



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DIAGNOSTICAR *Botrytis cinerea*
MEDIANTE EL SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA BIOLOG, Y EL
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL ENSAYO MEDIANTE ANÁLISIS
GENÉTICO**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

AUTOR: GRACE VANESSA PALLARES CASTRO

TUTOR: ANDREA DENISSE BENÍTEZ QUINTANA

Quito-Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Grace Vanessa Pallares Castro con documento de identificación N° 1718582164 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 15 de febrero del año 2023

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, reading "Grace Pallares", is written above a solid horizontal line.

Grace Vanessa Pallares Castro

1718582164

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Grace Vanessa Pallares Castro con documento de identificación No. 1718582164, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Validación del método analítico para diagnosticar *Botrytis cinerea* mediante el sistema de identificación microbiana BIOLOG, y el aseguramiento de la calidad del ensayo mediante análisis genético”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 15 de febrero del año 2023

Atentamente,



Grace Vanessa Pallares Castro

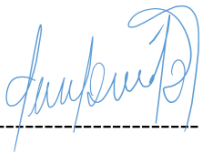
1718582164

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Andrea Denisse Benítez Quintana con documento de identificación N° 1709194938, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Validación del método analítico para diagnosticar *Botrytis cinerea* mediante el sistema de identificación microbiana BIOLOG, y el aseguramiento de la calidad del ensayo mediante análisis genético”, realizado por Grace Vanessa Pallares Castro con documento de identificación N° 1718582164, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 15 de febrero del año 2023

Atentamente,



Lic. Andrea Denisse Benítez Quintana, M.Sc.

1709194938

Resumen

AGROCALIDAD es la Agencia encargada de la regulación y control de la sanidad del sector agropecuario y la inocuidad de los alimentos en la producción primaria. Para garantizar la calidad e inocuidad de la producción agropecuaria, implementa planes, programas y proyectos de sanidad vegetal que apoyan los flujos comerciales y contribuyen con la soberanía alimentaria (AGROCALIDAD, 2018).

El laboratorio de Fitopatología cuenta con la acreditación en bacterias y virus por lo que busca la acreditación para garantizar la competencia técnica en sus ensayos en hongos utilizando el sistema de identificación microbiana BIOLOG, el cual se basa en la identificación de microorganismos mediante el perfil metabólico utilizando diferentes fuentes de carbono.

El objetivo general del presente trabajo de investigación fue la validación del método analítico para el diagnóstico de *Botrytis cinerea* mediante el sistema de identificación microbiana BIOLOG y el aseguramiento de la calidad del ensayo mediante análisis genético, en esta validación se aplicaron los criterios de la Norma ISO/IEC 17025 y los criterios generales de acreditación del SAE. Para el estudio primero se realizó un análisis de la base de datos del laboratorio con el fin de notar la presencia y persistencia del patógeno en las diferentes provincias del país, después se precisó aislar, identificar y conservar cepas de *Botrytis* sp. que afectan a diferentes cultivos, mediante la aplicación de técnicas morfológicas, morfométricas, bioquímicas, de inmunoensayo y moleculares; finalmente, se desarrolló la validación del método y el aseguramiento de la calidad del ensayo, identificando las limitaciones e influencias que puedan afectar al analito.

Esta investigación concluyó con la identificación positiva del patógeno en todos los ensayos realizados principalmente en el sistema de identificación microbiana BIOLOG.

Palabras clave: AGROCALIDAD, acreditación, persistencia del patógeno, identificación molecular.

Abstract

AGROCALIDAD is the Agency in charge of the regulation and control of the agricultural sanitation and food safety in primary production. To guarantee the quality and safety of agricultural production, it implements plans, programs and projects for plant sanitation that support trade flows and contribute to food sovereignty (AGROCALIDAD, 2018). The Phytopathology Laboratory has the accreditation for bacteria and viruses identification, so it seeks accreditation to guarantee technical competence in its fungal tests using the BIOLOG microbial identification system, which is based on the identification of microorganisms through their metabolic profile using different carbon sources. The general objective of this research was to validate the analytical method for the diagnosis of *Botrytis cinerea* through the MICROBIAL IDENTIFICATION SYSTEM BIOLOG and ensure the quality of the assay through genetic analysis. For this validation, the ISO/IEC 17025 Standard criteria and the general accreditation criteria of the SAE were applied. A search through the laboratory database was initially carried out in order to determine the presence and persistence of the pathogen in different provinces of the country. An isolation, identification and preservation of *Botrytis* sp. strains which affect several types of crop was necessary. This was achieved through the application of morphological, morphometric, biochemical, immunoassay and molecular techniques. Finally, the validation of the method and the assurance of the quality of the test was obtained, identifying the limitations and parameters that may affect the analyte. This research concluded with the positive identification of the pathogen in all the assays carried out mainly in the MICROBIAL IDENTIFICATION SYSTEM BIOLOG

Keywords: AGROCALIDAD, accreditation, pathogen persistence, molecular identification.

Índice de Contenido

Capítulo I.....	3
1. Marco Teórico.....	3
1.1. Norma ISO/IEC 17025	3
1.2. Descripción del patógeno.....	4
1.2.1. Sistemática.....	4
1.2.2. Morfología	6
1.2.3. Distribución geográfica.....	9
1.2.4. Rango de hospederos	9
1.2.5. Síntomas.....	10
1.2.6. Biología.....	10
1.2.7. Control	14
1.3. Métodos de diagnóstico	15
Capítulo II	23
2. Marco metodológico	23
2.1. Fase de campo.....	23
2.2. Fase de laboratorio.....	23
2.2.1. Protocolo de aislamiento, conservación y masificación del hongo	24
2.2.2. Protocolo morfológico y morfométrico	27
2.2.3. Protocolo bioquímico.....	27
2.2.4. Protocolo inmunoensayo.....	29
2.2.5. Protocolo molecular y análisis genético	30
2.2.6. Validación y aseguramiento de la calidad del ensayo	36
Capítulo III	40

3. Resultados y discusión.....	40
3.1. Análisis morfológico y morfométrico.....	42
3.2. Análisis bioquímico	47
3.3. Análisis inmunoensayo	48
3.4. Análisis molecular	50
3.5. Análisis de la Validación y del aseguramiento de la calidad del ensayo.....	57
Conclusiones	58
Recomendaciones.....	60
Bibliografía.....	1
ANEXOS.....	8

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Botrytis cinerea</i>	4
Tabla 2. Clave morfológicas y morfométricas para las especies de <i>Botrytis</i> spp. basada en descripciones macro y microscópicas	16
Tabla 3. Muestras seleccionadas para el proceso de validación	24
Tabla 4. Etapas de la prueba de inmunoensayo ELISA-LOEWEBLUE	30
Tabla 5. Detalle de las concentraciones de los reactivos y del programa de amplificación para cebadores ITS	33
Tabla 6. Detalle de las concentraciones de los reactivos y del programa de amplificación para cebadores C729 +/-.....	33
Tabla 7. Detalle de las concentraciones de los reactivos y del programa de amplificación para cebadores BC108+ y BC563-.....	33
Tabla 8. Definición diseño experimental: (analista/día x aislado).....	36
Tabla 9. Diagrama de distribución para la determinación del porcentaje de sensibilidad y selectividad.....	37
Tabla 10. Esquema del proceso de identificación, diagnóstico y validación de <i>B. cinerea</i>	39
Tabla 11. ANOVA de las magnitudes (largo y ancho) de 30 conidios (2 réplicas) por cada aislado con un nivel de significancia del 0,5% y comparación de medias de Tukey al 95%.....	44
Tabla 12. Datos de las probabilidades de lecturas (96 h) para la identificación de <i>B. cinerea</i> en las FF MicroPlates.....	47
Tabla 13. Datos obtenidos para la identificación de <i>B. cinerea</i> en el ensayo bioquímico.....	48

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>B. cinerea</i>	7
Figura 2. Estructuras fúngicas de <i>Botrytis cinerea</i>	7
Figura 3. Distribución geográfica de <i>Botrytis cinerea</i>	9
Figura 4. Esquema parcial del gen ADN ribosomal y sus espaciadores internos.	19
Figura 5. Diagrama de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 0,76 kb de <i>B. cinerea</i> (número de registro de EMBL AJ422103) y la ubicación de los cebadores C729+, C729– y BC108+ y BC563–	21
Figura 6. Diagnósticos realizados por provincia del género <i>Botrytis</i> sp. y la especie <i>B. cinerea</i>	40
Figura 7. Número de diagnósticos realizados por hospedero del género <i>Botrytis</i> spp..	40
Figura 8. Diagnósticos realizados por año del género <i>Botrytis</i> sp. y <i>B. cinerea</i>	41
Figura 9. Morfología de <i>Botrytis cinerea</i> en medio PDA.	42
Figura 10. Dispersión de los valores, largo de conidios.....	46
Figura 11. Dispersión de los valores, ancho de conidios	47
Figura 12. Electroforesis del producto PCR para la amplificación de regiones ITS. ...	50
Figura 13. Electroforesis del producto PCR, para la amplificación de regiones Bc.	51
Figura 14. Segmento del alineamiento múltiple para regiones ITS.	52
Figura 15. Árbol consenso en base a la región ITS.....	54
Figura 16. Segmento del alineamiento múltiple para las regiones Bc.	55
Figura 17. Árbol consenso en base a la región Bc.	56

Índice de Anexos

Anexo 1. Convenio Específico con la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – AGROCALIDAD	8
Anexo 2. Base de datos del género <i>Botrytis</i> spp.	17
Anexo 3. Sinónimos y agrupamiento taxonómico de <i>Botrytis cinerea</i> con sus respectivos años de publicación	24
Anexo 4. Especies huéspedes que son afectados por <i>B. cinerea</i>	26
Anexo 5. Plaguicidas categorizados y aceptados en el Ecuador para el control de <i>Botrytis</i> spp. y <i>B. cinerea</i>	31
Anexo 6. Clave dicotómica para la identificación de <i>Botrytis</i> spp.	37
Anexo 7. Muestras vegetales inoculadas con aislados puros de <i>B. cinerea</i>	38
Anexo 8. Panel de prueba FF MicroPlate™	39
Anexo 9. Base de datos del sistema de identificación microbiana.....	40
Anexo 10. Cultivos miceliares de <i>Botrytis cinerea</i> pertenecientes a la fototeca del sistema de identificación microbiana BIOLOG	44
Anexo 11. Perfiles metabólicos de <i>B. cinerea</i> del sistema Biolog's Microlog™	45
Anexo 12. Patrón electroforético de los marcadores de peso y concentración	46
Anexo 13 . Fotografías de los aislados fúngicos (prueba morfológica) y sus perfiles metabólicos correspondientes (prueba bioquímica).....	47
Anexo 14. Características morfológicas desarrolladas por los 33 aislados de <i>Botrytis</i> spp. durante 30 días en medios de cultivos PDA y EMA	50
Anexo 15. Hoja de resultados del sistema de identificación microbiana BIOLOG.....	55
Anexo 16. Tabla de distribución y datos primarios de las muestras del diagnóstico de inmunoensayo.....	56

Anexo 17. Análisis del proceso de validación	57
Anexo 18. Diagrama de distribución para la determinación del porcentaje de sensibilidad y especificidad.....	60
Anexo 19. Grado de concordancia en la veracidad	61

Introducción

El Laboratorio de Fitopatología que forma parte de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, es responsable del análisis de microorganismos fitopatógenos en material vegetal, suelo agrícola, agua de riego, biol, etc., mediante la aplicación de ensayos homologados bajo normas y estándares nacionales e internacionales tales como, los principios del Sistema de Gestión de Calidad establecidos en la Norma ISO/IEC 17025. Esta norma tiene por concepto planificar, controlar y mejorar los procesos de gestión del sistema, aplicando los argumentos descritos en la documentación relacionada con el alcance del sistema (ISO, 2022). El poseer un sistema de gestión de calidad permite plantear las bases, metas y actividades relacionadas con las políticas y objetivos de calidad, entre los cuales se incluye la propuesta de acreditación de nuevos procedimientos específicos de ensayo; el interés del laboratorio por validar un nuevo ensayo está en relación con el satisfacer las necesidades, expectativas y requisitos de las partes interesadas, lo cual implica proporcionar datos fiables y válidos permitiendo la emisión de resultados que demuestren su competencia técnica (SAE, 2022).

