

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Evaluación de la aplicación de elicitores en la resistencia contra  
*Botrytis cinerea* en rosas (*Rosa* sp.) durante hidratación en  
postcosecha**

**Jael Stefanía Narváez Acurio**

**Ingeniería en Biotecnología**

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

Quito, 17 de diciembre de 2021

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

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

**Evaluación de la aplicación de elicitores en la resistencia contra *Botrytis cinerea* en rosas (*Rosa* sp.) durante hidratación en postcosecha**

**Jael Stefanía Narváez Acurio**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Antonio León-Reyes, PhD**

Quito, 17 de diciembre de 2021

## © DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Jael Steafanía Narvárez Acurio

Código: 00202605

Cédula de identidad: 1721741096

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2021

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

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

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

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

## RESUMEN

La rosa es uno de los cultivos más importantes en la economía ecuatoriana, pues representa el 8,6% del PIB. Una de las principales enfermedades de este cultivo es el “moho gris” causado por *Botrytis cinerea*; un hongo necrotrófico que genera daños en el cultivo, por ende se han implementado varios tipos de controles como químicos, biológicos, mecánicos o culturales. Actualmente han tomado importancia los controles biológicos debido a la problemática en la salud y el ambiente causados por los tradicionales. Entre estos se encuentran los elicitores que son moléculas que desencadenan respuestas de defensa en las plantas; dependiendo de su concentración y tiempo de aplicación. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó la aplicación de elicitores en la resistencia contra *Botrytis cinerea* en rosas mediante hidratación en postcosecha. Por medio de una revisión sistemática que obtuvo 81 estudios analizó que la mayoría de elicitores empleados son naturales (68 estudios) y el cultivo más investigado sobre elicitores contra *B. cinerea* fue el tomate (28 estudios). Para las pruebas se implementaron elicitores hormonales de defensa como Metil Jasmonato (0.05, 0.1 y 0.2 mM), Ácido Salicílico (0.5, 1.0 y 2.0 mM) y Etefón (0.42, 1.73 y 6.92) además de hormonas de crecimiento como auxinas (0.14, 0.29 y 0.57 mM), giberelinas (0.5, 1.0 y 2.0 mM), y citoquininas (1.11, 2.22 y 4.44). Tras el análisis de resultados mediante ImageJ y Minitab 19. Se observó que, las auxinas, el MeJA y las citoquininas disminuyeron el área de lesión en 40%, 16% y 14%, respectivamente a diferencia del SA que la incrementó en un 10%.

**Palabras clave:** rosas, elicitores, *Botrytis cinerea*, postcosecha, MeJA, SA, etefón, citoquininas, giberelinas, auxinas.

## ABSTRACT

Rose is one of the most important crops in the Ecuadorian economy, representing 8.6% of GDP. One of the main diseases of this crop is the "gray mold" caused by *Botrytis cinerea*; a necrotrophic fungus that causes damage to the crop, therefore various types of controls such as chemical, biological, mechanical or cultural have been implemented. Currently, biological controls have become important due to the problems in health and the environment caused by traditional ones. One of them known as elicitors, are molecules that trigger defense responses in plants; depending on its concentration and time of application. Therefore, in the present study the application of elicitors was evaluated in the resistance against *Botrytis cinerea* in roses by postharvest hydration. Through a systematic review that obtained 81 studies, where most of them was natural elicitors (68 studies) and the most researched crop about elicitors against *B. cinerea* was tomato (28 studies). For the tests, were implemented defense hormonal elicitors such as Methyl Jasmonate (0.05, 0.1 and 0.2 mM), Salicylic Acid (0.5, 1.0 and 2.0 mM) and Ethephon (0.42, 1.73 and 6.92), also were apply growth hormones such as auxins (0.14, 0.29 and 0.57 mM), gibberellins (0.5, 1.0 and 2.0 mM), and cytokinins (1.11, 2.22 and 4.44). After analyzing the results using ImageJ and Minitab 19. It was observed that auxins, MeJA and cytokinins decreased the lesion area by 40%, 16% and 14%, respectively, unlike SA, which increased it by 10%.

**Key words:** roses, elicitors, *Botrytis cinerea*, postharvest, MeJA, SA, Ethephon, cytokinins, gibberellins, auxins.

## TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	11
2. Métodos.....	14
2.1 Metodología dentro de la Revisión Sistemática .....	14
2.3 Material Vegetal y Tratamientos .....	14
2.4 Aislamiento y conteo de esporas de <i>Botrytis cinerea</i> .....	15
2.5 Ensayo de infección .....	16
2.6 Preparación de las cámaras húmedas.....	16
2.7 Medición de Área de lesión.....	16
2.8 Diseño experimental.....	16
3. Resultados.....	17
3.1 Evaluación de estudios hallados sobre los efectos de la aplicación de elicitores en la resistencia contra <i>Botrytis cinerea</i> .....	17
3.2 Prueba de eficacia con elicitores hormonales de defensa.....	18
3.3 Prueba de eficacia con elicitores hormonales de crecimiento.....	18
4. Discusión .....	20
4.1 Influencia de los elicitores en diferentes cultivos afectados por <i>B. cinerea</i> y su tipo de aplicación.....	20
4.2 Efectos de elicitores hormonales de defensa contra <i>B. cinerea</i> .....	20
4.3 Hormonas de crecimiento como inductores de diferentes rutas de señalización contra patógenos necrótrofos ( <i>B. cinerea</i> ).....	22
5. Conclusiones .....	24
6. Tablas.....	25
7. Figuras.....	26
8. Referencias .....	32

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Promedios de área de lesión con cada tratamiento hormonal .....	25
---	----



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metodología de la prueba de eficacia.....	26
<b>Figura 2.</b> Metodología de la Revisión Sistemática .....	27
<b>Figura 3.</b> Conteo y categorización de estudios obtenidos tras la Revisión Sistemática. ....	28
<b>Figura 4.</b> Cultivos y tipos de aplicaciones de elicitors frente a <i>Botrytis cinerea</i> .....	29
<b>Figura 5.</b> Estadísticas de las pruebas de eficacia con elicitors hormonales de defensa .....	30
<b>Figura 6.</b> Estadísticas de las pruebas de eficacia con hormonas de crecimiento.....	30

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1:</b> Microscopía de Botrytis cinerea.....	36
<b>ANEXO 2:</b> Optimización del ensayo de infección .....	37
<b>ANEXO 3:</b> Optimización del método de medida del área de lesión.....	38

## 1. INTRODUCCIÓN

La rosa es uno de los cultivos más importantes en la economía ecuatoriana, pues se posiciona dentro de los primeros productos de exportación y representa el 8,6% del PIB total pues da trabajo a más de 50 000 personas de forma directa como indirecta (Flores, 2015). Según la CFN (Corporación Financiera Nacional) hasta el 2020 las exportaciones principales han sido hacia Estados Unidos (45%), Rusia (14%) y Holanda (9%) (2021). Esto indica la importancia del cuidado e investigación de nuevas técnicas que enfrenten problemas fitosanitarios causado por varios factores ambientales como técnicos. Aquellas enfermedades de gran relevancia dentro del cultivo son el “Oídio” causado por *Sphaerotheca pannosa* (Aponte, 2015), el “Mildiu Velloso” por *Peronospora sparsa* (Flores, 2015) y el “Moho gris” por *Botrytis cinerea*. Este último, es el fitopatógeno que causa grandes pérdidas económicas, pues afecta a más de 500 especies de plantas pues gracias a su fácil dispersión y amplio rango de huéspedes es responsable de 100 millones de pérdidas económicas anuales a nivel mundial (Hua et al., 2018). Además dentro del cultivo de rosas ecuatorianas puede afectar a más del 60% de la cosecha (Amaya, 2021).

*Botrytis* es un hongo con estilo de vida necrotrófica es decir, se alimenta de células muertas de los tejidos mediante la degradación de la pared celular, esto ocurre tras la adherencia de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE: cell wall-degrading enzymes), la secreción de toxinas y factores de virulencia en la superficie de cualquier tejido de la planta, generando su necrosis y supresión del sistema inmunológico del huésped (Petrasch et al., 2019). La enfermedad del “Moho gris” es difícil de controlar ya que tiene la capacidad de formar esclerocios los cuales se pueden mantener en tejidos contaminados o en

el suelo impidiendo un control dentro del invernadero como en los procesos postcosecha (Túqueres, 2016).

