicidas realizadas en cada finca para el control de la enfermedad.

Por ejemplo, el número de cultivares sembrados junto con el cultivar Tressor2000 en el invernadero de la finca QA son 7, en TN 5, en MG 4, en VL 7, en MO 5 y en SB 8. Lo que plantea la posibilidad de que esa variabilidad encontrada según el factor finca es debida a la posibilidad de intercambio en las poblaciones de los cultivares dada en cada invernadero (Tabla 17).

Al analizar el número de aplicaciones de fungicidas para el control de *B. cinerea* en un período de seis semanas antes de la toma de las muestras, se evidencia

que hay diferencias entre fincas. Por ejemplo, en QA se realizaron 11 aplicaciones en TN 12, en MG 14, en VL y MO 7 y en SB 11 aplicaciones. Las diferencias encontradas en el factor finca relacionada con los genotipos pueden deberse a la presión de selección de las poblaciones que ejercen los fungicidas y tal vez esta sea una de las razones de la variabilidad de las poblaciones entre fincas.

Se considera que en estudios posteriores valdría la pena analizar el factor cultivar y el efecto que puede ejercer la presión de fungicidas en la variabilidad de las poblaciones por finca.

4.2.3 Análisis secuenciación

En el análisis molecular para detección de los transposones Boty y Flipper se amplificaron las bandas correspondientes a cada uno de ellos, concluyendo que con la metodología utilizada fue posible caracterizar de manera certera la correspondencia genotípica de las poblaciones predominantes de *B.cinerea* en el cultivo de rosa en Colombia.

4.3 Análisis comparativo de características fenotípicas y genéticas de *B.cinerea*

No fue posible establecer una relación directa entre las características biológicas y la presencia/ausencia de los transposones Boty y Flipper en los aislamientos de *B. cinerea* en rosa en Colombia. Solamente fue posible detectar la existencia de una correlación para el genotipo *transposa* y con las variables morfológicas analizadas: nivel de esporulación (E) y capacidad formadora de esclerocios (CFE).

Otros estudios realizados en diversos cultivos (Giraud *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 1999; Kuzmanovska, 2012) tampoco pudieron encontrar esta asociación.

Por otro lado se ha reportado que la actividad de elementos de transposición puede influir en las regiones genómicas que están implicadas en el crecimiento vegetativo de los patógenos (Daboussi, 1997). Es así que se ha demostrado que

la integración de elementos de transposición en cromosomas de hongos han influido en las características cromosómicas, secuencia de ADN y la expresión génica (Daboussi, 1997). Presencia y/o actividad de los elementos transponibles puede influir en la capacidad reproductiva de los hongos (McDonald, 1993). Por ello se hace necesario realizar más investigaciones sobre las poblaciones de *B. cinerea* de diferentes especies huéspedes que incluyan más aspectos de la caracterización fenotípica y molecular del patógeno.

5 CONCLUSIONES

1. El agente causal de la enfermedad Moho gris en rosa en la Sabana de Bogotá es *Botrytis cinerea sensu stricto*. No se detectó la presencia de *B. pseudocinerea*.
2. Las variables de crecimiento del hongo evaluadas en este trabajo pueden estar asociadas a la capacidad de adaptación y virulencia del patógeno. Los resultados indican una alta variabilidad en estos caracteres en la población analizada. Esta variabilidad se encontró asociada con la finca mas no con el tipo de tejido de donde se originó el aislamiento: hojarasca, tallo o flor.
3. La virulencia de la mayoría de los aislamientos fue alta con invasión total del tejido infectado en menos de 72 h. Los aislamientos más virulentos provenían de tallo.
4. Se encontraron todos los genotipos definidos por los transposones Boty y Flipper. El genotipo predominante correspondió a *transposa*, seguido por *boty* y en menor proporción por los genotipos *flipper* y *vacuma*. La frecuencia de estos se encontró asociada al factor finca.

Este estudio es el primer reporte de la caracterización fenotípica y genética de la población de *B. cinerea* en el cultivo de rosa bajo invernadero en Colombia.