A nivel mundial los hongos fitopatógenos provocan múltiples daños en los cultivos, estas afectaciones estéticas cualitativas y cuantitativas provocan principalmente un perjuicio económico. Un fitopatógeno muy importante es *Botrytis cinerea* ya que geográficamente se encuentran distribuido en todos los continentes, afectando a cultivos de zonas templadas frías y áreas subtropicales. El rango de hospedadores de este hongo es muy amplio e incluye 170 familias (frutales, hortalizas, cultivos ornamentales, material de vivero, etc.). Además, probablemente es el responsable de la mayoría de las pudriciones que ocurren en productos almacenados, las cuales comienzan en el campo y al no ser detectados debido a su latencia permiten que se desarrollen posteriormente cuando las condiciones especiales de poscosecha del huésped son desfavorables, estableciendo que su control dependa tanto del manejo sanitario

de la precosecha como de la poscosecha (Jarvis, 1977). *B. cinerea* muestra una extraordinaria variabilidad de los rasgos fenotípicos, en particular, sobre los mecanismos que subyacen a su amplia variación y capacidad de adaptación, es decir, el sistema de apareamiento, el comportamiento sexual y otras fuentes, convirtiéndolo en un modelo para estudiar fuentes de variación en hongos filamentosos y en particular en patógenos de plantas, así como también una herramienta disponible para la manipulación genética (De Miccolis et al., 2016).

En la actualidad, Ecuador exporta frutas, hortalizas y flores entre ellas principalmente las rosas que resultan ser una de las especies más afectadas por *B. cinerea* debido a que ataca a los botones florales de exportación provocando una pérdida de hasta el 60% de la cosecha lo que da como consecuencia una pérdida económica por lo que para su control se utiliza una larga lista de fungicidas que en algunos casos no resulta tal y como se espera (Amaya Oñate, 2021). Por los avances tecnológicos que inciden en la creación de nuevas metodologías de diagnóstico los cuales proveen de una mayor eficacia en la identificación de patógenos tal como el Sistema de Identificación Microbiana BIOLOG el cual se basa en la identificación de microorganismos mediante el perfil metabólico utilizando diferentes fuentes de carbono. El equipo tiene una base de datos con más de 2000 tipificaciones de hongos entre las que alrededor de 50 son considerados hongos fitopatógenos (BIOLOG, 2008). Por la mayor capacidad de tipificación de fitopatógenos, se busca validar el método analítico para la identificación de cepas de *Botrytis cinerea* mediante el Sistema de Identificación Microbiana BIOLOG y el aseguramiento de la calidad del ensayo mediante análisis genético. Además, gracias al avance en genética molecular se puede secuenciar el genoma de los hongos patógenos, lo cual ayuda a dar una mayor robustez a la validación. Para ello es necesario secuenciar la región de los espacios intergénicos del ADN ribosómico (ITS) y realizar la identificación a nivel molecular con primers específicos del hongo patógeno en este caso *Botrytis cinerea* (White T. , Bruns, Lee, & Taylor, 1990).

Capítulo I

1. Marco Teórico

1.1. Norma ISO/IEC 17025

La Organización Internacional de Normalización (ISO) y la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) desarrollan documentos internacionales en conjunto bajo la gestión del Comité de ISO para la Evaluación de la Conformidad (ISO/CASCO). La Norma ISO/IEC 17025 promueve y permite al laboratorio la operación competente y la capacidad de generar resultados válidos, actuando también de forma general con los principios de la Norma ISO 9001. La aplicación de la norma facilita la cooperación e intercambio de información y experiencia entre laboratorios y otros, así como también la armonización de normas y procedimiento (ISO, 2022).

La Norma tiene por objeto especificar los requisitos generales que el laboratorio requiere para su competencia, imparcialidad y operación coherente, además, le permite utilizar este documento para confirmar o reconocer su competencia ante organismos de acreditación y otros (ISO, 2022).

El SAE utiliza este documento con el objeto de aclarar o precisar el contenido de algunos apartados de la Norma para ser aplicados en la evaluación y acreditación de laboratorios de ensayo y calibración (SAE, 2022).

Para cumplir con la formalidad de la Norma, el laboratorio debe tener disponibles: el personal (imparcial, competente, cualificado, etc.), las instalaciones (condiciones ambientales), el equipamiento (instrumentos de medición, software, reactivos, etc.) y los productos y servicios

de apoyo (mantenimiento, calibración, material consumible, transporte, etc.) necesarios para gestionar y realizar sus actividades (ISO, 2022).

1.2. Descripción del patógeno

- **Género *Botrytis***

Este género se encuentra en el orden Heliales y pertenece a la familia *Sclerotiniaceae* (Whetzel, 1945); el cual está conformado por 28 especies (Beever & Weeds, 2007), los cuales son pleomórficos con diferentes anamorfos; el anamorfo incluye el conidióforo (*Botrytis*), el fialoconidióforo (*Myrioconium*), el esclerocio (*Sclerotium*) y otras estructuras menos definidas (CABI, 2021), en el Anexo 2 se describen los géneros de *Botrytis* descritos hasta la fecha (MycoBank, 2022).

- **Especie *Botrytis cinerea***

Este hongo es un ascomicete cosmopolita polífago heterotálico (Beever & Weeds, 2007) y según el análisis molecular debe considerarse un complejo que incluye varias especies crípticas (USDA-ARS, 2020), además, es miembro del grupo fisiológico de hongos conocidos como parásitos facultativos, los cuales en determinadas ocasiones pueden vivir de forma parasitaria (Brown, 1915).

1.2.1. Sistemática

Tabla 1. Taxonomía de *Botrytis cinerea*

Reino	: Fungi
Superdivisión	: Dikarya
Phylum	: Ascomycota

Subphylum	: Pezizomycotina
Clase	: Leotiomycetes
Subclase	: Leotiomycetidae
Orden	: Helotiales
Familia	: Sclerotiniaceae
Género	: <i>Botrytis</i>
Especie	: <i>Botrytis cinerea</i> (anamorfo) / <i>Botryotinia fuckeliana</i> (teleomorfo)

Fuente: (Mycobank, 2022)

En el Anexo 3 se encuentra una descripción de los sinónimos usados en esta especie y el agrupamiento taxonómico adaptado a un huésped específico.

- **Variabilidad genética**

El género *Botrytis* es muy diverso, sus especies difieren por su biología, ecología, características morfológicas y hospederos, los avances en genética molecular y el desarrollo de marcadores filogenéticos han permitido la identificación de aproximadamente 30 especies, un híbrido y una especie complejo. Recientemente se ha demostrado que las poblaciones patogénicas pueden presentar divergencias debido al sistema de cultivo, geografía y aplicación de fungicidas (Walker, 2016).

La plasticidad y la evolución del genoma pueden deberse a elementos genéticos móviles como los transposones o las inteínas; por ejemplo, la presencia de la inteína PRP8 muestra altas tasas de conversión de genes meióticos en cruces entre un aislado que lo poseen y otro que no. En comparación con otras especies de hongos, el genoma de *B. cinerea* parece estar bastante pobre en elementos transponibles (0,7–4 %). La mutación puntual inducida repetida (RIP) de secuencias duplicadas constituye otra modificación del gen meiótico fúngico, este mecanismo está implicado en la evolución del genoma y que podría ser responsable de la expansión

reducida de elementos transponibles en esta especie. La evidencia de recombinación y flujo de genes, entre y dentro de las poblaciones, también ha sido obtenido por genética de poblaciones como evidencia de recombinación sexual (Dewey & Grant, 2016).

- **Resistencia a fungicidas**

En investigaciones de formación de razas fisiológicas se estableció la capacidad de los conidios de *B. cinerea* para germinar en medios de agar que contenían cobre/sulfato, acetato de fenilmercurio, ferbam, captan, tiram, zineb, ziram y nabam. Además, se observaron efectos sinérgicos en la adaptación de *B. cinerea* a zineb, salicilanilida de zinc y su mezcla, incluso se encontró tolerancia a captan y thiram (Jarvis, 1977).

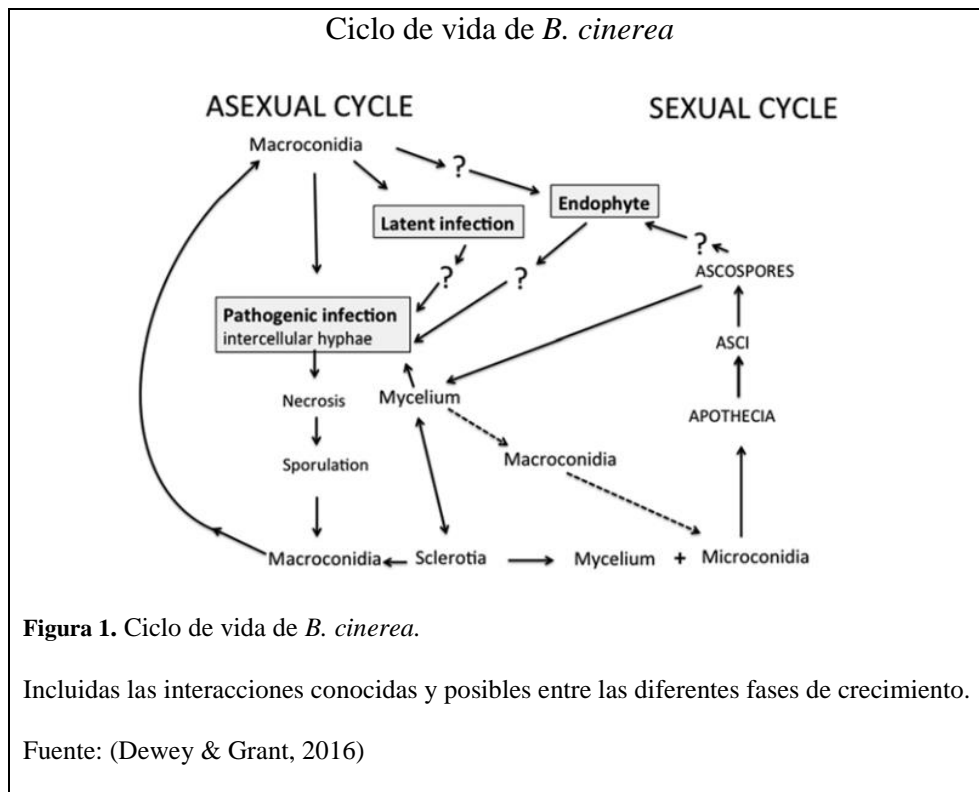
Se ha registrado que *B. cinerea* tolera fungicidas de nitrobenzoclorado. La escasez de cepas altamente resistentes a dicarboximidas, fenilpirroles y a los hidrocarburos aromáticos probablemente estén relacionados con su osmo-sensibilidad que induce una aptitud física reducida (Leroux, 2007).

1.2.2. Morfología

En múltiples investigaciones se ha determinado que la variabilidad del fenotipo en los aislados del campo es dependiente del aislamiento, medio de cultivo, temperatura, luz y otras condiciones ambientales infiriendo en el micelio, esporulado y esclerocio (Paul W., 1929). Se menciona además que la anastomosis interespecífica entre especies y entre aislados del mismo espécimen provocan homotipos aberrantes inestables (Jarvis, 1977).

El ciclo de vida descrito en la Figura 1. comprende: una etapa somática (vegetativa), micelial que produce conidios asexuales (macroconidios – anamorfa de *Botrytis*), esclerocios y microconidios (espermata), la otra etapa es cuando los esclerocios germinan para producir

micelio o conidios, pero después de una preparación adecuada acondicionamiento y fertilización, pueden germinar para producir apotecios (teleomorfa de *Botryotinia*), que contiene ascosporas resultantes de la meiosis (Beever & Weeds, 2007). En la figura 2 se puede observar las estructuras más comunes en los medios de cultivo.



- **Micelio**

Crecimiento y ramificación típica de los Ascomicetes, el micelio se desarrolla desde el ápice de la hifa (con células multinucleadas) o de una espora germinada. Posee hifas regularmente tabicadas (septos) y perforadas por un poro simple, a través del cual las intrahifas pueden poseer microconidióforos, estas células en su mayoría contienen paredes con quitina en cantidades variables (CABI, 2022).

- **Conidióforos y conidios**

Los conidióforos miden ≥ 2 mm de largo por 16-30 μm de ancho, son altos, robustos y de color marrón tornándose más pálido cerca del ápice. A menudo tienen una célula basal hinchada más o menos recta. Los conidios se producen dicotómicamente, son lisos, elipsoide-ovoide, globoides, cenocíticos, secos e hidrófobos, poseen células que contienen generalmente de 3 a 6 núcleos, miden de 6-18 x 4-11 μm (principalmente de 8-14 x 6-9 μm), son hialinos o pigmentados (marrón pálido) y en masa presentan un color marrón grisáceo (CABI, 2022).