Por tanto, se han dado diferentes tipos de control como prácticas culturales (Restrepo, 2010), controles mecánicos (Trejo & Katterine, 2018), biológicos (Herrera, 2015) y químicos. Resaltando del último grupo los fungicidas sintéticos utilizados desde los años ochenta por las florícolas pioneras en el cultivo de flores de verano, los cuales presentaron graves problemas para la salud del suelo y los trabajadores (Hidalgo, 2017). Además, en la última década se ha visto que su uso puede incrementar la resistencia de *Botrytis cinerea* hacia estos fungicidas (Saito et al., 2019). Por tanto, ha aumentado la investigación en biocontroles frente al fitopatógeno, entre estos se encuentra los biofungicidas (Pincay et al., 2021) y aquellos de inducen resistencia sistemática, también conocidos como inductores de resistencia o elicitores (Jamiołkowska, 2020).

Los elicitores son moléculas de origen sintético u orgánico que, al entrar en contacto con receptores de las células vegetales, logran generar la activación de diferentes rutas de defensa. Los elicitores pueden dividirse en dos grandes grupos según su naturaleza como biótico y abióticos o según su origen como exógenos y endógenos (Moreno et al., 2018), sin embargo, se los puede dividir como sintéticos y naturales según su principio activo de los cuales pueden derivarse muchas más ramas. Estas moléculas pueden estar en el medio en el cual crece la planta o puede ser aplicado de forma exógena, como una forma de control biológico contra problemas fitosanitarios en diversos cultivos.

El mecanismo de acción de estos elicitores funciona como una defensa de la planta hacia estreses bióticos, en el cual la planta reconoce moléculas exógenas y activa dos vías de respuesta (Zaynab et al., 2018). La primera es PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) que a su vez desencadenará la inmunidad activada por PAMPs (PTI) (Monaghan

& Zipfel, 2012). Por otro lado, tenemos las vías de defensa activadas por proteínas de resistencia vegetal (proteínas R), la cual reconoce factores específicos de patógenos como las proteínas Avr y desencadena el mecanismo de inmunidad activada por efectores (ETI) al igual que respuestas hipersensitivas (HR) (Spoel & Dong, 2012). Aunque cualquiera de las dos vías, PTI y ETI al ser activadas pueden inducir a las vías de señalización hormonales como del ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), donde el mecanismo de SA promueve la resistencia hacia patógenos hemibiotróficos y biotróficos, mientras que los mecanismos de ET y JA pueden provocar una resistencia hacia herbívoros y patógenos necrotróficos (Moustafa-Farag et al., 2020).

El efecto de los elicitores sobre la activación de la resistencia en las plantas va a depender de la concentración del elicitador y el tiempo o periodos de aplicación del mismo, además podrían tener influencia dentro del crecimiento y desarrollo de la planta (Patel et al., 2020). Por tanto, el objetivo principal de la presente investigación fue el evaluar la aplicación de elicitores en la resistencia contra *Botrytis cinerea* en rosas mediante hidratación en postcosecha. Por medio de una revisión sistemática sobre los efectos de la aplicación de los elicitores en la resistencia contra *Botrytis cinerea*.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Metodología dentro de la Revisión Sistemática

La revisión sistemática se la hizo en referencia a la pregunta ¿Cuáles son los efectos de la aplicación de elicitores en la resistencia contra *Botrytis cinerea*?. La cual se planeó responder mediante la búsqueda en tres bases de datos que fueron Scopus, Web of Science y Science Direct. Los términos de búsqueda utilizados se repartieron entre *Botrytis cinerea* y elicitores. Para la búsqueda del patógeno se utilizó los términos: "Botrytis cinerea", "gray mold" , "grey mould", "grey mold" OR "B. cinerea", de igual forma para la búsqueda de elcicitorres se contemplo los siguiente términos: elicitor\*, "plant hormones", analog. De la búsqueda se obtuvo 1211 estudios y se los redujo hasta 81 estudios de interés, por medio del análisis de cada uno de los estudios, pasando por diferentes etapas de screening detallado en la Figura 2.

### 2.3 Material Vegetal y Tratamientos

El material vegetal utilizado para las pruebas de eficiencia fueron Rosas cv Vendela de postcosecha sin tratamientos de inmersión en funguicidas con corte entre 50 a 70 cm, provenientes de la florícola JosarFlor ubicada en el cantón Cayambe dentro de la provincia de Pichincha.

Los tratamientos utilizados fueron mediante hidrataciones a diferentes concentraciones. Se realizaron soluciones de 300 ml vertidos en vasos de plástico de 32 oz. Donde se colocaron 3 rosas por tratamiento a diferentes concentraciones. Se separó a los tratamientos en dos grupos. El primero constó de elicitores hormonales que inducen las diferentes vías de defensa. Dentro de este grupo para el tratamiento con Ácido Salicílico (SA, 100 mM) se utilizaron concentraciones de 0.5 mM, 1.0 MM y 2.0 mM, tomado en

consideración lo propuesto por Ha et al. (2020). Para el tratamiento con Metil Jasmonato (MeJA, 99%) se utilizaron las concentraciones de 0.05 mM, 0.1 mM y 0.2 mM tomando en consideración la metodología de Meir et al. (1998), se tomó una dosis estándar y se preparó una concentración baja y alta como recomendación. En el tratamiento para activación de la vía del etileno se utilizó el producto Ceroné 720 (ethephon 720 g/L) a concentraciones de 0.42 mM, 1.73 mM y 6.92 mM según lo propuesto por De Stigter (1980).

El segundo grupo consistió en ensayar con hormonas de crecimiento como elicitores. Se probó la auxina del ácido Indolacético (IAA, 99%) a 0.14 mM, 0.29 mM y 0.57 mM como lo especifica Khan, et al. (2007). Para el tratamiento con citoquininas se utilizó el producto Citokyn (citoquininas, 0.01% p/v) a 1.11 mM, 2.22 mM y 4.44 mM tomando como dosis estándar 1.11 mM de Lukaszewska y Barthe (1995). Finalmente, dentro del tratamiento con giberelinas se utilizó el producto New Robust (Ác. Giberelico, 10% p/v) a 0.5 mM, 1.0 mM y 2.0 mM tomando la medida estándar de 1.0 mM evidenciada por Shaul, Elad y Zieslin (1995).

#### **2.4 Aislamiento y conteo de esporas de *Botrytis cinerea***

El aislamiento de las esporas inoculadas se las hizo mediante el lavado de pétalos con infección natural. Se tomó entre dos a 3 pétalos sumamente infectados, con el micelio visible y se los colocó en una caja Petri. Se vertió 10ml de PDB en la caja y con un asa triangular se lavó el pétalo. El sobrenadante obtenido se filtró por medio de un algodón en un embudo. Para el conteo de esporas se tomó 10 µl del filtrado y se lo dispensó en una Cámara de Neubauer. Luego en el microscopio se hizo un conteo de esporas y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . El inóculo obtenido se dejó reposar por 2 horas previas a la inoculación. Se realizó un trabajo de microscopía para verificar que el inóculo utilizado se trata de *Botrytis cinerea* (ANEXO A).

## 2.5 Ensayo de infección

En el ensayo de infección se realizaron dos pasos. El primero consistió en el depestate de los primeros 5 pétalos de cada botón contando desde el segundo, estos pétalos se colocaron dentro de cámaras húmedas con un esquema de cuatro bloques, donde 3 fueron para tratamientos y uno de control positivo, el cual consistió en pétalos de botones sin tratamiento alguno. Cada bloque estuvo compuesto por tres filas de cinco pétalos cada una. El segundo paso fue la inoculación del patógeno en cada pétalo con 5  $\mu$ l con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  del inóculo preparado con una anticipación de 2 horas. Este proceso fue optimizado como se relata en el ANEXO B.

## 2.6 Preparación de las cámaras húmedas

Las cámaras húmedas consistieron en contenedores de 80 cm x 18.5 cm de plástico otorgados por el Laboratorio de Agrobiotecnología de la USFQ. Cada uno de estos contenedores fueron tapizados con papel toalla y se vertió 250 ml de agua que fue distribuida por toda la base para lograr un ambiente óptimo para el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

## 2.7 Medición de Área de lesión

Para medir el área de lesión provocada por *Botrytis cinerea* se tomó fotos de los pétalos y se midió mediante el software ImageJ con una medida base de 3 cm. Este método fue optimizado mediante una correlación de métodos de medida propuesta en el ANEXO C.