Parece que una de las principales dificultades en el manejo de la enfermedad surge de la limitada comprensión de la estructura fenotípica y genética de las poblaciones del patógeno. La complejidad y variabilidad de este hongo hace que sea difícil de controlar y puede reflejar la realidad de la existencia de poblaciones distintas incluso en un mismo invernadero. Esto podría explicar el por qué similares estrategias de control no otorgan similares resultados esperables.

RECOMENDACIONES

Al haberse determinado la existencia de poblaciones distintas del patógeno en las diferentes fincas analizadas hace importante profundizar en otros aspectos biológicos como lo es la sensibilidad a ciertos ingredientes activos de fungicidas correlacionados con las características genéticas de los aislamientos.

Dada que la variabilidad genética detectada en poblaciones del patógeno, podría ser una de las razones del por qué iguales estrategias de control no otorgan idénticos resultados esperables, se hace necesario realizar un análisis más profundo considerando diferentes cultivares y fincas para conocer más a las poblaciones locales predominantes de *B. cinerea* y así lograr manejarlas más eficazmente.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Agrios G., N. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. London, 530p
3. Anónimo, Asocolflores. 2013. <http://www.asocolflores.org>. Boletín Económico Mayo 2013.
4. Auger, J. y Esterio, M. 1997. *Botrytis* en vides en Chile: Epidemiología y resistencia a fungicidas. 3-9 p. En: Esterio, M. y Auger. J. *Botrytis*: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago - Chile. 125 p
5. Auger, J., Camus, N., Copier, Ch., Esterio, M. 2013. An overview of *Botrytis* spp. populations causing gray mold in table grapes, kiwifruits and blueberries in Chile. XVI International Botrytis Symposium. Bary, Italia.
6. Bainbridge, B.W., Spreadbury, C.L., Scalise, D.G. y Cohen, J. 1990. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *FEMS Microbiology. Lett.* 66:113 – 118.
7. Buitrago J. E., y Saavedra, L. A. Pudrición de flores y de la corona del *Statice* (*Limonium sinuatum* Mili), causado por *Botrytis cinerea*. 1982. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.
8. Chaves, F., Henao, J., Estudio del poder patogénico del *Botrytis cinerea* Pers sobre cinco especies de flores de exportación. 1982. Universidad Nacional de Colombia. *Fitopatología Colombiana*. 11(2). pp. 5-9.
9. Bowen, Nathan., Jordan King. 2002. Transposable Elements and the Evolution of Eukaryotic Complexity. *Current Issues Molecular Biology*. 4: 65-76.
10. Chamorro D., Orellana H. Caracterización de poblaciones de *Botrytis cinerea* resistentes a fungicidas en Rosas (*Rosa sp.*) en las provincias de Pichincha y Cotopaxi. Ecuador. 2007. *Rumipampa* Vol. XXI N° 1.

11. Chardonnet, C.O, Sams, C.E. 2000. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology* 90(7): 769-774.
12. Daboussi MJ, Migheli Q, Laugé R, Davière JM, Gerlinger C, Kaper F, Langin T. Transposition of the autonomous Fot1 element in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics*. 1999 Mar;151(3):1005-13.
13. Diolez, A., Marches, F., Fortini, D. y Brygoo, Y. 1995. Boty, a long-terminal repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied Environmental Microbiology*. Chapter 61:103-108.
14. Elad, Y., Williamson, B., Tundzyski, P y Delen, N. 2007. *Botrytis* spp. and Diseases they cause in Agricultural systems. En: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Ed. Springer. Netherlands. p 412.
15. Esterio, M. 2005. Caracterización genotípica y fenotípica de la forma esclerocial de *Botrytis cinerea* Pers. en cv. Thompson Seedless (*Vitis vinifera* L.) en dos localidades del valle central de Chile. Tesis M. Sc., Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas.
16. Esterio M. y Auger, J. 2006. Implicancias de la variabilidad genética en el control de *Botrytis cinerea* en vides en Chile: Resistencia a fungicidas. *Revista Aconex* 92: 17-24.
17. Esterio, M., Muñoz, G., Ramos, C., Cofré, G., Estévez, R., Salinas, A. and J. Auger. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates present in Thompson Seedless table grapes in Chile. *Plant Disease*, Jun 2011, Volume 95, Number 6: 683-690.
18. Fournier E, Giraud T. 2002. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes* P Blackwell Science.
19. Fournier, E; Levis, C; Dominique F. Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycology*, 95(2), 2003, pp. 251–261.
20. Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K. and Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuina*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89: 967-973.

21. Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., and Brygoo, Y. 1997. RFLP Markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology Evolution*, 14: 1177-1185.
22. Grandbastien, M. A. 1992. Retroelements in higher plants. *Trends in Genetics*. 8:103-108.
23. Grindle M. 1979. Phenotypic Differences between Natural and Induced Variants of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* (1979), 111, 109-120.
24. Isenegger, D.A., Ades, P.K., Ford R., Taylor P.W.J. 2008. Status of the *Botrytis cinerea* species complex and microsatellite analysis of transposon types in south Asia and Australia. *Fungal Diversity* 17-2622.
25. Kuzmanovska B, Rusevski R. 2012. Phenotypic and genetic characterization of *Botrytis cinerea* isolates from tomato. *Genetika*. 44, 3, 633-647.
26. Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Dis*. 89:1083-1089.
27. Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B. and Fermaud M. 2003. Phenotypic Differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (5) p.479-488.
28. Mc Donald, B. and Linde C. Pathogen population genetics. Evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review Phytopathology*. 2002. 40:349–379.
29. Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y. y Giraud, T. 2002. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research* 106(5):594-601.
30. Muñoz, G., Hinrichsen, P. y Alvarez, M. (1999). Variabilidad genética de cepas de *Botrytis cinerea* resistentes a dicarboximidas provenientes de vid y tomate. *Agricultura Técnica (Chile)*. 59:1-12.
31. SAS OnlineDoc® 9. Cary, NC: SAS Institute Inc.
32. Sandon Cindia M. 2005. Efecto de la limpieza de fuentes de inóculo del “Moho gris” sobre la presencia de conidias aéreas del agente causal de la enfermedad en un cultivo de rosa variedad Classy. Tesis Microbiología Agrícola y

veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias básicas,
Bogotá, Colombia.

33. Thompson, J., y Latorre, B. 1999. Characterization of *Botrytis cinerea*
from table grapes in Chile using RAPD-PCR. Plant Disease 83(12); 1090-1094.

ANEXOS

Tabla 10. Caracterización morfológica según tipo de micelio (MI: micelio corto, MII: micelio suelto, MIII: micelio crecimiento en masa y MIV: micelio grueso y lanudo) por tipo de tejido (hojarasca, tallo y flor) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa en seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá

LOCALIDAD	FINCA	TIPO TEJIDO	TIPO MICELIO (# aislamientos)			
			M I	M II	M III	M IV
NORTE	QA	FLOR	0	1	6	8
		TALLO	1	2	5	7
		HOJARASCA	1	2	11	1
	TN	FLOR	0	0	9	6
		TALLO	0	2	2	11
		HOJARASCA	0	2	5	8
CENTRO	MG	FLOR	2	1	5	7
		TALLO	1	0	9	5
		HOJARASCA	1	1	3	10
	VL	FLOR	1	3	5	6
		TALLO	1	3	4	7
		HOJARASCA	0	0	7	8
OCCIDENTE	MO	FLOR	0	3	5	7
		TALLO	0	1	8	6
		HOJARASCA	0	3	8	4
	SB	FLOR	0	2	8	5
		TALLO	2	0	10	3
		HOJARASCA	0	0	11	4

Tabla 11. Caracterización morfológica según distribución de esclerocios en el medio (S0: no formación de esclerocios, S1: esclerocios en el borde de la caja, S2: micelio esclerocios grandes radiales, S3: esclerocios grandes irregulares S4: esclerocios numerosos, pequeños e irregulares) por tipo de tejido (hojarasca, tallo y flor) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa de seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá

FINCA	TIPO TEJIDO	DISTRIBUCION DE ESCLEROCIOS EN EL MEDIO (# aislamientos)				
		S0	S1	S2	S3	S4
QA	FLOR	12	0	0	1	2
	TALLO	5	0	0	3	7
	HOJARASCA	7	0	0	1	7
TN	FLOR	11	0	1	0	3
	TALLO	15	0	0	0	0
	HOJARASCA	13	0	0	0	2
MG	FLOR	7	0	2	4	2
	TALLO	5	0	2	2	6
	HOJARASCA	9	0	0	2	4
VL	FLOR	14	0	0	1	0
	TALLO	12	0	2	1	0
	HOJARASCA	15	0	0	0	0
MO	FLOR	10	0	1	0	4
	TALLO	13	0	2	0	0
	HOJARASCA	9	0	4	1	1
SB	FLOR	6	0	1	0	7
	TALLO	9	0	1	2	3
	HOJARASCA	7	0	3	1	4

Tabla 14. Caracterización morfológica según capacidad formadora de esclerocios (CFE0: ausencia, CFE1: escasa 1-15 esclerocios en la caja, CFE2: moderada 15-30 esclerocios en la caja, CFE3: alta más de 30 esclerocios en la caja) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa de seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá

LOCALIDAD	FINCA	ORIGEN DEL AISLAMIENTO	CAPACIDAD FORMADORA DE ESCLEROCIOS (# aislamientos)			
			CFE0	CFE1	CFE2	CFE3
NORTE	QA	FLOR	12	1	0	2
		TALLO	5	4	4	2
		HOJARASCA	7	2	0	6
	TN	FLOR	11	2	0	2
		TALLO	15	0	0	0
		HOJARASCA	13	1	0	1
CENTRO	MG	FLOR	7	3	4	1
		TALLO	5	3	3	4
		HOJARASCA	9	0	2	4
	VL	FLOR	14	1	0	0
		TALLO	12	3	0	0
		HOJARASCA	15	0	0	0
OCCIDENTE	MO	FLOR	10	3	0	2
		TALLO	13	2	0	0
		HOJARASCA	9	4	1	1
	SB	FLOR	6	4	0	5
		TALLO	9	2	3	1
		HOJARASCA	7	5	0	3

Tabla 15. Caracterización morfológica según tipo de esporulación (E0: ausencia 0%, E1: escasa 1-10%, E2: débil 10-50%, E3: abundante >50%) por tipo de tejido (hojarasca, tallo y flor) de 270 aislamientos de *B. cinerea* provenientes de cultivos de rosa de seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá

LOCALIDAD	FINCA	TIPO TEJIDO	TIPO ESPORULACION (# aislamientos)			
			E0	E1	E2	E3
NORTE	QA	FLOR	2	4	6	3
		TALLO	4	3	2	6
		HOJARASCA	2	10	3	0
	TN	FLOR	3	1	3	8
		TALLO	0	1	6	8
		HOJARASCA	1	1	5	8
CENTRO	MG	FLOR	2	2	5	6
		TALLO	1	5	4	5
		HOJARASCA	0	2	7	6
	VL	FLOR	3	1	8	3
		TALLO	5	5	4	1
		HOJARASCA	0	0	6	9
OCCIDENTE	MO	FLOR	3	2	5	5
		TALLO	2	0	6	7
		HOJARASCA	4	1	6	4
	SB	FLOR	2	4	3	6
		TALLO	2	3	5	5
		HOJARASCA	3	4	3	5

Tabla 12. Caracterización morfológica según virulencia (%área afectada promedio) por tipo de tejido (hojarasca, tallo y flor) provenientes de cultivos de rosa de seis fincas (QA: Quality flowers, TN: Flores el Tandil, MG: MG Consultores, VL: Flores la Valvanera, MO: Mountain roses y SB: Pardo Carrizosa) de la Sabana de Bogotá