- **Esclerocio**

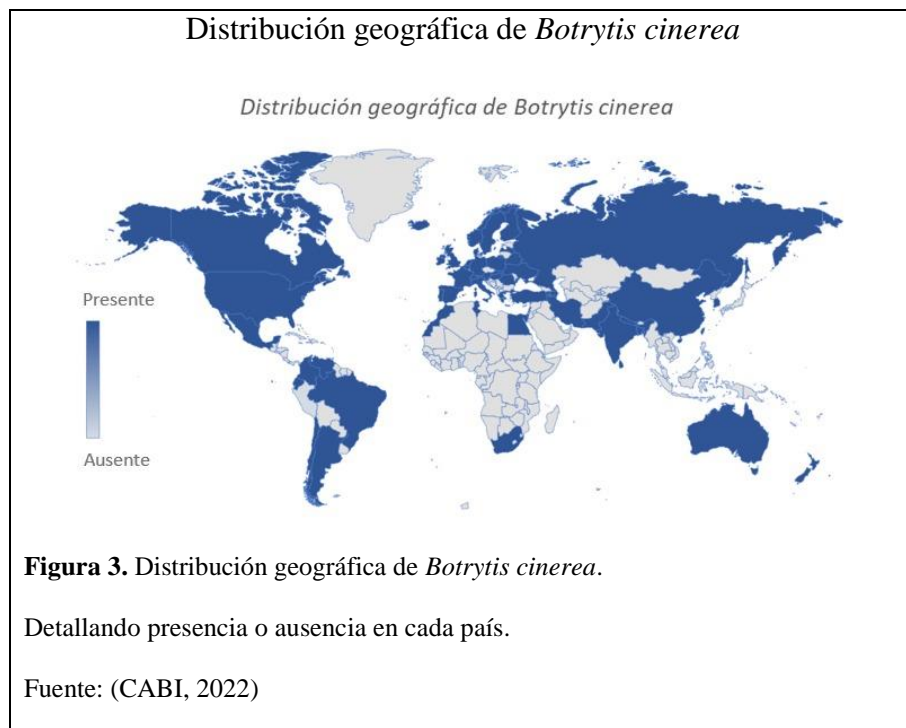
Los esclerocios se forman cuando las puntas de las hifas se ramifican repetida y dicotómicamente o por la fusión de sus tabiques, esta estructura posee una corteza superior delgada, redondeada y de paredes gruesas que al principio es hialino, pero luego se torna marrón o negro debido a la disposición de pigmentos melánicos con una gran médula central conformada por hifas filamentosas de paredes delgadas dispuestas libremente en una matriz gelatinosa hialina (Jarvis, 1977).

La capacidad de los esclerocios para producir apotecios disminuye con el tiempo, después de 9-12 meses son capaces de producir sólo apotecios estériles; pueden germinar en un amplio

rango de temperaturas (3-27°C) formando una sucesión de conidióforos durante 2 meses; en el campo germinan principalmente en primavera y otoño, sin embargo, algunos esclerocios no dan lugar a conidióforos, pero a finales del verano germinan para formar apotecios que son viables durante 20-30 días a 3°C, pero a 23°C solo es viable por 3 días (Jarvis, 1977).

1.2.3. Distribución geográfica

El estado anamorfo tiene una distribución mundial tal como se muestra en la Figura 3, se encuentra presente en cultivos bajo invernadero o en campo, en condiciones subtropicales hasta zonas templadas frías.



1.2.4. Rango de hospederos

Actualmente se establece que ataca a 596 géneros de plantas (traqueofitas) los cuales representan 1400 especies, aunque posiblemente sea más amplio este rango ya que no se

consideran las infecciones en plantas silvestres, del número total de huéspedes se establece que (Elad, Pertot, Cotes, & Stewart, 2016):

a. 596 géneros son afectados por la especie *Botrytis cinerea*.

- 580 pertenecen a la División Spermatophyta:
 - 1 género pertenece a la Clase Cycadophyta (cícadas),
 - 18 géneros a la Clase Pinophyta (coníferas),
 - 1 género de la Clase Ginkgophyta (ginkgo) y
 - 560 géneros para la Clase Magnoliophyta (angiospermas)
- 15 son de la División Pteridophyta
- 1 a la División Lycopphyta

b. El resto de los huéspedes es afectado por diferentes especies de *Botrytis* spp. En el Anexo 4 registra las especies de los huéspedes que son afectados por *B. cinerea*.

1.2.5. Síntomas

Este hongo produce daño en etapas de floración, fructificación, crecimiento vegetativo, plántula, en postcosecha y preemergencia, por lo que la descripción de síntomas es muy variado, por ejemplo pudrición del extremo del cáliz de las manzanas, pudrición de bulbos, pudrición del corno/tallo y mancha foliar (Agrios, 2005).

1.2.6. Biología

El proceso patogénico inicia con la adherencia y geminación del inóculo en la superficie del huésped, esta espora produce un tubo germinativo del cual se desarrolla un aprensorio que facilita la penetración activa o ingreso pasivo en sitios de herida o previamente infectado por otros patógenos; la primera barrera del proceso infectivo es la cutícula del huésped, por lo tanto,

el hongo debe producir surfactantes, proteínas o metabolitos (cutinasas, serina, esterasas, lipasas, etc.) que reduzcan la hidrofobicidad de la superficie y permita disolver la capa de cera permitiendo el acceso al polímero de cutina subyacente; *B. cinerea* produce un triacilglicerol lipasa extracelular (60 kDa), el cual es capaz de hidrolizar ésteres de ácidos grasos de cadena larga insaturados conocidos por ser componentes de cutina y ceras (Kars & van Kan, 2007).

Debajo de la capa de cera se encuentra la cutina, una red tridimensional muy compleja de ácidos grasos hidroxilados, parcialmente insaturados, esterificados y químicamente heterogéneos, los cuales el hongo debe atravesar y lo realiza mediante enzimas que atacan las sustancias pécticas en la pared celular de la planta; por ejemplo se cree que juegan un papel importante en la patogenicidad la endopoligalacturonasa y dos isoenzimas de poligalacturonasa, las cuales están asociados con la etapa de penetración en el proceso de infección. Después que el hongo atraviesa la cutícula, mata las células epidérmicas subyacentes antes de que sea invadido por hifas; los factores de inducción pueden ser proteínas o compuestos de bajo peso molecular secretados por el hongo a su entorno; en *B. cinerea* los compuestos con potencial fitotóxico fueron identificados como botcinolide (lactona altamente sustituida), botrydial (sesquiterpeno tricíclico) y varios compuestos relacionados con el ácido oxálico, los cuales forma cristales de oxalato de calcio dentro del tejido del huésped, de hecho el ácido oxálico puede ser un cofactor en la patogenia más que el principal agente fitotóxico, además, puede estimular la degradación de la pectina resultante de las endopoligalacturonas (Kars & van Kan, 2007).

Una vez que ha penetrado en la pared celular epidérmica anticlinal, *B. cinerea* crece a través de la lámina media, la cual tiene un alto contenido de pectina compuesto por poligalacturonanos, por lo tanto, el hongo debe producir una variedad de enzimas que la degraden y hacer una conversión del tejido del huésped en biomasa fúngica; además existen otras enzimas

degradantes de la pared celular no pectinolíticas que son secretadas durante el proceso patogénico (Kars & van Kan, 2007).

La secuenciación del genoma completo de *B. cinerea* reveló más de 40 grupos de genes dedicados a la síntesis de policétidos, terpenos, péptidos no ribosómicos y alcaloides, lo que indica que tiene el potencial de producir muchos metabolitos que no han sido descritos hasta ahora (Elad, Vivier, & Fillinger, 2016). Al considerarse este hongo como saprofito facultativo, puede matar y desintegrar los tejidos del huésped antes de su crecimiento y lo hace de la siguiente forma: en primer lugar, disuelve la pared celular, o algunos de sus constituyentes, de modo que el tejido pierde su coherencia y en segundo lugar destruye los contenidos protoplásmicos, de modo que puede actuar como parásito o vivir simplemente en sus restos muertos (Brown, 1915).

La germinación de esporas se estimula en bajas concentraciones de azúcares simples (glucosa y fructosa) y aminoácidos, de igual forma se establece que los macroconidios no germinan bien en agua destilada o en grandes cantidades de ácidos orgánicos y que el pH bajo no estimularon la germinación de conidios (CABI, 2022).

Se ha determinado que la temperatura óptima para la infección es de 20°C y requiere períodos mínimo de saturación de 16 h a 20°C y de 24 h a 12°C, igualmente se descubrió que se requiere humedad durante 12 a 24 horas a 16 °C y durante 72 a 84 horas a 3°C; asimismo se estableció que la duración del período húmedo para la infección tiene mucha más importancia cuando la humedad relativa es < 94% durante la incubación (CABI, 2022).

El método común de dispersión de casi todas las especies de *Botrytis* spp. es por transmisión de conidios en corrientes de aire, salpicaduras de agua, insectos, la maquinaria agrícola y las tijeras de podar (Dewey & Grant, 2016). Los conidios no tienen un mecanismo de descarga

violenta, el mecanismo de liberación es higroscópico, por lo que, son más abundantes en el aire cuando se producen cambios rápidos de humedad relativa durante el día (CABI, 2022).

Los conidios de *B. cinerea* atrapados en segmentos, cutículas y pelos corporales pueden ser dispersos por insectos, tales como la polilla de la uva *Lobesia botrana*, los trips de las flores *Thrips obscuratus*, la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Holz, Coertze, & Williamson, 2007) o la polilla de la manzana *Epiphyas postvittana* (Bailey, Ferguson, McMahon, & Wicks, 1997).

Las condiciones ambientales durante la temporada de crecimiento influyen en la incidencia de la enfermedad en almacén, es más probable que las incidencias altas ocurren después de una temperatura fría (15-23°C) y con temporadas húmedas; los altos índices de etileno (780 $\mu\text{l h}^{-1} \text{g}^{-1}$ por peso seco micelial) producidos por *B. cinerea* pueden ser importantes en el desarrollo de enfermedades en cámaras frigoríficas (Ploetz, 2003). El efecto de la temperatura sobre la esporulación es determinante, 15°C es la temperatura óptima para la formación de esporas, mientras que para el crecimiento del micelio es de 20°C, a temperaturas <15°C decae la tasa de esporulación, el mayor número de conidios se produce a 21°C y 94% HR. La humedad relativa óptima para la producción de esporas es de alrededor del 90% y la mayoría de las esporas se producen durante la noche, siempre que la temperatura sea lo suficientemente alta (Jarvis, 1977).

Se ha demostrado que *B. cinerea* responde a los rayos ultravioletas cercano 320 – 400 nm (posee criptocromos de detección de UV cercano), también posee sensores potenciales a la luz azul, así como red/fitocromos sensibles a la luz roja lejana (Elad, Vivier, & Fillinger, 2016). El ciclo oscuro de 12 horas o luz continua promovió la esporulación y suprimió la formación de

esclerocios; no se formaron esclerocios en intensidades de luz continua superiores a 500 lx (Jarvis, 1977).

El rango de pH para el crecimiento de *B. cinerea* es de pH 2-8 con un óptimo alrededor de 3-5, los esclerocios se forman mejor a pH 4 y nada en medios alcalinos (Jarvis, 1977).

Se ha encontrado que *B. cinerea* se puede cultivar en soluciones de alta presión osmótica; $4.75 \times 10^3 \text{ kNm}^{-2}$ (Jarvis, 1977).

1.2.7. Control

El proceso infectivo de *B. cinerea* se presenta en todas las fases fenológicas del cultivo, pre cosecha y post cosecha, por lo que su control se dificulta, además, se ha demostrado que el hongo desarrolla fácilmente resistencia a pesticidas de uso intensivo, de manera que, para obtener un efecto sostenible en el control de la enfermedad se debe establecer una dinámica de control, por ejemplo; empezar con el control cultural, eliminando y desinfectando los residuos del cultivo eficientemente; luego aplicar un control biológico con biopreparados de *Trichoderma harzianum* o *Streptomyces griseoviride*; a continuación realizar un control químico realizando aplicaciones alternas de grupos químicos ya sea en la floración o antes de la cosecha. Además, se debe tener mucho cuidado con la fertilización excesiva especialmente con el nitrógeno y el exceso de riego porque favorece las condiciones de humedad requeridas para la germinación de esporas (CABI, 2022), (Waller, Lenné, & Waller, 2002).