## 2.8 Diseño experimental

Se usó un Diseño de Bloques al Azar (DBA) con tres repeticiones para cada elicitador probado. Se realizó un análisis estadístico ANOVA para observar la significancia de cada uno de los tratamientos con una prueba Tukey ( $p < 0,05$ ) de separación de medias.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Evaluación de estudios hallados sobre los efectos de la aplicación de elicitores en la resistencia contra *Botrytis cinerea*

El presente proyecto tuvo una revisión literaria sobre los efectos de la aplicación de elicitores en la resistencia contra *Botrytis cinerea* dentro de tres bases de datos que fueron Scopus, Web Of Science y Science Direct de las cuales se logró un total de 1211 documentos encontrados. Como se muestra en la Figura 2 durante el primer paso de exclusión se obtuvo 230 documentos, donde se revisaron títulos y resúmenes, mientras que tras el segundo paso de revisión de textos se logró filtrar los documentos hasta obtener un total de 81 estudios incluidos.

En la Figura 3 se muestra el análisis de los 81 estudios encontrados según distintos criterios establecidos. Principalmente se obtuvo que en el 23.6% de los estudios utilizaron elicitores sintéticos, mientras que el 76.4% utilizaron elicitores de origen natural. De cada una de estas categorías se obtuvieron subcategorías. Los elicitores naturales se dividieron en 4 subcategorías clasificadas según el principio activo que poseían; por tanto, se obtuvo que los polisacáridos y hormonas ocuparon un 31.64%, sobresaliendo quitosano (52%) y MeJA (48%) respectivamente; los proteicos un 20.26% y otros un 16.46%. Por otro lado, los elicitores sintéticos fueron divididos en 3 grandes grupos de igual forma dependiendo del principio activo que poseían, por tanto, se mostró que el 42.86% fueron elicitores análogos donde dominaron aquellos análogos al Ác. Salicílico (61.1%); el 35.71% fueron químicos puros y el 21.43% lo ocuparon una minoría de elicitores.

De los resultados tras el análisis con criterios establecidos se realizó dos gráficos en el que se muestra las cantidades de estudios según el cultivo agrícola y el tipo de aplicación del elicitador utilizado. En la Figura 4a se observó que los cultivos con mayor énfasis en

investigación con elicitores frente a *B. cinerea* fueron Tomate (30%), Arabidopsis (16%), Uva y Frutilla (5%), mientras que los demás cultivos tuvieron investigaciones menores al 5%. Asimismo, en la Figura 4b se muestra que la mayoría de los estudios utilizaron un tipo de aplicación por spray (50%) o por inmersión en solución (24%) mientras que los demás tipos de aplicación que fueron utilizados estuvieron por debajo del 5%.

### **3.2 Prueba de eficacia con elicitores hormonales de defensa**

En las pruebas de eficacia para elicitores hormonales de defensa se evaluaron tres diferentes concentraciones de MeJA, Etefón y Ác. Salicílico. En la Figura 5a se observó una reducción en el área de lesión del 5.97%, 15.78% y 8.28% por parte de los tratamientos a 0.05 mM, 0.1 mM y 0.2 mM con Metil Jasmonato (MeJA) en comparación con el control positivo, respectivamente. Por el contrario, en la Figura 5c se obtuvo un incremento en el área de lesión del 9.52%, por parte de los tratamientos a 2.0 mM y una reducción del 1.54% y 2.50% a 0.5 mM y 1.0 mM con Ác. Salicílico (AS), respectivamente. Por último, con el Etefón hubo una reducción del 4.32% a 1.73 mM e incremento del 1.85% y 6.67% a 0.42 mM y 6.92 mM, respectivamente.

Se dió un estadístico ANOVA con una prueba de comparación de medias Tukey ( $p < 0,05$ ) donde los tratamientos con MeJA y AS tuvieron valores significativos a 0.1 mM y 2.0 mM respectivamente, mientras que en el tratamiento de Etefón no hubo diferencias significativas durante las comparaciones de las medias de los tratamientos y control positivo.

### **3.3 Prueba de eficacia con elicitores hormonales de crecimiento**

Para las pruebas de con hormonas de crecimiento como elicitores se evaluaron tres diferentes concentraciones de Ác. Indolacético (IAA), Citoquininas y Giberelinas. En la Figura 6a se observó una reducción en el área de lesión del 40.2%, 21.49% y 29.41% por parte de los tratamientos a 0.14 mM, 0.29 mM y 0.57 mM con Ácido Indolacético (IAA) en comparación

con el control positivo, respectivamente. Asimismo, en la Figura 6b se obtuvo una reducción en el área de lesión del 14.18%, 3.98% y 10.71% por parte de los tratamientos a 1.11 mM, 2.22 mM y 4.44 mM con Citoquininas, respectivamente a comparación del control positivo. Al contrario, con las giberelinas hubo una reducción del 5.51% y 8.75% a 0.5 mM y 2.0 mM e incremento del 1.40% a 1.0 mM, respectivamente.

Por medio del estadístico ANOVA y la prueba Tukey ( $p < 0,05$ ) se observó una diferencia significativa con auxinas y citoquininas a 0,14 mM y 1.11 mM, respectivamente. Sin embargo, en el tratamiento con giberelinas hubo una diferencia significativa entre el tratamiento con 1.0 mM y 2 mM esto se lo puede observar e la Tabla 1.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Influencia de los elicitores en diferentes cultivos afectados por *B. cinerea* y su tipo de aplicación

Dentro de la Revisión Sistemática realizadas se observó un mayor número de estudios con elicitores naturales, esto puede deberse a que varios de componentes activos fueron aislados y sintetizados de proteínas o moléculas secretados por otros microorganismos (Thakur & Sohal, 2013), mientras que muy pocos estudios realizaron investigaciones con elicitores químicos lo que puede acreditar una transformación hacia un pensamiento de productividad dentro de una agricultura orgánica sustentable (Jamiołkowska, 2020). En este mismo contexto se analizó el tipo de cultivos donde hubo mayor cantidad de estudios, resaltando el tomate debido a que es el primer cultivo con mayores problemas de “Moho gris” en invernaderos a nivel mundial y partiendo de este le sigue la frutilla y la rosa (Dik & Wubben, 2007). Asimismo, se analizó el tipo de aplicación de los elicitores distinguiendo a la aplicación por spray e inmersión ya que son métodos más directos y fáciles de cuantificar en menor tiempo, aunque muchos de sus efectos pueden ser temporales (Baenas et al., 2014).

### 4.2 Efectos de elicitores hormonales de defensa contra *B. cinerea*

Dentro de la prueba con el elicitador Metil Jasmonato (MeJA) hubo una diferencia significativa con una concentración 0,1 mM. Esto podría deberse a que MeJA es un regulador de la fisiología de la planta, el cual es aplicado en cultivos postcosecha, desempeñando un papel importante en la comunicación y señalización de la respuesta de defensa de la planta contra patógeno necrotróficos mediante el incremento de metabolitos secundarios y actividad antioxidante (Reyes et al., 2016). Se ha reportado que su aplicación exógena en postcosecha en rosas cortadas y flores de cera ha incrementado la resistencia contra *Botrytis cinerea* disminuyendo el área de lesión artificial como natural (Eyre et al., 2006). Otro factor podría ser un aumento del contenido de antocianinas en los pétalos tras la implementación del

elicitador, pues se puede tener un efecto inhibitorio frente al patógeno (Hasanzadeh et al., 2021).

En el tratamiento con Acido Salicílico (Figura 5c) se obtuvo una inducción de susceptibilidad hacia *Botrytis cinerea*. Uno de los factores que podrían estar afectando es que el Ac. Salicílico incrementa la expresión del gen *Bscpl1* que es de una proteína del secretoma de *B. cinerea* y contribuye con su virulencia (Frías, González & Brito, 2011). Dentro de un estudio realizado en Corea donde se aplicó Ác. Salicílico a botones de rosas de forma exógena se constató que aquellos tratamientos con Ac. Salicílicos indujeron un mayor grado de expresión de genes de virulencia lo que provocó susceptibilidad frente a *B. cinerea* en comparación con el control bajo una inoculación artificial del patógeno (Ha et al., 2021). De igual forma la susceptibilidad pudo deberse a un debilitamiento fisiológico de la planta, pues se ha demostrado que tras la aplicación de Ác. Salicílico la planta tiende a cerrar sus estomas, tener una tasa de transpiración baja e incrementa la temperatura de sus hojas (Gudesblat et al., 2009, Oerke et al., 2006, Prodhan et al., 2018).