LOCALIDAD	FINCA	TIPO TEJIDO	% AREA AFECTADA
NORTE	QA	FLOR	94,4
		TALLO	91,9
		HOJARASCA	94,7
	TN	FLOR	89,1
		TALLO	99,6
		HOJARASCA	93,6
CENTRO	MG	FLOR	88,7
		TALLO	95,2
		HOJARASCA	82,9
	VL	FLOR	97,1
		TALLO	96,6
		HOJARASCA	97,5
OCCIDENTE	MO	FLOR	94,8
		TALLO	96,9
		HOJARASCA	96,7
	SB	FLOR	94,8
		TALLO	94,8
		HOJARASCA	96,9

Tabla 17. Cultivares sembrados y número de aplicaciones realizadas en el invernadero de donde fueron realizados los aislamientos de *B.cinerea* por finca.

FINCA	CULTIVARES SEMBRADOS	# CULTIVARES SEMBRADOS	SEMANA APLICACIONES	INGREDIENTES ACTIVOS	# APLICACIONES EN 6 SEMANAS
Quality flowers	LightOrlando Parissiene Cuenca Taiga TRESSOR Saturno Vogue Freedom	7	44	Fludoxionil + Ciprodinil	11
			44	Pirimetanil + Carboxim+ Thiram	
			45	Fludoxionil + Ciprodinil	
			45	Carboxin + thiram	
			46	Procloraz	
			46	Fludoxionil + Ciprodinil	
			47	Fenhezamid + Tebuconazol	
			47	Fludoxionil + Ciprodinil	
			48	Fenhezamid + Tebuconazol	
			49	Procloraz	
			50	Pirimetanil + Carboxim+ Thiram	
Flores El Tandil	Panamá Erin TRESSOR Taiga Escimo	5	44	Fenhezamid + Tebuconazol	12
			44	Carboxin + thiram	
			45	Fludoxionil + Ciprodinil	
			46	Fludoxionil + Ciprodinil	
			46	Azoxystrobin + Difenconazol	
			47	Fenhezamid + Tebuconazol+captan	
			47	Fludoxionil + Ciprodinil	
			48	Azoxystrobin + Difenconazol	
			48	Captan	
			49	Fenhezamid + Tebuconazol	
			49	Azoxystrobin + Difenconazol	
50	Captan				
MG Consultores	TRESSOR Marissa Domenica Escimo	4	44	Fenhezamid + Tebuconazol	14
			44	Fludoxionil + Ciprodinil	
			45	Pirimetanil	
			45	Captan	
			46	Fludoxionil + Ciprodinil	
			46	Azoxystrobin + Difenconazol	
			47	Fludoxionil + Ciprodinil	
			47	Fenhezamid + Tebuconazol	
			48	Carboxin + thiram	
			48	Pirimetanil	
			49	Fludoxionil + Ciprodinil	
49	Fenhezamid + Tebuconazol				
50	Carboxin + thiram				
50	Pirimetanil				
Flores La Valvanera	Jade Sandra Domenica TRESSOR Taiga Erin Citran	7	44	Procloraz	7
			45	Pirimetanil	
			46	Fenhezamid + Tebuconazol	
			47	Procloraz	
			48	Pirimetanil	
			49	Carboxin + thiram	
			50	Tebuconazol + Carbendazim	
Mountain roses	Freedom Orlando Cuenca Citran TRESSOR	5	44	Captan	7
			45	Pirimetanil	
			46	Captan	
			47	Iprodione + Pyrimetanil + captan	
			48	Fludoxionil + Ciprodinil	
			49	Iprodione + Pyrimetanil + captan	
50	Pirimetanil				
Santa Bárbara	Vendela Domenica QueensDay HotPrincess DarkLulu TRESSOR Circus QueenBerry	8	44	Pirimetanil	11
			44	Fludoxionil + Ciprodinil	
			45	Fludoxionil + Ciprodinil	
			45	Fenhezamid + Tebuconazol	
			46	Pirimetanil	
			47	Fludoxionil + Ciprodinil	
			47	Fenhezamid + Tebuconazol	
			48	Pirimetanil	
			48	Fenhezamid + Tebuconazol	
			49	Fludoxionil + Ciprodinil	
			50	Fenhezamid + Tebuconazol+captan	