En los procesos de control de microorganismos fitopatógenos también se deben considerar las políticas del uso de pesticidas y componentes orgánicos desarrollados para este fin por lo que, en el Anexo 5 se detallan los productos regulados y permitidos en nuestro país para el control de *Botrytis* spp. y *B. cinerea*.

1.3. Métodos de diagnóstico

Las técnicas empleadas para la identificación de microorganismos permiten obtener información tanto del genotipo como fenotipo del espécimen, la innovación de algunas técnicas influye en su complejidad y alcance. Debido a esto, los procedimientos deben ser aplicados en conjunto pues suelen ser complementarios y no sustitutivos.

- **Métodos de aislamiento, diferenciación morfológica (clave dicotómica) y conservación**

Para la esterilización superficial del material vegetal muestreado antes de la siembra, se debe sumergir secuencialmente en hipoclorito de sodio, etanol y agua destilada estéril; si el material infectado ya está esporulando, la identificación puede confirmarse mediante la visualización microscópica de conidios recogidos con una aguja estéril; para la detección de infecciones latentes se debe sumergir los frutos en alcohol, congelarla a -20°C por un corto tiempo y luego incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 7-10 días hasta que el hongo esporule. El uso del medio basal agar rosa de Bengala modificado con varios fungicidas y altas concentraciones de antibióticos fue encontrado satisfactorio para ensayar suelos orgánicos (tierra y semilla de cebolla), este ensayo se caracteriza por el desarrollo de pigmentos oscuros en el medio debido a la degradación del ácido tánico y la resistencia a PCNB y maneb, de igual manera este medio se utilizó para monitorear las poblaciones de *Botrytis* en viñedos e invernaderos y fue utilizado en Israel para detectar poblaciones resistentes (Dewey & Yohalem, 2007). El hongo crece bien en varios medios definidos e indefinidos (MEA y PDA); MEA favorece el crecimiento vigoroso del micelio a $20-25^{\circ}\text{C}$ y es adecuado para inducir la diferenciación de los esclerocios (a 15°C , en la oscuridad) por otro lado el PDA es superior a los preparados comerciales y es adecuado para obtener abundante esporulación. La incubación de tejidos infectados en una cámara húmeda (HR alta) a $20-25^{\circ}\text{C}$ y con exposición de una

mezcla de luz blanca y ultravioleta cercana (360 nm) da como resultado la producción de conidióforos y conidios que ayudan a la identificación (CABI, 2022). La caracterización mediante las claves dicotómicas requiere de experiencia del observador, información bibliográfica, estructuras fúngicas diferenciadas, conocimiento de técnicas de montaje y de microscopios con límites de resolución que permitan identificar las estructuras del microorganismo. En el Anexo 6 se presenta la clave dicotómica para la identificación de *Botrytis* spp. En la Tabla 2 se describe las clave morfológicas y morfométricas para las especies de *Botrytis* spp.

Tabla 2. Clave morfológicas y morfométricas para las especies de *Botrytis* spp. basada en descripciones macro y microscópicas

Colonia/micelio en agar	Conidióforo	Conidio	Esclerocio
<i>B. allii</i> (<i>B. aclada</i>)			
Plana: numerosos conidióforos	Abundante: marrón; generalmente alrededor de 1 mm de largo y 6-20 μm o más de diámetro	Ovoide y hialina. 5-6 x 7-11 μm <i>B. aclada</i> (8,4 - 12,1 x 4,6 - 5,6* μm , (6,5 - 8,6) - 11,0 x (4,6 - 4,6) - 6,0* μm) <i>B. allii</i> (9,7 - 14,1 x 5,3 - 7,3* μm (9,0 - 10,2) - 15,0 x (5,0 - 5,7) - 6,5* μm)	Por lo general sin esclerocios en agar, pero frecuentes en sustratos del huésped; alargados de forma irregular, de 1 - 5 mm de diámetro, hasta 10 mm de largo
<i>B. cinerea</i>			
Al principio hialino, pero luego es marrón grisáceo o grisáceo	De 2 mm o más de largo, 16-30 μm de espesor; ramas bastante abiertas y lisas, marrón por debajo, de paredes lisas, de 16 a 30 μm de ancho, cabeza apical de ramas alternas	Elipsoidal u obovoide mayormente, con un hilio protuberante; incoloro a marrón pálido, hidrofóbicos de paredes lisas 6-9 x 8-14** μm 9,0 - 11,0 x 6,0 - 8,0* μm 6,0 - 18,0 x 4,0 - 11,0* μm	Negro, en agar; tamaño y forma muy variable
<i>B. porri</i>			
Blanca, fibrosos, más tarde gris: estéril	Gris, marrón opaco	Tamaño promedio marrón oliva 9,6 x 15,7 μm , 14,5 - 16,5* μm Conidios ligeramente más anchos de 11-14 x 7-10 mm de diámetro	Grandes (hasta 20 mm), muy enrevesados, a menudo esclerocios cerebriformes formados en cultivo 8,5 - 11,0* μm
<i>B. squamosa</i>			
Plano, blanco, esponjoso, esporulación nula o escasa	Colapso en forma de acordeón de las ramas de los conidióforos	Principalmente 12-15 x 15-22 μm 21,0 - 22,5* μm	Color negro, de 3-10 mm de largo, planas, elipsoidales o irregulares, en sustratos naturales y en cultivo 16,5 - 17,5* μm
<i>B. tulipae</i>			

gris, efuso; rara vez con pocos conidióforos	marrón oliváceo arriba, hialino abajo: 17-20 μm de espesor, células basales hinchadas, parecen tener verticilos de conidios	Principalmente 10-13x16-20 μm	Abundante en cultura; discreta o confluyente, blanca, oblonga, 1-2x2-4 mm
<i>B. fabae</i>			
		conidios grandes, en su mayoría de 16-25x10-14 μm	Pequeños, generalmente de 1-1,7 mm de diámetro

Fuente: (Lacy & Lorbeer, 2012), (*) (Chilvers & du Toit, 2006), (**) (Domsch, Gams, & Anderson, 2007)

Los métodos convencionales para conservar hongos son liofilización, criopreservación o suelo estéril, en la actualidad se han probado otros métodos para almacenar aislamientos de campo de *B. cinerea* tales como; gel de sílice, arena, agar papa dextrosa inclinados a 4°C, esporas secas en tubos a -20°C, esporas en glicerol (20%) a -20°C, el almacenamiento en arena a 4°C o en glicerol a -20°C son los mejores métodos para preservar los aislamientos de *B. cinerea* (Delcán, Moyano, Raposo, & Melgarejo, 2002), otros autores han conservado suspensiones de ascosporas de apotecios individuales en glicerol al 15% a -80°C, cultivos de ascosporas individuales fueron almacenados en MEA en tubos de plástico con pendientes sellados a 6°C durante un máximo de 18 meses, y suspensiones de conidios en Tween 20 o 80 al 0,01 % se almacenaron por periodos cortos (1-2 días) a 4°C y por periodos más largos (hasta 8 meses) a -20°C (Weeds, 1997).

- **Métodos bioquímicos**

La MicroPlate BIOLOG prueba la capacidad de un microorganismo para utilizar u oxidar compuestos de un panel de 96 pozos con diferentes fuentes de carbono, la prueba arroja un patrón característico de pozos violetas y turbios, que constituye una "huella metabólica", independientemente de la estructura del microorganismo, cualquier sustrato químico que sea oxidado por una célula dará como resultado la formación de NADH, que resultará en la cadena de transporte de electrones, colorantes redox como el tetrazolio toma electrones de este flujo, convirtiendo el tetrazolio en un formazán altamente coloreado. Las fuentes de carbono van

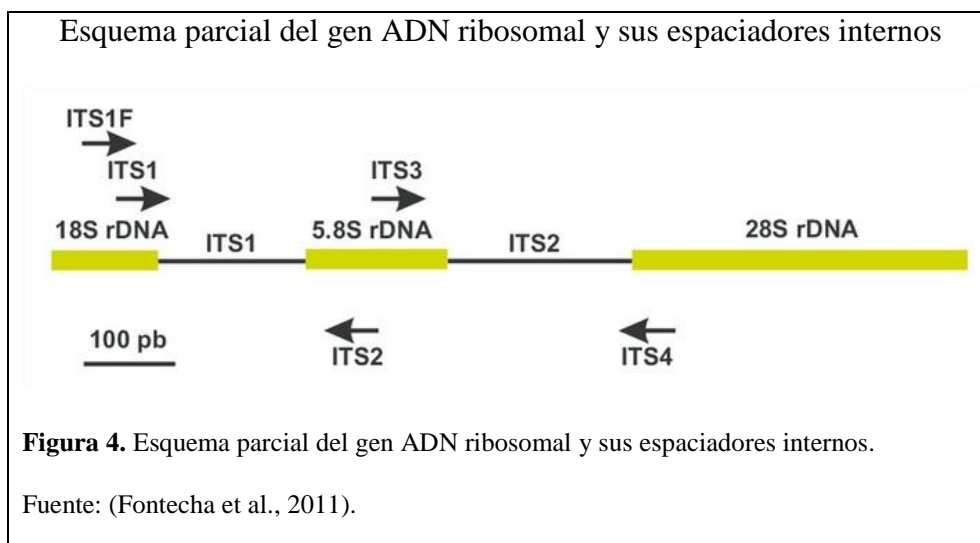
desde los 50 carbohidratos comunes que se usan actualmente en la prueba de fermentación basada en el pH, hasta más de 10.000 compuestos de muchas clases diversas que incluyen carbohidratos, ácidos carboxílicos, amidas, ésteres, aminoácidos, péptidos, aminas, alcoholes, productos químicos aromáticos, productos químicos halogenados, productos químicos poliméricos y químicos que contienen fósforo y azufre (Bochner, 1989).

- **Métodos inmunológicos**

Una revisión de los primeros métodos inmunológicos se encuentra en el uso de tecnología de hibridomas el cual permitió generar anticuerpos monoclonales contra *Botrytis*, a partir de estos ensayos se pudo obtener el anticuerpo monoclonal BC-12.CA4 el cual reconoce todas las especies de *Botrytis* y miembros del género relacionados a *Sclerotinia* pero no otros hongos comúnmente involucrados en la patogenia de las bayas de uva, (*Aspergillus* y *Penicillium*), el antígeno detectado por este anticuerpo es producido constitutivamente, es altamente estable, no se degrada por calor o congelación y no se metaboliza durante la fermentación. El antígeno reconocido por este anticuerpo es una glicoproteína soluble termoestable que se produce tanto *in vivo* como *in vitro*, este antígeno está presente en las paredes y matriz extracelular de los tubos germinativos e hifas, pero no en la superficie de los conidios, el límite de detección de este ensayo fue de 0,97 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Dewey & Grant, 2016). Se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia para inmunolocalizar y seguir vías de infección de *B. cinerea* y *B. fabae* en *Vicia faba* usando el anticuerpo monoclonal IgM (MAb) BC-KH4, el cual reconoce un epítipo carbohidrato estable en una glicoproteína (galactomanano) presente en las paredes de las hifas, en los tabiques cruzados y en la matriz extracelular de *B. cinerea* (Dewey & Cole, 1997); también se ha demostrado que el anticuerpo BC-12.CA4 inmunomarca fuertemente las paredes de las hifas de *B. cinerea*, pero no las conidias (Dewey & Yohalem, 2007).

- **Métodos moleculares**

En el diagnóstico de *Botrytis*, el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de regiones ITS (secuencias de ADN que codifican al RNA ribosomal) mediante cebadores específicos han permitido establecer diferencias evolutivas, además de proveer información filogenética y taxonómica en el estudio de poblaciones (White T. , Bruns, Lee, & Taylor, 1990). En la Figura 4 se detalla un esquema parcial del gen ADN ribosomal y sus espaciadores internos. A más de las regiones ITS se han diseñado cebadores para regiones como β -tubulina (BT 1-2) y un conjunto de cebadores que se dirige a una secuencia más pequeña de la región ITS, por ejemplo, ITS U5 se hibrida con la unidad 18S rDNA, mientras que ITS R2 hibrida a la unidad 5.8S rDNA, amplificando solo el ITS1 y parte de la unidad 18S y 5.8S rDNA (Behr, Legay, & Evers, 2013).