Para el tratamiento con el etefón no se observó ninguna diferencia significativa conforme los resultados presentados. Sin embargo, hubo un efecto de susceptibilidad hacia dos concentraciones (Tabla 1). Se debe considerar que el etefón es un regulador de crecimiento que promueve la liberación de etileno, además de incrementar la síntesis y contenido de antocianinas en manzanas (An et al., 2018). Por ende, se podría considerar que el etileno liberado podría incrementar la virulencia de *B. cinerea* dentro de la rosa ya que se conoce que es un cultivo sumamente sensible a exposiciones de ET (Dole et al., 2017). Ahora bien, dentro de la bibliografía consultada nos presentan varios efectos que tiene el etefón dentro de los cultivos. Dong et al. Presenta al etefón como un inductor de la vía del Jasmonato que protege a las uvas contra *B. cinerea* (2020). No obstante, Kępczyńska realizó

un ensayo en el cual se induce del crecimiento de las hifas de *B. cinerea* en ensayos *in vitro* bajo ciertas concentraciones (1992).

#### **4.3 Hormonas de crecimiento como inductores de diferentes rutas de señalización contra patógenos necrótrofos (*B. cinerea*)**

El tratamiento con auxinas fue el tratamiento que mayor reducción del área de lesión tuvo con una disminución del 40% (Tabla 1) de la lesión de *B. cinerea* con respecto al control positivo. Esto podría deberse a que la IAA junto con la coronatina (COI) suprimen las defensas mediadas por la vía del SA (Kunkel & Harper, 2018) que como se mencionó, es una vía de señalización que otorga resistencia hacia patógenos biotróficos o hemibiotróficos. La supresión de señalización de SA puede estar relacionada con la vía de señalización de JA, debido al antagonismo que puede existir entre estas dos vías (Pieterse et al., 2012). Por tanto, puede que nuestros resultados demuestren la supresión de SA y activación de señalización de JA promoviendo una resistencia significativa frente a *B. cinerea*. Una observación adicional es respecto al IAA quien tuvo mayor impacto que el MeJA conocido como un elicitador que induce resistencia a *B. cinerea*, esta diferencia se puede discutir dentro de la metodología donde el ensayo de infección se los desarrolla en el pétalo y puede existir un incremento de contenido de antocianinas lo cual puede favorecer la resistencia de la rosa (Schaefer, Rentzsch & Breuer, 2008).

Por otra parte, en las pruebas con citoquininas (CK) se obtuvo un descenso del área de lesión en todos los tratamientos, destacando aquel con 1,11 mM. Esto se puede atribuir a que las citoquininas al ser aplicadas de forma exógena pueden activar diferentes niveles de expresión de genes de defensa vinculados al ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Chang et al., 2021) los cuales se han relacionado con la defensa contra necrótrofos. Adicionalmente, se ha visto una actividad antifúngica por parte de las citoquininas (CK) ya puede lograr inhibir el crecimiento, desarrollo y virulencia de algunos fitopatógenos fúngicos (Gupta et al., 2021).

Por ende, nuestros resultados revelan que, mediante una hidratación de CKs a una concentración de 1,11 mM se puede controlar las lesiones causadas por *B. cinerea* en rosas postcosecha.

Finalmente, en el tratamiento con giberelinas (GA), se obtuvo una diferencia significativa de reducción del área de lesión entre las concentraciones de 1.0 mM y 2.0 mM. Aun así, dentro de la bibliografía se considera que el tratamiento con giberelinas al 1.0 mM aplicadas de forma exógena logra disminuir la severidad de la enfermedad (Shaul, Elad & Zieslin, 1995). Por tanto, debemos considerar que nuestra metodología fue diferente (Figura 1) y los resultados pueden variar dependiendo de la forma de aplicación pues dentro de nuestro estudio se dio una aplicación por hidratación mas no fue realmente directa. Sin embargo, se constata que a mayores concentraciones de giberelinas se tiene una supresión del hongo (Sharon et al., 2007). Lo cual podría explicarse con la relación entre el Ác. Giberelico y la vía del JA pues participan en sinergia para el desarrollo de la planta (Gupta & Chakrabarty, 2013).

## 5. CONCLUSIONES

En la revisión sistemática se evidenció que el 76% de investigaciones se dan con elicitores naturales, ya que varios son extractos o proceden de microorganismos presentes en el ambiente. Además el 30% de los estudios fueron en tomate al ser un cultivo susceptible al fitopatógeno y tener importancia económica mundial. Asimismo, permitió advertir la situación actual del uso de elicitores frente a *Botrytis cinerea* en los cultivos de rosas donde las investigaciones son menores del 2%. De igual forma el tipo de aplicación que más resalto fue mediante spray, en el 51% de los estudios; dando paso a la innovación sobre la aplicación de elicitores por hidratación.

En las pruebas con hormonas de defensa se observó que el Metil Jasmonato (MeJA) reduce de forma significativa un 16% la lesión a una concentración de 0.1 mM. En contraste, el Ácido Salicílico (AS) a una concentración de 2.0 mM logró el incremento del área de lesión de forma significativa en un 10% con respecto al grupo control. Estos tratamientos nos permiten observar el antagonismo que poseen las vías del JA y SA, además de su interacción frente a diferentes ataques fitopatógenos.

Por otro lado, en las pruebas con hormonas de crecimiento se obtuvo el mayor porcentaje de reducción de lesión con Ácido Indol-acético (IAA) del 40,2% de disminución en comparación con el control. Al mismo tiempo, los datos estadísticos de citoquininas tuvieron una reducción del 14,18% del área de lesión.

Finalmente, tras todas las pruebas realizadas con sus respectivos análisis estadísticos y discusiones sustentadas con literatura, dentro del estudio se observó la dinámica de las vías de Ácido Jasmónico- Ácido Salicílico y como las hormonas de crecimiento se han visto relacionadas con las rutas de JA y etileno (ET) tanto para el desarrollo de la planta como para la inducción de sus defensas.



## TABLAS

Tabla 1. Promedios de área de lesión con cada tratamiento hormonal

Elicitores		Áreas de Lesión			
		C1	C2	C3	Control
Hormonales de defensa	<b>MeJA</b>	9,77 ± 0,76 <sup>b</sup>	8,75 ± 0,24 <sup>c</sup>	9,53 ± 0,42 <sup>b</sup>	10,40 ± 0,38 <sup>a</sup>
	<b>AS</b>	10,23 ± 0,80 <sup>b</sup>	10,13 ± 1,19 <sup>b</sup>	11,38 ± 1,3 <sup>a</sup>	10,39 ± 0,39 <sup>b</sup>
	<b>Etefón</b>	9,92 ± 1,60 <sup>a</sup>	9,32 ± 2,22 <sup>a</sup>	10,39 ± 2,87 <sup>a</sup>	9,74 ± 1,48 <sup>a</sup>
Hormonas de crecimiento	<b>Auxinas</b>	6,65 ± 1,00 <sup>c</sup>	8,73 ± 1,31 <sup>b</sup>	7,85 ± 1,63 <sup>b</sup>	11,12 ± 3,36 <sup>a</sup>
	<b>Citoquininas</b>	8,41 ± 3,00 <sup>b</sup>	9,41 ± 1,90 <sup>ab</sup>	8,75 ± 2,42 <sup>ab</sup>	9,8 ± 2,88 <sup>a</sup>
	<b>Giberelinas</b>	8,75 ± 1,13 <sup>ab</sup>	9,34 ± 1,26 <sup>a</sup>	8,45 ± 1,57 <sup>b</sup>	9,26 ± 2,00 <sup>ab</sup>