En trabajos para aislar marcadores moleculares específicos para *B. cinerea* mediante la detección de polimorfismos en cepas fúngicas de aisladas de fresa y otras plantas hospedantes, se encontró un cebador que amplificó principalmente un producto de 750 pb presente en todas las cepas de *B. cinerea* y ausente en las otras especies y géneros examinados. Este producto se clonó y secuenció para diseñar un par de cebadores, se probó en aislados fúngicos por PCR y

se obtuvo una amplificación única de una banda de 0,7 kb en las cepas de *B. cinerea* aisladas de diferentes plantas hospederas. El límite de detección del ADN genómico fue de aprox. 0,2 pg, por lo tanto, este procedimiento de detección basado en PCR es una herramienta muy valiosa para el diagnóstico de *B. cinerea* (Rigotti, Gindro, Richter, & Viret, 2002).

En trabajos posteriores se determinó que los cebadores C_{729+/-} diseñados para detectar *B. cinerea* no pudieron amplificar fragmentos de ADN de 0,73 kb en un grupo de cepas en condiciones estándar, mientras que un fragmento de ADN más corto (0,60 kb) se amplificó a una temperatura de hibridación más baja (50 °C). Este fragmento se secuenció y se diseñaron dos nuevos cebadores internos, BC₁₀₈₊ y BC₅₆₃₋. Estos nuevos cebadores se utilizaron para amplificar un fragmento de ADN de 0,48 kb para el grupo principal y un fragmento más corto 0,36 kb para el grupo más pequeño, debido a una deleción de 0,12 kb, que no se detectó con los cebadores C_{729+/-}. Otras especies estrechamente relacionadas como *B. allii* y *B. fabae* no se amplificaron con estos cebadores, lo que confirma su especificidad para *B. cinerea* y mejora la sensibilidad de las herramientas moleculares disponibles para detectar este hongo en las plantas huésped. El estado multinucleado de *B. cinerea* sugiere que sus características fenotípicas en cultivo puro pueden ser muy variables, pero también le confiere a este hongo una alta adaptabilidad a muchos anfitriones y entornos diferentes (Rigotti, Viret, & Gindro, 2006). En la Figura 5 se muestra el diagrama de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 0,76 kb de *B. cinerea* y la ubicación de los cebadores C₇₂₉₊, C₇₂₉₋ y BC₁₀₈₊ y BC₅₆₃₋

Diagrama de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 0,76 kb de *B. cinerea* y la ubicación de los cebadores C₇₂₉₊, C₇₂₉₋ y BC₁₀₈₊ y BC₅₆₃₋



Figura 5. Diagrama de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 0,76 kb de *B. cinerea* (número de registro de EMBL AJ422103) y la ubicación de los cebadores C₇₂₉₊, C₇₂₉₋ y BC₁₀₈₊ y BC₅₆₃₋

Fuente: (Rigotti et al., 2006).

La aplicación de ensayos altamente sensibles tales como el de hibridación de captura magnética - PCR (MCH-PCR) y el ensayo basado en ARN Northern blot - PCR de transcripción inversa cuantitativa, son ideales para investigaciones de laboratorio para detectar el nivel de expresión génica de *Botrytis*, pero son bastante caros y técnicamente exigentes para el análisis de muestras de campo, debido a que se debe controlar el muestreo, la extracción de ADN y la contaminación de la muestra, solo el manejo efectivo de estos elementos permiten obtener resultados reproducibles. La PCR cuantitativa (qPCR) es un método costoso en términos de reactivos y equipos, sin embargo, varios estudios han desarrollado la técnica para cuantificar las infecciones por *Botrytis* en diferentes cultivos, por ejemplo, se desarrolló un sistema de PCR en tiempo real con sonda TaqMan que es altamente sensible y específico para *B. cinerea*, lo que permite la detección y cuantificación antes del desarrollo de los síntomas, también se ha

desarrollado una amplificación isotérmico mediado por bucle (LAMP) para la detección de *B. cinerea*, que combinó la sensibilidad y especificidad de métodos previos basados en ácidos nucleicos con equipo simplificado, esto permitió la detección de infecciones presintomáticas en menos de 15 min y también tiene la ventaja de ser menos susceptible a las sustancias inhibidoras de la planta (Dewey & Grant, 2016).

Capítulo II

2. Marco metodológico

2.1. Fase de campo

El proceso de investigación empezó con la revisión de bases de datos del laboratorio de Fitopatología de AGROCALIDAD situado en la provincia de Pichincha, del cantón Quito, parroquia Tumbaco, para obtener información objetiva de las provincias y cultivos afectados por el género *Botrytis* spp., el planteamiento para la selección de la información fue relacionada con indicadores tales como: la presencia y persistencia del patógeno, importancia agrícola del cultivo, variabilidad de hospederos y la tecnificación de cultivo.

2.2. Fase de laboratorio

Para el proceso de investigación se recibieron 60 muestras, del total solo 33 presentaron signos y síntomas asociados a la patogénesis de *Botrytis* sp. Adicionalmente se propuso corroborar la eficiencia del método de conservación de los hongos, por este motivo, se optó por activar cepas conservadas por el laboratorio de la provincia de Imbabura aisladas del cultivo de rosa en el 2014 y 2015, las cuales fueron caracterizadas por secuenciación como *B. cinerea* empleando las regiones ITS4. Además, se activaron cepas de *B. cinerea* conservadas de las provincias de Cotopaxi (rosa y tomate riñón), Santa Elena (uva), Pichincha (arándano, habas, rosa y canela) y de la provincia de Tungurahua (tomate de árbol) que fueron conservadas en el año 2020.

Esta fase fue desarrollada en el laboratorio de Fitopatología y en la Tabla 3 se observan las muestras que fueron seleccionadas para el proceso de validación del método analítico para diagnosticar *Botrytis cinerea* mediante el sistema de identificación microbiana BIOLOG y el aseguramiento de la calidad del ensayo mediante análisis genético.

Tabla 3. Muestras seleccionadas para el proceso de validación

No	AÑO	PROVINCIA	CÓDIGO DE MUESTRA	CULTIVO	TIPO DE MUESTRA
1	2014	Imbabura	FP-14-0540	Rosa	Flores
2	2015	Imbabura	FP-15-0024	Rosa	Flores
3		Cotopaxi	FP-15-1204	Rosa	Flores
4	2017	Pichincha	FP-17-1484	Arándano	Tallos
5	2018	Pichincha	FP-18-1553	Habas	Hojas
6	2020	Santa Elena	FP-20-0115	Uva	Frutos
7		Pichincha	FP-20-0228	Rosa	Hojas y tallos
8		Cotopaxi	FP-20-0268	Tomate riñón	Hojas
9		Tungurahua	FP-20-0542	Tomate de árbol	Hojas
10		Pichincha	FP-20-0577	Canela	Ramas
11	2021	Pichincha	FP-21-0003	Lechuga	Hojas y raíz
12		Pichincha	FP-21-0015	Eryngium	Hojas y ramas
13		Pichincha	FP-21-0016	Eryngium	Hojas y ramas
14		Pichincha	FP-21-0034	Ruscus	Hojas y ramas
15		Pichincha	FP-21-0101	Ruscus	Hojas y ramas
16		Napo	FP-21-0121	Hortalizas	Flores
17		Pichincha	FP-21-0327	Dianthus	Hojas
18		Pichincha	FP-21-0328	Gerbera	Hojas
19		Pichincha	FP-21-0378	Lilium	Hojas
20		Pichincha	FP-21-0379	Liatrix	Hojas
21		Pichincha	FP-21-0614	Lechuga	Hojas
22		Chimborazo	FP-21-0695	Haba	Hojas, ramas
23		Chimborazo	FP-21-0697	Haba	Frutos
24		Chimborazo	FP-21-0698	Haba	Frutos
25		Chimborazo	FP-21-0699	Tomate riñón	Frutos
26		Chimborazo	FP-21-0705	Pimiento	Frutos
27		Chimborazo	FP-21-0707	Tomate riñón	Frutos
28		Chimborazo	FP-21-0709	Tomate riñón	Frutos
29		Pichincha	FP-21-0713	Rosa	Raíz, tallos
30		Pichincha	FP-21-0717	Rosa	Raíz, tallos
31		Pichincha	FP-21-0718	Rosa	hojas, flores
32		Pichincha	FP-21-0728	Rosa	hojas, flores
33		Pichincha	FP-21-0809	Haba	Frutos

Fuente: (La autora, 2023)

2.2.1. Protocolo de aislamiento, conservación y masificación del hongo

Considerando los antecedentes evolutivos del hongo en particular la anastomosis, la resistencia a fungicidas, tasas de crecimiento relacionadas con la exposición a luz UV y su acción patogénica en diferentes hospederos, se pretendió de manera empírica permitirle al hongo

producir la mayor cantidad de heterogeneidad nuclear, este proceso posibilita evidenciar la especificidad y selectividad de las técnicas que se desean aplicar para el diagnóstico del patógeno.

- **Siembra de material vegetal y aislados preservados**

Previo al inicio del ensayo se preparó medio de cultivo PDA y se conservó a 4°C hasta su uso; el tejido vegetal se desinfectó con NaClO 1 % por 1 min y se enjuagó tres veces por 1 min con agua destilada estéril., luego se cortó y sembró fragmentos (1-2 cm²) en el medio de cultivo e incubó a 24°C por 7 días. Los aislados preservados se los sembró directamente en el medio de cultivo (Agrios, 2005).

- **Purificación y obtención de cultivos monospóricos**

Para obtener aislados fúngicos sin indicios de contaminación se realizó sucesivas siembras hasta observar colonias puras que fueron incubadas a 24°C por 14 días en oscuridad; para la obtención de cultivos monospóricos, se preparó una suspensión fúngica del cultivo purificado diluyéndolo hasta obtener 20 propágulos/mL utilizando la cámara de Neubauer, posteriormente se sembró 100 mL de la dilución en medio de cultivo líquido e incubó por 7 días a 24°C. Igualmente se pudo obtener esporos con la ajuga de disección utilizando el estereoscopio (Castellanos, Jara, & Mosquera, 2011).

- **Inoculación**

Para evidenciar la capacidad patogénica del hongo se utilizaron dos procesos; primero se determinó su virulencia utilizando pétalos de rosas libres de residuos de pesticidas, los cuales fueron desinfectados con NaClO 1 % por 1 min y se enjuagó tres veces por 1 min con agua destilada estéril y sobre ellos se colocó dos discos micelares de 5 mm de diámetro de medio

PDA del cultivo monospórico, se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente con periodos homogéneos de luz y oscuridad; después de 10 días de incubación las muestras infectadas fueron almacenadas en sobres (papel/plástico) y conservados en un desecador hasta su posterior uso. Un segundo ensayo probó la capacidad del hongo para infectar diferentes hospederos (bulbos y hojas de cebolla, vainas de habas, hojas y pétalos de rosa, hojas de lechuga, frutos y hojas de uva y mora), esta inoculación se realizó de la misma forma que los pétalos de rosa, observar en el Anexo 7 (Weeds, 1997).

- **Conservación del patógeno**

Se preparó y esterilizó 10 mL de sucrosa (10%) y peptona (20%) en tubos de ensayo, también se esterilizó pedazos de papel de 0.5 cm² y tubos de microcentrífuga; se vertió la solución de sucrosa y peptona sobre el cultivo monospórico, a continuación, se sumergió los pedazos de papel en la solución por 5 min, luego se transfirieron los pedazos de papel saturados de la solución en tubos de microcentrífuga y se almacenaron a 4°C. Otro método de conservación se lo realizó colocando en un tubo de ensayo agua destilada estéril con cortes del medio de cultivo con micelio de 1 cm³, estos tubos se sellaron y conservaron a 18-21°C (Castellanos, Jara, & Mosquera, 2011).

- **Masificación del micelio en medio líquido**

Se preparó y esterilizó 150 mL de medio líquido (dextrosa 3 g + extracto de levadura 0,75 g + peptona 0,75 g + agua destilada 150 mL) en un matraz, se depositaron porciones de 1 cm² del cultivo monospórico, se sellaron e incubaron en la obscuridad por 5 días a temperatura ambiente. Se filtró el micelio con la ayuda de la bomba de vacío y se conservó dentro de tubos cónicos para centrífuga a - 20°C (Castellanos, Jara, & Mosquera, 2011).