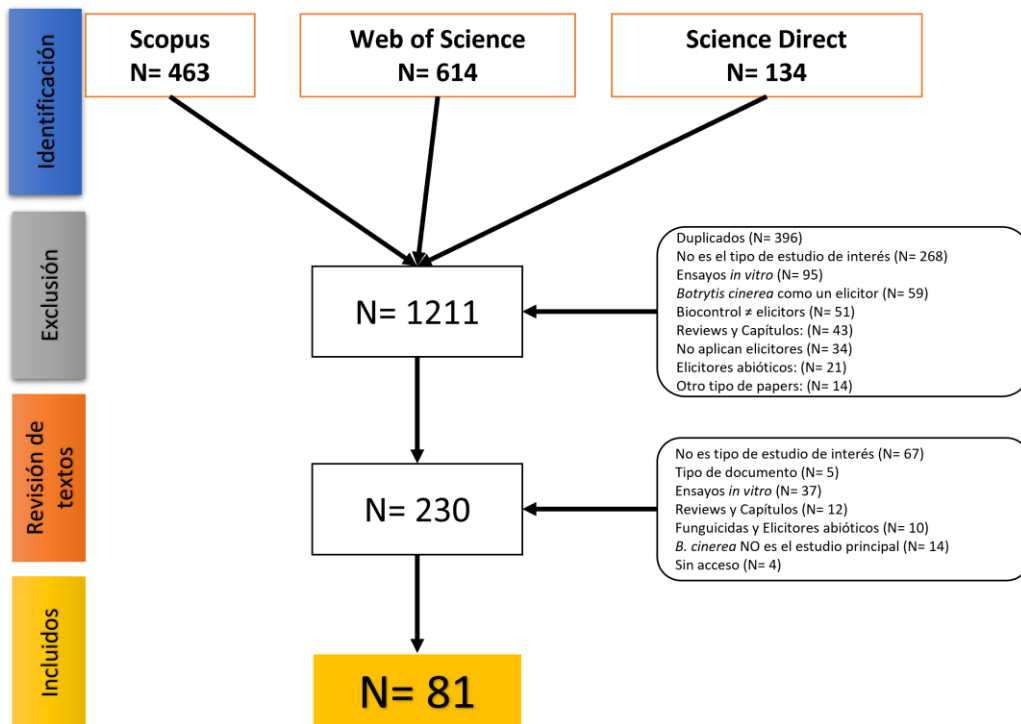
Promedios de áreas de lesión obtenidos tras el análisis de 45 pétalos tratados en diferentes concentraciones (C1-C3) para cada tratamiento y su control. Promedios en la columnas con letras distintas son significativamente diferentes en referencia a prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 7. FIGURAS



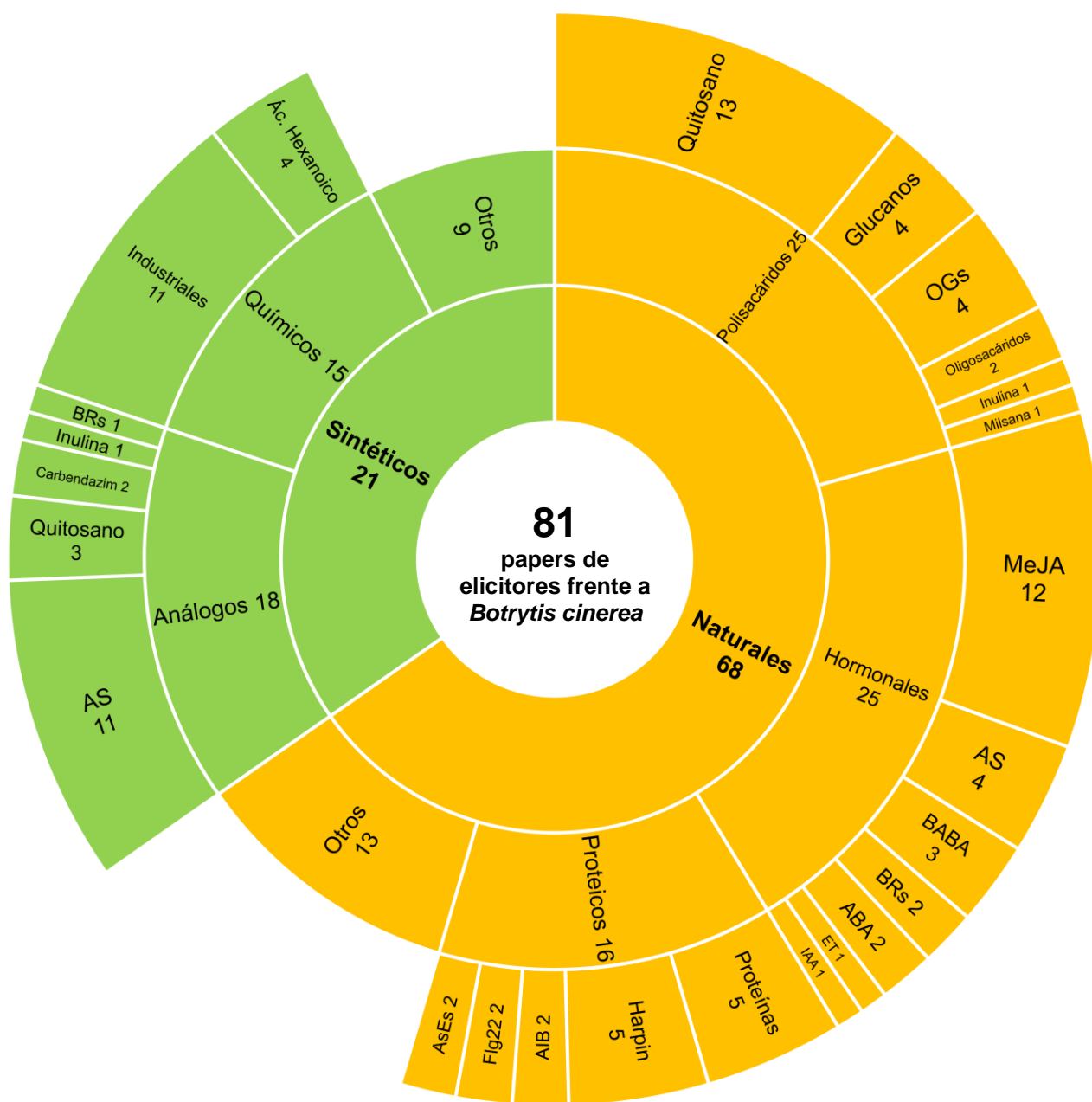
**Figura 1.** Metodología de la prueba de eficacia

Descripción: Esquematización en el que se muestra todos los pasos implementados para llevar a cabo las pruebas con cada uno de los elicitores tanto de defensa como de crecimiento. Este proceso constó de cuatro pasos: material vegetal y tratamientos; aislamiento y preparación de inóculo; ensayo de infección y análisis de datos.



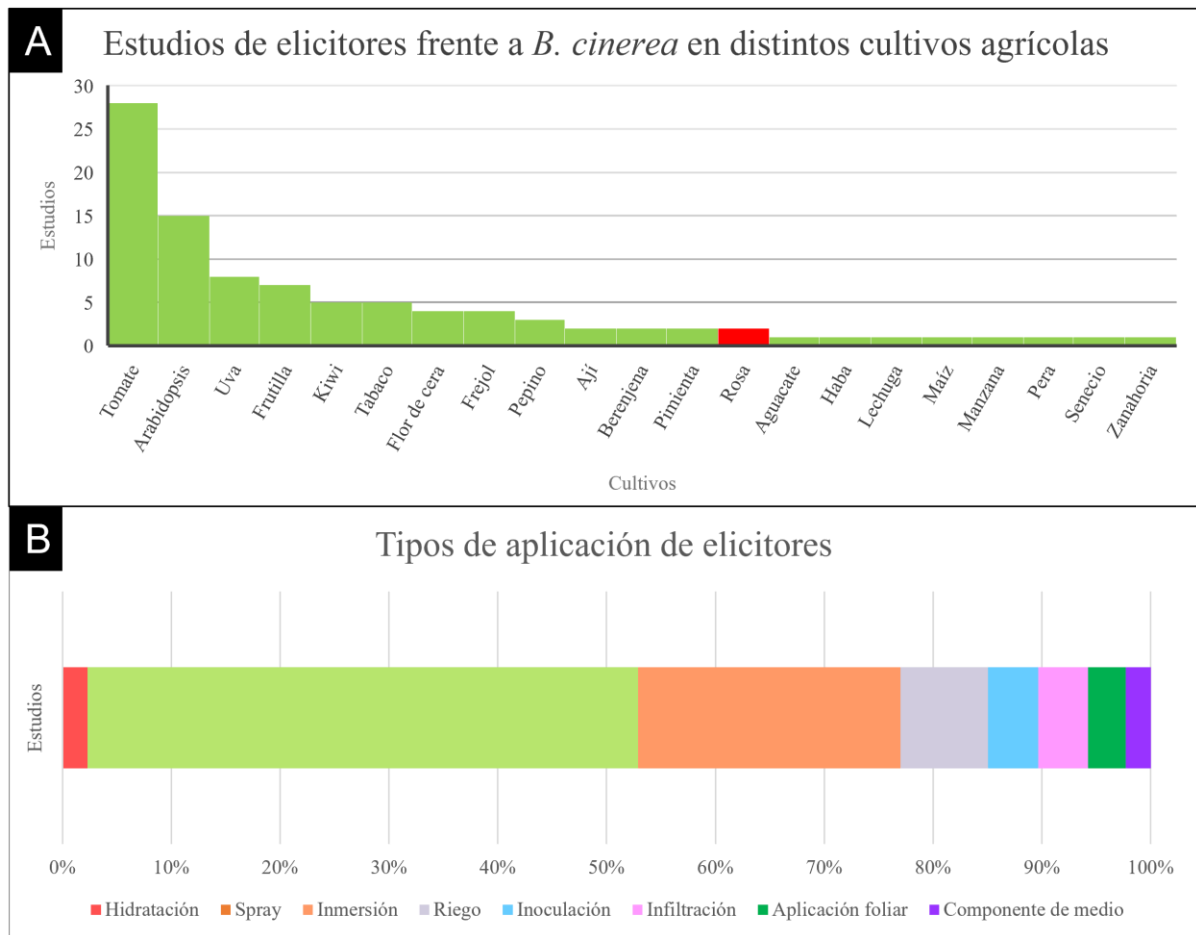
**Figura 2.** Metodología de la Revisión Sistemática