2.2.2. Protocolo morfológico y morfométrico

Una vez obtenidos cultivos monospóricos se realizó una nueva siembra en medios de cultivo PDA y EMA colocando discos de 5 mm de diámetro en el centro de cajas Petri. La morfología del hongo y la morfometría de los conidios se realizó a partir de colonias con 7 días de incubación a 25°C, para el ensayo morfométrico se recogió micelio directamente de la caja de PDA en un tubo de 1,5 mL al cual se adicionó 1 mL de agua destilada estéril, se realizó vórtex durante 1 min para propiciar la liberación de los conidios. A partir de esta dilución se preparó muestras con solución azul de lactofenol para la observación en el microscopio óptico Olympus IEEE 1394 (100x) y fueron medidas en el programa cellSens Standard 1.16 (Crous, y otros, 2009)

Para la morfología se hizo una comparación general de las diversas formas de crecimiento del hongo en la placa Petri con medios PDA y EMA. Los criterios de crecimiento “Sc” (tipo esclerótico), “M” (tipo micelio) y “Sp” (tipo esporas) hacen referencia a: la distribución de conidios en la superficie, presencia o ausencia de esclerocios, forma y cantidad del micelio (Paul, 1929).

2.2.3. Protocolo bioquímico

El ensayo se realizó siguiendo las directrices del “FF MicroPlate™ Instructions for Use” del sistema de Identificación Microbiana BIOLOG para la identificación de hongos y levaduras, es preciso recordar que los tubos (IF-A) y las placas (FF MicroPlate™) (Anexo 8) son específicas y están diseñadas para identificar cultivos puros de hongos esporulantes, pero solo reconocerá miembros de las especies detalladas en la base de datos del 2008 (Anexo 9) (BIOLOG, 2010).

Etapas del procedimiento: Se cultivó el hongo en agar extracto de malta 2% e incubaron 5-10 días a 26°C, hasta obtener la esporulación. Con este aislado se preparó una suspensión uniforme en una cabina de flujo laminar retirando las esporas de la placa de agar con un hisopo estéril sin trasladar ningún nutriente del medio de agar a la suspensión, a continuación, se sumergió el hisopo en el FF-IF para humedecerlo, se presionó el hisopo contra la superficie interior del tubo en el vidrio seco por encima de la línea de fluido para desalojar y liberar las esporas, se dejó reposar el tubo durante varios minutos y permitió que los grumos se asienten; se estableció el ajuste de transmitancia del 100% utilizando un tubo de IF sin inocular, se ajustó la densidad del inóculo a 75% de transmitancia (+/- 2%). Para finalizar se inoculó inmediatamente la suspensión celular en MicroPlate (100 µL) en todos los pocillos, se incubó la FF MicroPlate de 1-10 días a 26°C (BIOLOG, 2010).

La lectura de la microplaca se realizó a una longitud de onda dual a 490 nm (para el color naranja rojizo) y a 750 nm (para la turbidez), en el lector Biolog MicroStation™. El parámetro colorimétrico permitió evidenciar el incremento de la tasa metabólica, mediante un indicador redox (Cloruro de Tetrazolio), este incremento fue comparando con índices de lecturas (patrón metabólico) de las especies que posee el programa del sistema Biolog's Microlog™, Se realizó la lectura de cada MicroPlate diariamente hasta obtener una identificación (BIOLOG, 2010).

Además, la morfología macroscópica y microscópica fue comparada con la fototeca del sistema (Anexo 10); esta base de datos posee perfiles metabólicos de dos especies; *B. aclada* (sin. *B. allii* (MycoBank, 2022)) y dos perfiles metabólicos de *B. cinerea* BGA y BGB, (Anexo 11) (BIOLOG, 2008).

2.2.4. Protocolo inmunoensayo

Los criterios técnicos para el diagnóstico de inmunoensayo de *B. cinerea* están definidos en el manual del Tests for cocktail ELISA-LOEWEBLUE (LOEWE, 2016).

Preparación de reactivos: -Tampón de revestimiento: Se disolvió el contenido del sobre en 1 L de agua destilada, se ajustó el pH a 9.6 y refrigeró a 4 °C. -Tampón de lavado: Se disolvió el contenido del sobre en 1 L de agua destilada, se adicionó 2.5 mL de Tween 20 (0.05% concentración final), se ajustó el pH a 7.4 y refrigeró a 4 °C. -Tampón de conjugado/muestra: Se disolvió el contenido del sobre en 900 mL en agua y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH, se adicionó 0.5 mL Tween 20 y se aforó a 1 L. -Solución de substrato: Se mezcló LOEWEBLUE componente “A” con LOEWEBLUE componente “B” en volúmenes iguales antes de su uso. Los controles, se contruyeron antes de usar con 2,1 mL de conjugado estándar/tampón de muestra y se refrigeró a -20°C. -Anticuerpos: Para 8 pocillos se diluyó de las soluciones madre 8.5 µL del Anticuerpo (IgG) en 1.7 mL en el tampón de recubrimiento y 4,25 µL del Anticuerpo-AP-conjugado, en 0,85 mL del tampón de conjugado/muestra. –Muestra: El micelio de las muestras del hongo fueron maceradas en morteros para asegurar una trituración adecuada de las paredes celulares (LOEWE, 2016).

- **Etapas del procedimiento**

En la Tabla 4 se muestran las etapas que fueron realizadas para el diagnóstico de *Botrytis cinerea* mediante la prueba de inmunoensayo ELISA-LOEWEBLUE.

Tabla 4. Etapas de la prueba de inmunoensayo ELISA-LOEWEBLUE

Etapa	Dilución de los reactivos	Agregar (por pocillo)	Incubación		Lavados
			Tiempo	T°	
Aplicación de recubrimiento-anticuerpo (IgG)	Diluir IgG 1:200 en Tampón de Recubrimiento	0,2 mL	4 h cubrir con cinta de sellado	37°C	4 X
Aplicación de muestra y simultáneo	Preparar la muestra en una dilución 1:20 w/v en tampón de conjugado/muestra. Disolver los controles +/- cada uno en 2 mL de tampón de conjugado/muestra.	0,1 mL	Toda la noche (cubrir con cinta de sellado)	4°C	4 X
Aplicación de anticuerpo-AP-conjugado	Diluir el Anticuerpo-AP-conjugado en 1:200 (vial original) en tampón de conjugado/muestra, mezclar suave y meticulosamente y agregar inmediatamente después de la aplicación de la muestra.	0,1 mL			
Reacción Enzimática	Solución Sustrato LOEWEBLUE	0,2 mL	1 - 2 h en la oscuridad	Temp - ambiente (25°C)	---

Fuente: (LOEWE, 2016)

Se agregaron controles positivos y negativos a cada placa para verificar una fuerte reacción positiva y una baja negativa. Después de 2 horas de incubación del sustrato, se evaluó la reacción visualmente y se realizó la lectura fotométricamente a 650 nm (LOEWE, 2016).

2.2.5. Protocolo molecular y análisis genético

- **Obtención de ADN**

Extracción convencional de ADN para diagnóstico con cebadores universales y específicos

Preparación de reactivos: Para el tampón de extracción se calentó agua destilada en un vaso de precipitación, se añadió NaCl (800 mM) y Tris-HCl (220 mM), se agitó moderadamente hasta diluir; se agregó el EDTA (22 mM) y se dejó que la solución se enfríe hasta los 40°C, se

ajustó el pH a 8.0; se adicionó el Sorbitol (140 mM) y CTAB (0.8%). Se dejó en agitación moderada toda la noche para su disolución. Posterior a eso, se aforó al volumen final y refrigeró hasta su uso (Weising, Nybom, Wolff, & Meyer, 1995).

Extracción del ADN: Se dispensó en un tubo ependorf 1 mL de tampón de extracción junto al micelio obtenido anteriormente, se agregó 0.5 mL de Cloroformo: isoamilalcohol proporción 24:1 y se invirtió varias veces el tubo para mezclar el tampón y el solvente. Posteriormente se incubó a 55°C por 30 min a baño maría invirtiendo los tubos cada 10 min, se centrifugó por 5 min a 14000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de ependorf sin mezclar las fases, se precipitó los ácidos nucleicos mezclándolos con 1,2 volumen de isopropanol y dejando los tubos por 5 min a -20°C, se centrifugó por 10 min a 10000 rpm, luego se descartó el sobrenadante, se enjuagó el pellet dos veces con 1 mL de etanol al 70%, posteriormente se dejó secar el pellet durante 25 min y por último se disolvió el pellet en 50 µL en agua libre nucleasas (Weising, Nybom, Wolff, & Meyer, 1995).

Extracción de ADN mediante kit comercial para ser utilizado en la secuenciación

La extracción de ADN se realizó aplicando las directrices del instructivo Quick-Start Protocol, DNeasy[®] Plant Mini Kit (Thermo Scientific), (QIAGEN, 2020).

Preparación de reactivos: Previamente homogenizar los concentrados de tampón AP1 y AW1, agregue etanol (96-100%) a los concentrados tampón AW1 y AW2, se realizaron todos los pasos de centrifugación a temperatura ambiente (15–25°C) (QIAGEN, 2016).

Extracción del ADN: En el tubo de microcentrífuga que contiene la muestra, se añadió 400 µl de tampón AP1 y 4 µl de RNase A, se mezcló en vórtex e incubó por 10 min a 65°C, se invirtió el tubo 3 veces durante la incubación. Se agregó 130 µl de tampón P3, se mezcló e incubó

durante 5 min en hielo, se centrifugó el lisado 5 min a 14000 rpm; posteriormente se pasó el lisado en la columna QIAshredder, se centrifugó 2 min a 14000 rpm; se transfirió el flujo a un tubo nuevo sin perturbar el sedimento; se agregó 1,5 volúmenes de Buffer AW1 y se mezcló pipeteando. Se transfirió 650 µl de la mezcla a una columna DNeasy Mini, se centrifugó 1 min a ≥ 8000 rpm, se desechó el flujo continuo y repitió este paso con la muestra restante. Se colocó la columna de centrifugación en un nuevo tubo de 2 ml, se añadió 500 µl de tampón AW2 y se centrifugó 1 min a ≥ 6000 rpm, se desechó el flujo continuo, se agregó otros 500 µl de tampón AW2, se centrifugó 2 min a 14,000 rpm evitando el contacto de la columna con el flujo continuo. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de 2 ml, se agregó 100 µl de tampón AE para elución, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (15–25°C) y se centrifugó 1 min a ≥ 6000 rpm (QIAGEN, 2016).

- **Cuantificación del ADN**

Previamente se colocó 1,5 µL de agua libre de nucleasas en el pocillo, para realizar la limpieza del equipo por 5 min; se colocó 2 µL de agua libre de nucleasas (blanco), se seleccionó el tipo de ácido nucleico a cuantificar y blanquear, se limpió el pocillo, se colocó 1,5 µL de muestra para determinar la concentración y pureza del ADN genómico en una longitud de onda de 260/280 nm (Thermo Scientific, 2009).

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Preparación de reactivos: Se preparó la solución stock de los cebadores (25 µM/50 µL) y del ADN (30ng/µL). Las concentraciones (25 µL/1µL de ADN) y el programa empleado para cada PCR están en dependencia del cebador utilizado.

Proceso PCR: A continuación, en las Tablas 5, 6 y 7, se detallan las cantidades que fueron requeridas para la amplificación de regiones conservadas que codifican para regiones del ADN_r y fragmentos de ADN, se mezcló adecuadamente los productos antes de dispensar.

Tabla 5. Detalle de las concentraciones de los reactivos y del programa de amplificación para cebadores ITS

Secuencia oligonucleótidos	Banda específica
ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	0,29 kb
Reacción de 25 µL (1µL de ADN)	Ciclo térmico
1 U de Taq (Taq DNA Polimerasa) 0,5 µM de cada primer 0,2 mM de cada dNTP 1,5 mM MgCl ₂ 1X tampón PCR	95°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min 58°C por 30 s y 72°C durante 1s

Fuente: (White T. , Bruns, Lee, & Taylor, 1990)

Tabla 6. Detalle de las concentraciones de los reactivos y del programa de amplificación para cebadores C729 +/-

Secuencia oligonucleótidos	Banda específica
C ₇₂₉ + (5'-AGCTCGAGAGAGATCTCTGA-3') C ₇₂₉ - (5'-CTGCAATGTTCTGCGTGGAA-3')	0,73 kb
Reacción de 25 µL (1µL de ADN)	Ciclo térmico
2,5 U de Taq (Taq DNA Polimerasa) 0,4 µM de cada primer 0,2 mM de cada dNTP 3 mM MgCl ₂ 1X tampón PCR	95°C durante 3 min, seguido por 34 ciclos a 94°C por 20 s, 60°C por 20 s y 72°C durante 30 s

Fuente: (Rigotti, Gindro, Richter, & Viret, 2002)

Tabla 7. Detalle de las concentraciones de los reactivos y del programa de amplificación para cebadores BC108+ y BC563-

Secuencia oligonucleótidos	Banda específica
BC ₁₀₈ + (5'-ACCCGCACCTAATTCGTCAAC-3') BC ₅₆₃ - (5'-GGGTCTTCGATACGGGAGAA-3')	0,48 kb - 0,36 kb
Reacción de 25 µL (1µL de ADN)	Ciclo térmico
1 U de Taq (Taq DNA Polimerasa) 0,5 µM de cada primer 0,2 mM de cada dNTP 3 mM MgCl ₂	95°C durante 3 min, seguido por 34 ciclos a 94°C por 1 min, 58°C por 30 s y

1X tampón PCR	72°C durante 1 min
---------------	--------------------

Fuente: (Rigotti, Viret, & Gindro, 2006)

- **Electroforesis**

Preparación de reactivos: Se preparó EDTA 0.5M (18.61 g EDTA + 100 mL agua destilada Tipo I - pH 8.0), se esterilizó y conservó a 4°C; con esta solución se preparó TBE 5X añadiendo a un 1 L agua destilada Tipo I 54 g Tris-base + 27.5 g ácido bórico + 20 mL EDTA 0.5M, se ajustó el pH a 8.3, se esterilizó y se conservó a 4°C; para la electroforesis se diluyó TBE a 0.5X (100 mL TBE 5X + 900 mL agua destilada Tipo I). Se preparó la solución de agarosa al 1.5% mezclando 65 mL TBE 0.5X + 0.975 g agarosa, se calentó por 1.5 min, se dejó temperar y se agregó 3 µL de SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Sambrook & Russell, 2001).

Proceso de electroforesis: En la cámara de electroforesis se colocó el peine y las barras en el recipiente, se vertió el gel de agarosa y se esperó 20 min hasta su polimerización, se retiró el peine y se agregó el tampón TBE 0.5X hasta cubrir el gel, se posicionó los pocillos de carga en dirección al cátodo para que migre el ADN hacia el ánodo. Se añadió 4 µL del producto PCR con 1 µL de Blue Juice™ Gel Loading Buffer (10X) Invitrogen, se mezcló y vertió 5 µL en cada pocillo, se cargó 5 µL del marcador de peso molecular, control positivo y negativo. Se programó la fuente a 100V por un lapso de 30-45 min. Se visualizó los amplicones de los productos PCR sobre un trasiluminador UV y se estimó el peso molecular del producto PCR con referencia al marcador molecular usado (Sambrook & Russell, 2001).

- **Purificación del producto PCR**

Preparación de reactivos: Se agregó 10 ml de isopropanol al tampón de unión (B2) y 64 ml de etanol al 96–100 % al tampón de lavado (W1) (Invitrogen, 2011).

Proceso de purificación: Después de completar la electroforesis en gel de agarosa, se cortó el área que contiene el fragmento con una bisturí estéril minimizando la cantidad de agarosa a su alrededor y se colocó en un tubo eppendorf limpio y estéril; se pesó el fragmento del gel, se añadió 3 volúmenes del Tampón de solubilización del gel (L3); se incubó a 50°C al menos 10 min en baño maría invirtiendo el tubo cada 5 min, después que el fragmento se disolvió, se incubó el tubo 5 min adicionales y para rendimientos óptimos de ADN se agregó 1 volumen de isopropanol (100%) al gel disuelto. Se traspasó la solución a la columna PureLink®, se centrifugó a >10000 rpm por 1 min, se descartó el flujo, se agregó 500 µL de tampón de lavado (W1), se centrifugó nuevamente a >10000 rpm por 1 min y se descartó el flujo; se centrifugó a máxima velocidad por 3 min para eliminar cualquier resto de tampón de lavado y etanol. Se colocó la columna en un nuevo tubo y se agregó 50 µL de tampón de elución (E1) al centro de la columna; se incubó el tubo por 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a >10000 rpm por 1 min. Se descartó la columna de centrifugación PureLink® y guardó el ADN purificado a 4 °C para uso inmediato o se lo guardó a -20°C para almacenamiento a largo plazo (Invitrogen, 2011).

- **Análisis genético**

El tamaño de las bandas amplificadas fue estimado de acuerdo con el marcador molecular utilizado, detallado en el Anexo 12. Estos productos PCR purificados fueron los enviados para el proceso de secuenciación mediante la técnica Sanger automatizada en la empresa Macrogen Inc en Seoul- Corea; los productos se llevaron a una concentración de 40 ng/µL. Las secuencias obtenidas de las regiones ITS 1-4, BC₁₀₈ + BC₅₆₃ – y C₇₂₉ +/- fueron contrastados con probables genes homólogos disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la aplicación de alineamiento local BLAST (Basic Local Alignment

Search Tool) (NCBI, 2022). Para el alineamiento de los datos se utilizó el programa MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), para eliminar las señales de ruido de fondo y verificar las bases nitrogenadas. En la evaluación a nivel molecular de las secuencias se aplicaron los modelos probabilísticos MUSCLE para el alineamiento múltiple de secuencias y Maximun Likelihood Algorithm para los árboles filogenéticos (Tamura, y otros, 2012).

2.2.6. Validación y aseguramiento de la calidad del ensayo

El proceso de validación debe aportar evidencia objetiva en condiciones reales para verificar si el método cumple con los requisitos de confiabilidad y satisfacen los requisitos necesarios para confirmar la incertidumbre de medida especificada por el fabricante y que el laboratorio domina el método de ensayo y lo utiliza correctamente (JCGM, 2012). Es necesario indicar que el método del ensayo “Diagnostico de *Botrytis cinerea* mediante el Sistema de Identificación Microbiana BIOLOG” (alcance de acreditación) es cualitativo y su resultado se expresa en términos de “No ID” o “Species ID: *Nombre de la especie identificada*” (BIOLOG, 2008); en la Tabla 8 se muestra el diseño experimental. Además se generaron los documentos “Informe de validación” y “Declaración de Validación”.

Tabla 8. Definición diseño experimental: (analista/día x aislado)

Analista/día	Aislado		
1	Asilado 1	Aislado 2	Aislado 3
2	Asilado 1	Aislado 2	Aislado 3
3	Asilado 1	Aislado 2	Aislado 3

Fuente (La autora, 2023)

- **Selectividad/especificidad**

Para poder asegurar la selectividad y especificidad se diseñó un estudio experimental del efecto de las mencionadas interferencias, mediante la adición de cantidades conocidas de muestras consideradas positivas y negativas (conocidas), que permitieron evaluar resultados POSITIVOS (Verdaderos y Falsos) y NEGATIVOS (Verdaderos y Falsos). El análisis de los

datos se realizó considerando la siguiente distribución descrita en la Tabla 9 de los resultados obtenidos durante los ensayos (NATA, 2018).

Tabla 9. Diagrama de distribución para la determinación del porcentaje de sensibilidad y selectividad

		Condición		
		Positivo	Negativo	
Resultado ensayo	Positivo	Positivo verdadero	Falso positivo	→ Valor predictivo Positivo
	Negativo	Falso negativo	Negativo verdadero	→ Valor predictivo negativo
		↓ Sensibilidad	↓ Selectividad	

Fuente: (NATA, 2018)

- **Precisión (Repetibilidad / Reproducibilidad)**

La precisión (repetibilidad / reproducibilidad) de métodos cualitativos, se evaluó a través de la siguiente función:

$$Presición = \frac{Número\ positivos\ verdaderos}{Número\ de\ positivos\ verdaderos + número\ de\ falsos\ verdaderos}$$

- **Veracidad**

La veracidad del método se estableció por la comparación de los resultados, obtenidos en el diseño experimental, de los Materiales de Referencia (MRi) con los valores teóricos de los mismos, se determinó el grado de concordia entre el valor obtenido y el valor esperado. La recuperación en cada punto se calculó mediante la siguiente expresión:






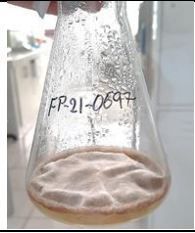

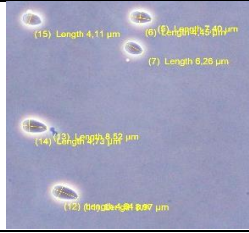





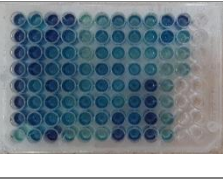
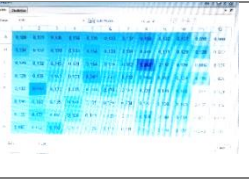



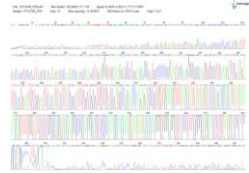
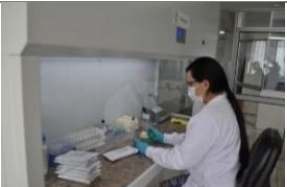



$$\% Recuperación = \frac{X_{obtenido}}{X_{esperado}} \times 100$$

Dónde: X_{obtenido} = es el resultado obtenido del análisis del material de referencia
utilizado

X_{esperado} = es el valor teórico del mismo.

En la Tabla 10 se muestra un esquema completo del proceso de identificación, diagnóstico y validación de *B. cinerea*

Tabla 10. Esquema del proceso de identificación, diagnóstico y validación de *B. cinerea*

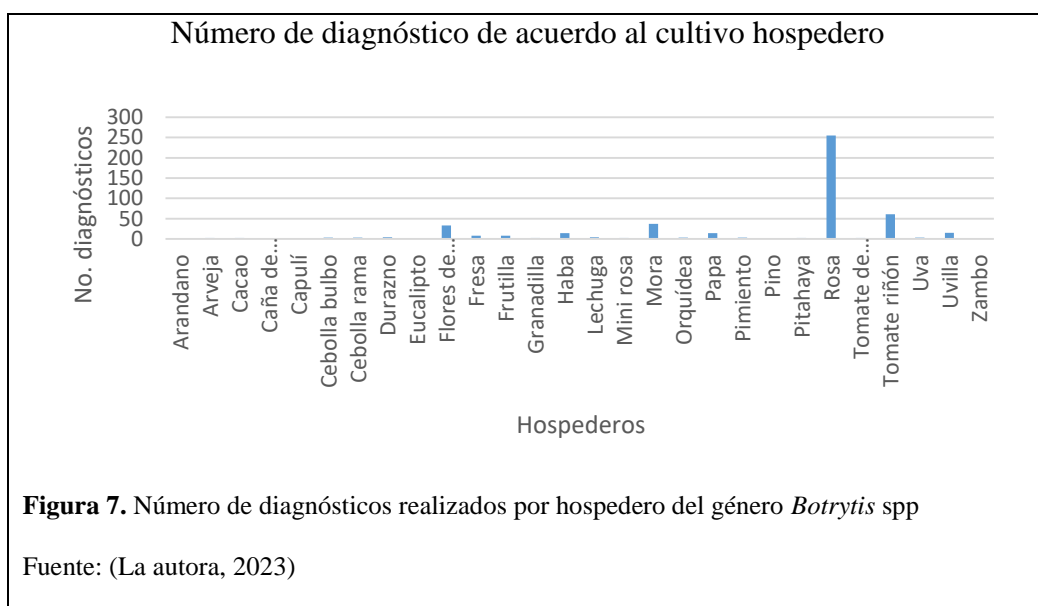
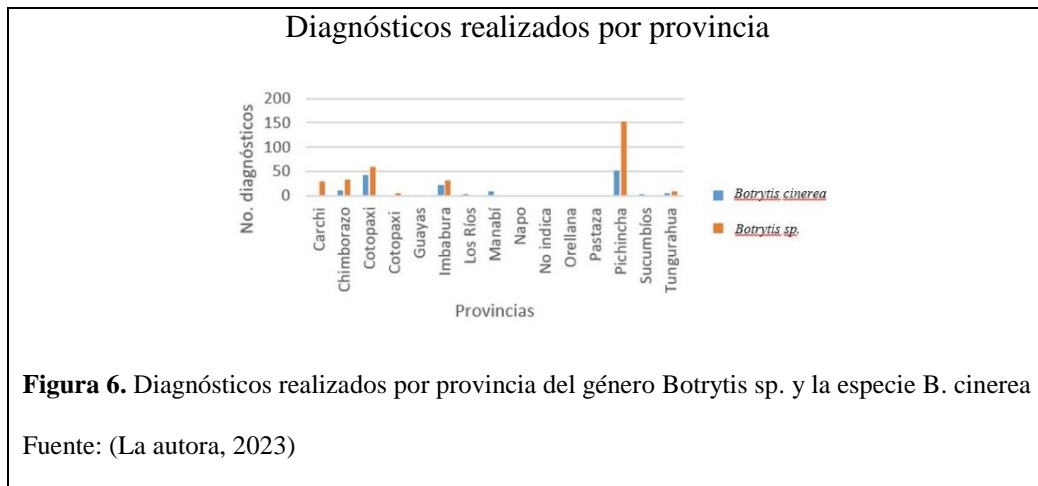
Métodos morfológico y morfométrico			
Aislamiento	Purificación	Inoculación	Inoculación
			