Descripción: En la presente figura se observa el flujo que detalla cada uno de los pasos seguidos para la obtención de estudios de interés en respuesta hacia el efecto de los elicitores sobre *Botrytis cinerea*. Donde en cada nivel se ilustran cada uno de los criterios de exclusión tras cada screening



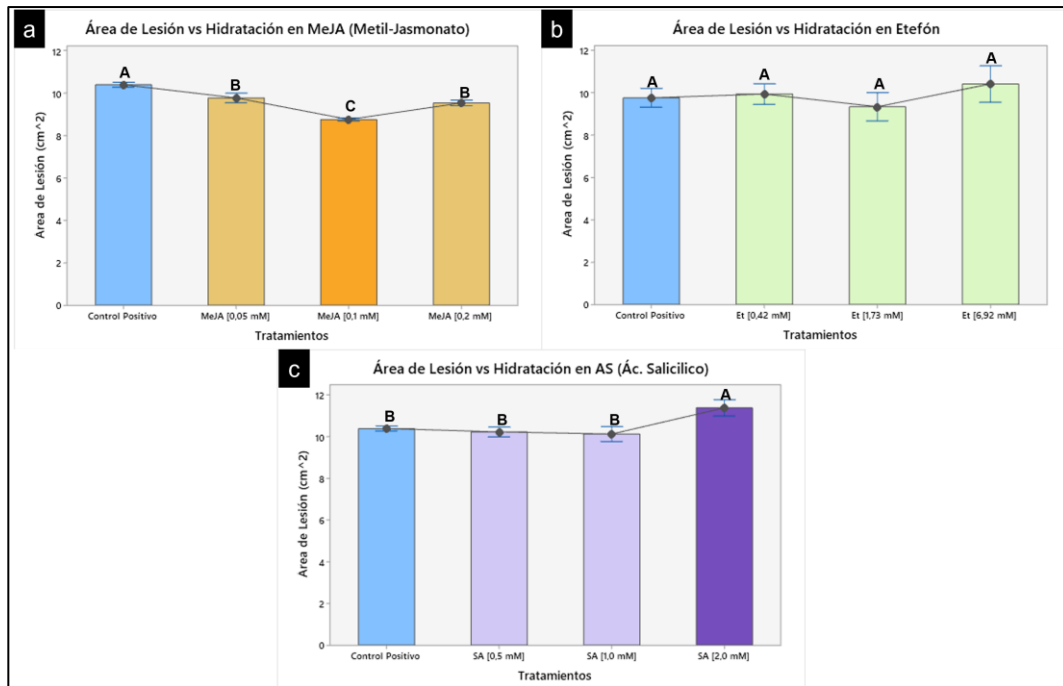
**Figura 3.** Conteo y categorización de estudios obtenidos tras la Revisión Sistemática.

Descripción: Gráfico de resumen sobre los estudios encontrados tras la separación en categorías diferentes y cada uno de los conteos se encuentra a un lado de las categorías presentadas.



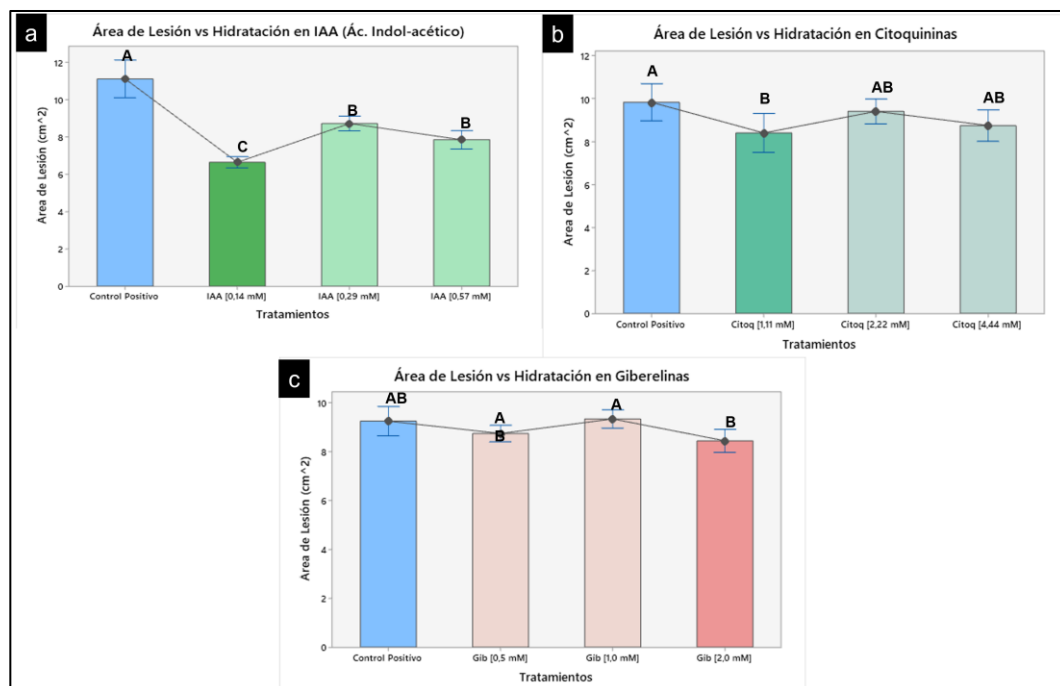
**Figura 4.** Cultivos y tipos de aplicaciones de elicitors frente a *Botrytis cinerea*.

Descripción: (a) Cultivos con mayor número de investigaciones con prueba de elicitors y (b) los tipos diferentes de aplicación de elicitors en cultivos agrícolas o de interés experimental



**Figura 5.** Estadísticas de las pruebas de eficacia

Descripción: La figura muestra las estadísticas obtenidas con MeJA (a), Etefón (b) y AS(c) con elicitores hormonales de defensa a diferentes concentraciones y evaluados con prueba estadísticas ANOVA y Tukey ( $p < 0,05$ ) e intervalos de error.



**Figura 6.** Estadísticas de las pruebas de eficacia con hormonas de crecimiento

Descripción: La figura muestra las estadísticas obtenidas con auxinas (IAA), citoquininas y giberelinas como elicitores a diferentes concentraciones y evaluados con prueba Tukey

( $p < 0,05$ ) e intervalos de error.

## 8. REFERENCIAS

- Amaya Oñate, E. A. (2021). *Control de botrytis (Botrytis cinerea), con fungicidas en pos cosecha de rosas, en la empresa Royal Flowers-Mulaló* (Master's thesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; UTC.).
- An, J. P., Wang, X. F., Li, Y. Y., Song, L. Q., Zhao, L. L., You, C. X., & Hao, Y. J. (2018). EIN3-LIKE1, MYB1, and ETHYLENE RESPONSE FACTOR3 act in a regulatory loop that synergistically modulates ethylene biosynthesis and anthocyanin accumulation. *Plant Physiology*, 178(2), 808-823.
- Aponte Guano, D. R. (2015). *El oído (Sphaerotheca pannosa) con su método de control biológico en el cultivo de la rosa (Rosa sp.)* (Bachelor's thesis).
- Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19(9), 13541-13563.
- Chang, L., Li, B., Wang, R., Wang, S., & Zhang, J. (2021). Diversified Regulation of Cytokinin Levels and Signaling During *Botrytis cinerea* Infection in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 12, 23.
- Corporación Financiera Nacional. (2021). *FICHA SECTORIAL: Cultivo de flores*. CFN. [https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2020/ficha-sectorial-3-trimestre-2020/FS\\_Cultivo-de-Flores\\_3T2020.pdf](https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2020/ficha-sectorial-3-trimestre-2020/FS_Cultivo-de-Flores_3T2020.pdf)
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual review of plant biology*, 48(1), 355-381.
- De Stigter, H. C. M. (1980). Ethephon effects in cut'Sonia'roses after pretreatment with silver thiosulfate. In *II International Symposium on Post-harvest Physiology of Cut Flowers 113* (pp. 27-32).
- Dik, A. J., & Wubben, J. P. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 319-333). Springer, Dordrecht.
- Dole, J., Stamps, B., Carlson, A., Ahmad, I., Greer, L., & Laushman, J. (2017). *Postharvest handling of cut flowers and greens*. ASCFG Press, Oberlin, OH. p. 302– 303
- Dong, T., Zheng, T., Fu, W., Guan, L., Jia, H., & Fang, J. (2020). The effect of ethylene on the color change and resistance to *Botrytis cinerea* infection in 'kyoho' grape fruits. *Foods*, 9(7), 892.
- Eyre, J. X., Faragher, J., Joyce, D. C., & Franz, P. R. (2006). Effects of postharvest methyl jasmonate treatments against *Botrytis cinerea* on Geraldton waxflower (*Chamaelucium uncinatum*). *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(5), 717-723.



- Flores Aulestia, E. M. (2015). *Respuesta del cultivo de rosa (Rosa sp.), a tres fuentes de fosfitos en aplicación al suelo y follaje como inductores de resistencia y calidad de flor*. Ayora, Pichincha (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Frías, M., González, C., & Brito, N. (2011). BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist*, 192(2), 483-495.
- González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N., & Bouarab, K. (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid–aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant Cell*, 24(2), 762-777.
- Gudesblat, G. E., Torres, P. S., & Vojno, A. A. (2009). Stomata and pathogens: warfare at the gates. *Plant signaling & behavior*, 4(12), 1114-1116.
- Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant signaling & behavior*, 8(9), e25504.
- Gupta, R., Anand, G., Pizarro, L., Laor, D., Kovetz, N., Sela, N., & Bar, M. (2021). Cytokinin inhibits fungal development and virulence by targeting the cytoskeleton and cellular trafficking. *bioRxiv*, 2020-11.
- Ha, S. T. T., Kim, Y. T., & In, B. C. (2020). Assessment of Preservative Solutions for Reducing *Botrytis cinerea* Infection in Cut Roses. *화훼학연구*, 28(4), 279-284.
- Hasanzadeh-Naemi, M., Jari, S. K., Zarrinnia, V., & Fatehi, F. (2021). The effect of exogenous methyl jasmonate and brassinosteroid on physicochemical traits, vase life, and gray mold disease of cut rose (*Rosa hybrida* L.) flowers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 20(7), 467-475.
- Herrera Romero, J. I. (2015). *Evaluación de recubrimientos y fungicidas naturales para el control postcosecha de Botrytis cinerea en rosas (Rosa sp.) variedad Vendela* (Bachelor's thesis, Quito: USFQ, 2015).
- Hidalgo Dávila, J. L. (2017). *La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola: El sector florícola ecuatoriano* (Master's thesis, Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador).
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111-119.
- Jamiołkowska, A. (2020). Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy*, 10(2), 173.
- Jamiołkowska, A. (2020). Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy*, 10(2), 173.
- Kępczyńska, E. (1993). Involvement of ethylene in the regulation of growth and development of the fungus *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. *Plant growth regulation*, 13, 65-69.

- Khan, R. U., Khan, M. S., Rashid, A., & Farooq, A. (2007). Effect of exogenous indole-3-acetic acid and naphthalene acetic acid on regeneration of damask rose cuttings in three growing media. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, *10*(20), 3626-3631.
- Kunkel, B. N., & Harper, C. P. (2018). The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. *Journal of Experimental Botany*, *69*(2), 245-254.
- Lukaszewska, A. J., & Barthe, P. (1995). The effect of exogenous cytokinins on longevity of cut roses. In *VI International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants 405* (pp. 422-426).
- Meir, S., Droby, S., Davidson, H., Alsevia, S., Cohen, L., Horev, B., & Philosoph-Hadas, S. (1998). Suppression of Botrytis rot in cut rose flowers by postharvest application of methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology*, *13*(3), 235-243
- Monaghan, J., & Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current opinion in plant biology*, *15*(4), 349-357.
- Moreno-Escamilla, J. O., Alvarez-Parrilla, E., Laura, A., Núñez-Gastélum, J. A., González-Aguilar, G. A., & Rodrigo-García, J. (2018). Effect of elicitors in the nutritional and sensorial quality of fruits and vegetables. In *Preharvest Modulation of Postharvest Fruit and Vegetable Quality* (pp. 71-91). Academic Press.
- Moustafa-Farag, M., Almoneafy, A., Mahmoud, A., Elkelish, A., Arnao, M. B., Li, L., & Ai, S. (2020). Melatonin and its protective role against biotic stress impacts on plants. *Biomolecules*, *10*(1), 54.
- Oerke, E. C., Steiner, U., Dehne, H. W., & Lindenthal, M. (2006). Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *Journal of experimental botany*, *57*(9), 2121-2132.
- Orellana Vinueza, E. A. (2011). *Análisis de la interacción Rosa spp.-Botrytis cinerea Pers.: sintomatología, análisis de la expresión de genes de resistencia" in planta" y proceso de infeccioso del patógeno* (Bachelor's thesis, Quito/PUCE/2011).
- Patel, Z. M., Mahapatra, R., & Jampala, S. S. M. (2020). Role of fungal elicitors in plant defense mechanism. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 143-158). Academic Press.
- Petrasch, S., Silva, C. J., Mesquida-Pesci, S. D., Gallegos, K., Van Den Abeele, C., Papin, V., ... & Blanco-Ulate, B. (2019). Infection strategies deployed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium acuminatum*, and *Rhizopus stolonifer* as a function of tomato fruit ripening stage. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 223.
- Pincay, A., Noboa, M., Viera, W., Herrera, K., León, A., & Jackson, T. (2021). Evaluación in vitro del potencial antagonista de *Trichoderma* sp. y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus* Benth) para el control de *Botrytis cinerea*. *Journal of Science and*

*Research*, 6(1), 109 - 124. Recuperado a partir de <https://revistas.utb.edu.ec/index.php/sr/article/view/895>

- Plaza, V., Bustamante, C., Silva-Moreno, E., & Castillo, L. (2018). First report of *Botrytis cinerea* causing gray mold disease on the endemic plant *Echinopsis coquimbana* in the Coquimbo Region, Chile. *Plant Disease*, 102(7), 1448.
- Prodhan, M. Y., Munemasa, S., Nahar, M. N. E. N., Nakamura, Y., & Murata, Y. (2018). Guard cell salicylic acid signaling is integrated into abscisic acid signaling via the Ca<sup>2+</sup>/CPK-dependent pathway. *Plant physiology*, 178(1), 441-450.
- Restrepo, F. (2010). Manual de manejo de *Botrytis cinerea* en Rosas. *Ediciones ceniflores. Bogota-Colombia*, 120.
- Reyes-Díaz, M., Lobos, T., Cardemil, L., Nunes-Nesi, A., Retamales, J., Jaakola, L., & Ribera-Fonseca, A. (2016). Methyl jasmonate: An alternative for improving the quality and health properties of fresh fruits. *Molecules*, 21(6), 567.
- Saito, S., Michailides, T. J., & Xiao, C. L. (2019). Fungicide-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* populations and their impact on control of gray mold on stored table grapes in California. *European Journal of Plant Pathology*, 154(2), 203-213.
- Schaefer, H. M., Rentzsch, M., & Breuer, M. (2008). Anthocyanins reduce fungal growth in fruits. *Natural Product Communications*, 3(8), 1934578X0800300808.
- Sharon, A., Elad, Y., Barakat, R., & Tudzynski, P. (2007). Phytohormones in *Botrytis*-plant interactions. In *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 163-179). Springer, Dordrecht.
- Shaul, O., Elad, Y., & Zieslin, N. (1995). Suppression of *Botrytis* blight in cut rose flowers with gibberellic acid: effects of postharvest timing of the gibberellin treatment, conidial inoculation and cold storage period. *Postharvest Biology and Technology*, 6(3-4), 331-339.
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews Immunology*, 12(2), 89-100.
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Trejo, C., & Katterine, C. (2018). *Evaluación del método mecánico con capuchones para el control de Botrytis cinerea en el cultivo de rosa (Rosa sp)* (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI).
- Túqueres Álvarez, L. E. (2016). *Respuesta del cultivo de rosa (Rosa sp.) a la aplicación de trichoderma (Trichoderma harzianum) para el manejo de botrytis (Botrytis cinerea)* *Pers. Fr* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial pathogenesis*, 124, 198-202.

## ANEXO 1: Microscopía de *Botrytis cinerea*

### Evaluación y correlación de métodos de la medición.

Para la microscopía se aisló *Botrytis cinerea* de un pétalo de rosa infectado de forma natural mediante una pieza de cinta Scotch transparente. Se procedió a colocar una gota de Azul de Metileno en una placa de vidrio y se colocó la cinta con el patógeno aislado. Se procedió a utilizar un programa de medición incorporado en el microscopio del Laboratorio de Agrobiotecnología de la USFQ. Aquí se tomó datos de medición de largo y ancho de 30 conidias, así como del largo de 30 conidioforos. Se sacó un promedio de cada uno con su desviación estándar respectiva y se comparó los resultados obtenidos con bibliografía consultada sobre primeros reportes de este fitopatógeno en otros cultivos (Figura adjunta A). La fuente literaria consultada para esta comparación fue de Plaza et al., 2018.

Parámetros		(Plaza et al, 2018)	Aislado presente
Conidia	Largo (µm)	7,9-12	8,96 ± 1,52
	Ancho (µm)	6,4-9,5	6,60 ± 1,29
Conidioforo	Largo (µm)	16-32	27,40 ± 4,82
Forma de Conidia		Elipsoidal y ovoide	Ovoide

➤ Se corroboró que el aislado de los pétalos de rosa fue *Botrytis cinerea*



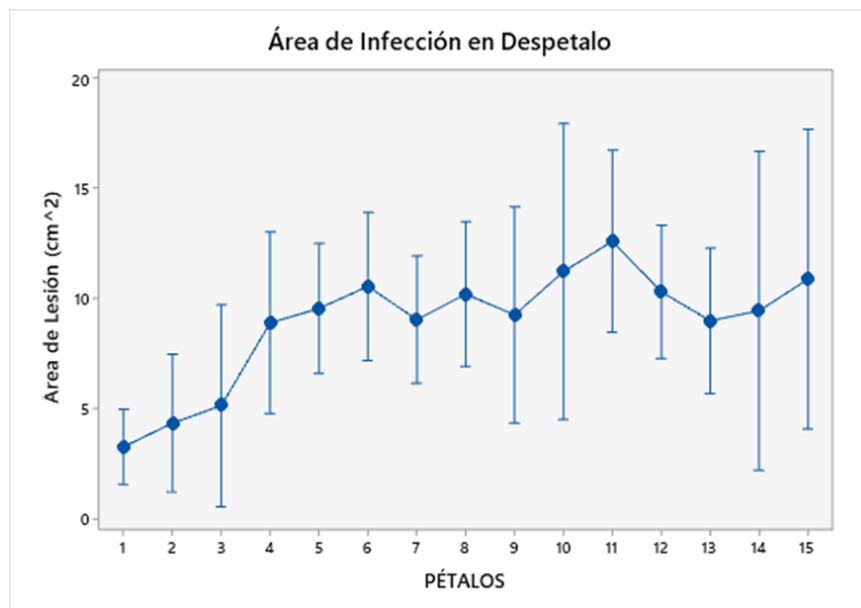
**Figura adjunta A.** Microscopía de *Botrytis cinerea* aislada del pétalo de un rosa cv Vendela

## ANEXO 2: Optimización del ensayo de infección

### Optimización de infección en pétalos de rosa

Para optimizar la infección de los pétalos de rosa se tomaron cuatro rosas a las cuales se despetaló los primeros 15 pétalos. Se los colocó dentro de una cámara húmeda donde se formó 4 bloques esquematizados a manera de 3 filas con 5 pétalos cada una. Cada pétalo fue inoculado con una gota de 5  $\mu\text{l}$  de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ .

Tres días después de la inoculación se midió el área de lesión de cada uno de los pétalos mediante el software ImageJ. Los datos obtenidos fueron evaluados en un gráfico de intervalos mediante el software Minitab 19 (Figura adjunta B) donde se observó que los tres primeros pétalos no tenían una infección similar a los demás pétalos a partir del cuarto.

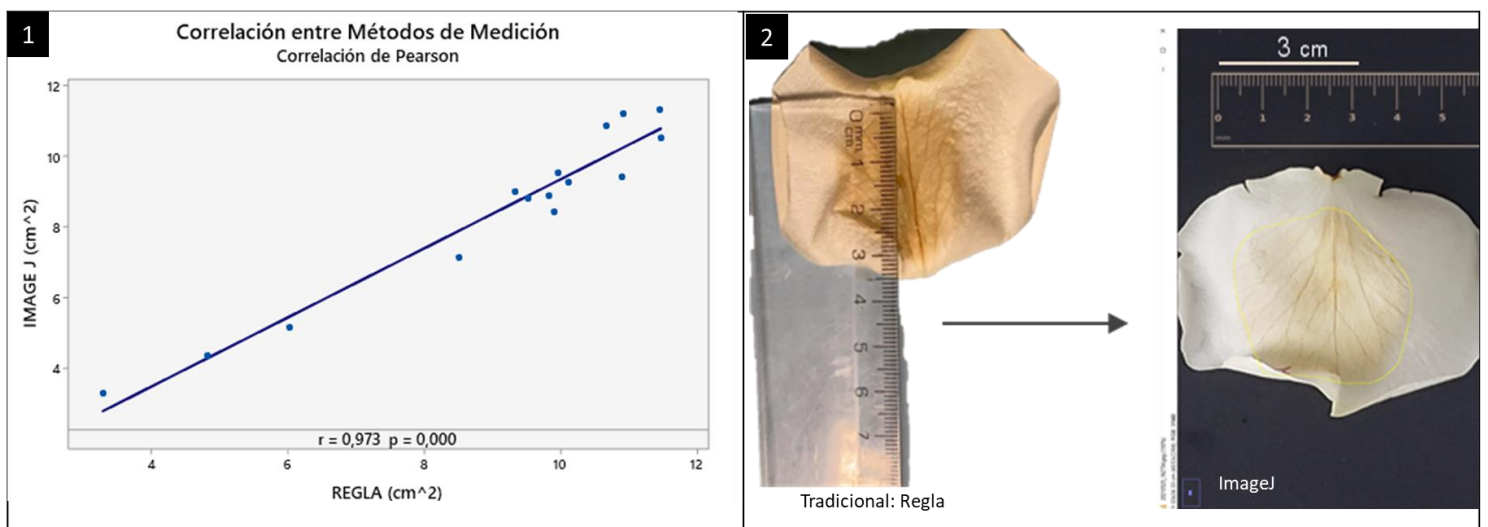


**Figura adjunta B.** Evaluación de infección para despétalo de los tres primeros pétalos que poseen diferente área de lesión con respecto al resto.

### ANEXO 3: Optimización del método de medida del área de lesión

#### Evaluación y correlación de métodos de la medición.

Se tomaron cuatro rosas a las cuales se despetaló los primeros 15 pétalos. Se los colocó dentro de una cámara húmeda donde se formó 4 bloques esquematizados a manera de 3 filas con 5 pétalos cada una. Cada pétalo fue inoculado con una gota de  $5 \mu\text{l}$  de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Tres días después de la inoculación se tomaron dos tipos de mediciones del área de lesión. La primera fue con una regla donde se midió el largo y el ancho de la lesión (Figura adjunta C2), mientras que la segunda medición fue mediante la toma de fotos que fueron procesada por el software ImageJ. Los datos obtenidos fueron evaluados con un gráfico de correlación entre los dos métodos de medición a través el software Minitab 19. Obteniendo un 97% de correlación entre ambos métodos de medición (Figura adjunta C1).



**Figura adjunta C.** (1) Correlación entre métodos de medición con correlación del 97%. (2) comparando el método por medio de una regla y el software ImageJ