Conservación	Masificación	Monospórico	Morfometría
			
Bioquímico			
			
Inmunoensayo			
			
Molecular			
			
Validación			
			

Fuente: (La autora, 2023)

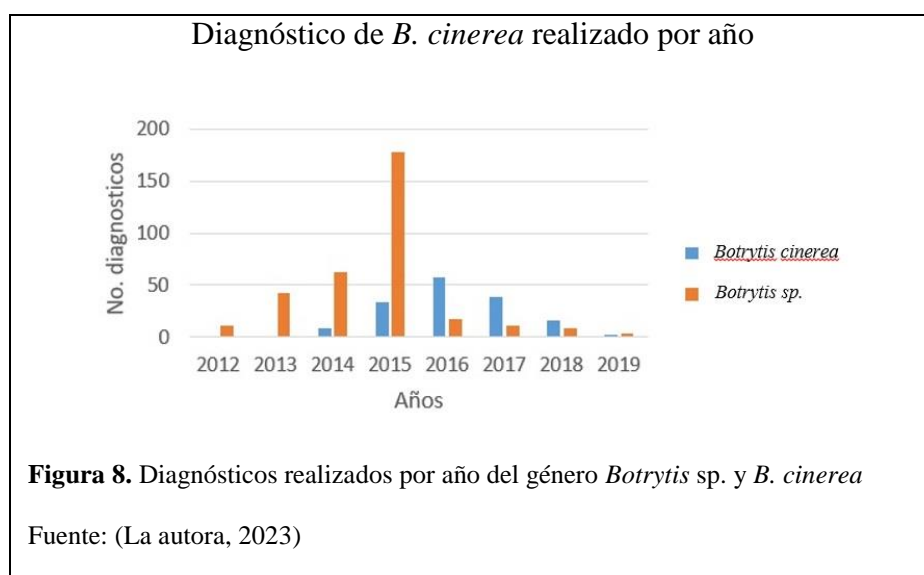
Capítulo III

3. Resultados y discusión

En las Figuras 6 y 7 se presenta el total de diagnósticos por hospedero y por provincias, lo que permitió establecer que las provincias con mayor presencia del patógeno son Pichincha, Cotopaxi e Imbabura y que los hospederos más frecuentes son rosa, tomate riñón, mora y flores de verano (incluye los géneros *Chrysanthemum* sp., *Lisianthus* sp., *Euphorbia* sp., *Ruscus* sp., *Hypericum* sp., *Protea* sp., *Aster* sp., *Ranunculus* sp., *Gypsophila* sp., *Limonium* sp., *Lysimachia* sp., *Veronica* sp., *Geranium* sp., *Dianthus* sp., *Kalanchoe* sp., etc).

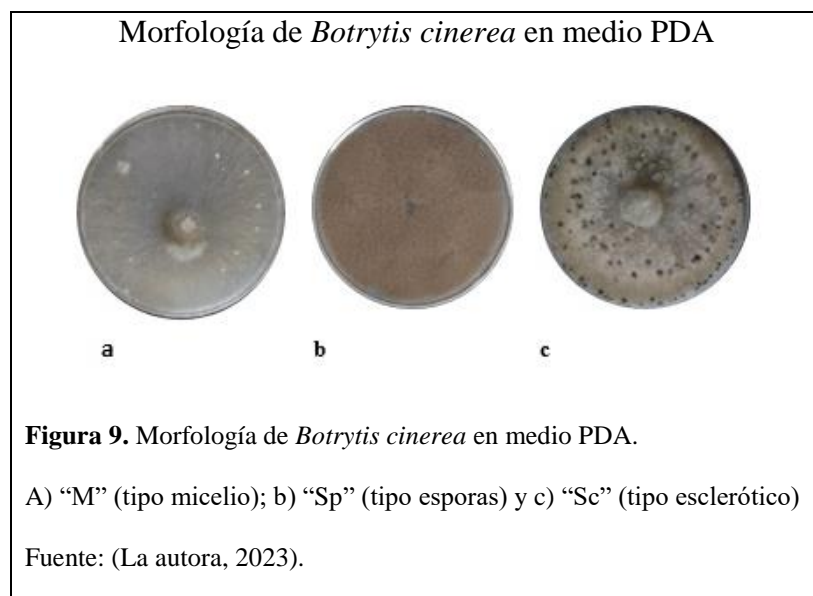


Como se muestra en la Figura 8 el intervalo de tiempo para la estimación de estos indicadores está comprendido entre el 2012 – 2019 y abarca las áreas geográficas donde se cultivan los hospederos de este patógeno, los diagnósticos realizados durante el 2020-2021 no fueron considerados debido a la irrupción provocada por la pandemia. El cambio en la distribución del número de muestras diagnosticadas tanto a género como a especie se debe a políticas y objetivos que la Agencia debe cumplir de acuerdo con las actualizaciones de los requerimientos fitosanitarios nacionales, regionales e internacionales. A partir del análisis de estos datos se seleccionaron las provincias de Pichincha, Imbabura, Chimborazo, Cotopaxi, Napo y Manabí, además, con la intención de poder identificar diferentes géneros se escogió los cultivos de haba, rosa, tomate riñón, flores de verano, cebolla, tomate de árbol, uva, lechuga, orquídeas, arándano, ajo, durazno, papa, uvilla y pimiento. Cabe mencionar que la toma de muestras en el campo por parte del personal del laboratorio no se pudo realizar debido a medidas de restricción y bioseguridad relacionados con la pandemia, pero la revisión oportuna y profunda de información referente al género *Botrytis* spp. permitió asesorar y entregar material bibliográfico a los técnicos de campo de las distritales provinciales, que, por logística colaboraron con el muestreo (AGROCALIDAD, 2018).



3.1. Análisis morfológico y morfométrico

El proceso de aislamiento y replicación sucesiva (purificación) para obtener cultivos de esporas individuales (aislado monospórico) de los 33 aislados de *Botrytis* spp. recolectados en varias provincias y de diferentes cultivos dio como resultado un gran número de cepas morfológicamente heterogéneas. Es necesario indicar que este proceso permitió observar que algunas cepas permanecieron uniformes, mientras que otras continuaron diferenciándose en la cantidad, forma y color del micelio tal como se muestra en el Anexo 13. En la Figura 9 se resumen las formas arbitrarias seleccionadas para distinguir la morfología del hongo, estos aislados fueron manipulados en iguales condiciones y sus apreciaciones se describen en el Anexo 14 en el cual se destacan las características morfológicas desarrolladas por los 33 aislados de *Botrytis* spp. durante 30 días en medios de cultivos PDA y EMA lo cual afirma la variabilidad de crecimiento del hongo dependiendo de las condiciones en las que se encuentre.



La diferenciación morfológica posiblemente pueda relacionarse con la anastomosis de hifas, la cual es muy común en esta especie. Este componente de reproducción le permite al hongo migrar los núcleos de una cepa a las células de otras cepas y así dar lugar a células y esporas

que contienen 2 o más tipos de núcleos genéticamente diferentes; la unidad básica del individuo es el núcleo y no la célula, por lo tanto, una espora nucleada no es un individuo sino, en realidad, una colonia y no puede, por tanto, dar lugar a un cultivo genéticamente puro a menos que todos sus núcleos sean genéticamente idénticos, es así que, las formas variables pueden deberse a su inestabilidad (heterocariosis) y no a la mutación, esta condición es provocada tanto *in vivo* como *in vitro* (Hansen & Smith, 1932). En general el detalle de la diferenciación morfológica se evidenció, pues todos los aislados mantuvieron un crecimiento ajustado a lo descrito bibliográficamente en el Anexo 14, presentando diferencias en el desarrollo de estructuras celulares, color y tasa de crecimiento.

El ensayo de inoculación permitió observar que todos los aislados fueron capaces de crecer sobre los pétalos, formando micelio, conidios e incluso en algunos se evidencio la generación de esclerocios, esto permitió definir que tanto los aislados reconstituidos y los nuevos mantenían su vigor infectivo (virulencia), por otro lado, el efecto obtenido de la infección en los otros hospederos fue deficiente, pues los cultivos de cebolla, haba y ajo, no presentaron esporulación fúngica, esto puede deberse a que estos hospederos requieren de diferentes condiciones que propicien su infección como diferentes horas luz y temperatura (Elad, Williamson, Tudzynski, & Delen, 2007). Existen estudios que determinan que el micelio joven preferentemente guarda relación con la vigorosidad y principios activos para la producción de enzimas que producen la infección (Brown, 1915), por lo que, se puede entender que después de todos los subcultivos de las cepas se modere su patogenia, además la especie *B. cinerea* puede visualizarse en cualquier momento, como un grupo de numerosas razas o cepas morfológicamente congruentes con la planta hospedante pero que *in vitro* muestran un cultivo marcado y constantemente diferente (Jarvis, 1977).

El estudio de análisis de varianza detallado en la Tabla 11 de las medidas de conidios (largo/ancho) a 7 días de la incubación son: el valor $p < 0,05$ muestra significancia estadística, indicando fuerte evidencia en contra de la hipótesis nula, lo que quiere decir, que los estadísticos de los aislados que se comparan son diferentes entre sí. De manera similar la prueba de Tukey al 95% para la interacción de las medidas de largo, reporta 8 rangos de significancia, el rango A y B (FP-15-1204, FP-17-1484, FP-21-709 y FP-21-728) presentan altos valores de sus medias y el rango H (FP-21-0015) el valor más inferior. La interacción de las medidas de ancho, reportan 10 rangos de significancia, el rango A (FP-15-1204, FP-17-1484, FP-21-709 y FP-21-728) presenta valores de medias altas y el rango J (FP-21-0378) presenta la media de menor valor, los otros aislados formaron grupos significativamente similares en cuanto a sus medias.

Tabla 11. ANOVA de las magnitudes (largo y ancho) de 30 conidios (2 réplicas) por cada aislado con un nivel de significancia del 0,5% y comparación de medias de Tukey al 95%

Método para largo de conidios (μm)						Método para ancho de conidios (μm)					
Hipótesis nula		Todas las medias son iguales				Hipótesis nula		Todas las medias son iguales			
Hipótesis alterna		Por lo menos una media es diferente				Hipótesis alterna		Por lo menos una media es diferente			
Nivel de significancia		$\alpha = 0,05$				Nivel de significancia		$\alpha = 0,05$			
Se propuso igualdad de varianzas para el análisis.						Se propuso igualdad de varianzas para el análisis.					
Información del factor						Información del factor					
Factor Niveles Valores						Factor Niveles Valores					
Factor 33 (FP-14-0540; FP-15-0024; FP-15-1204; FP-17-1484; FP-18-1553; FP-20-0115;FP-20-0228; FP-20-0268; FP-20-0542; FP-20-0577; FP-21-0003; FP-21-0015;FP-21-0016; FP-21-0034; FP-21-0101; FP-21-0121; FP-21-0327; FP-21-0328;FP-21-0378; FP-21-0379; FP-21-0614; FP-21-0695; FP-21-0697; FP-21-0698; FP-21-0699; FP-21-0705; FP-21-0707; FP-21-0709; FP-21-0713; FP-21-0717;FP-21-0718; FP-21-0728; FP-21-0809)						Factor 33 (FP-14-0540; FP-15-0024; FP-15-1204; FP-17-1484; FP-18-1553; FP-20-0115;FP-20-0228; FP-20-0268; FP-20-0542; FP-20-0577; FP-21-0003; FP-21-0015;FP-21-0016; FP-21-0034; FP-21-0101; FP-21-0121; FP-21-0327; FP-21-0328;FP-21-0378; FP-21-0379; FP-21-0614; FP-21-0695; FP-21-0697; FP-21-0698; FP-21-0699; FP-21-0705; FP-21-0707; FP-21-0709; FP-21-0713; FP-21-0717;FP-21-0718; FP-21-0728; FP-21-0809)					
Análisis de Varianza						Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	32	835,7	26,1159	41,99	0,000	Factor	32	365,5	11,4220	38,35	0,000
Error	1947	1210,8	0,6219			Error	1947	579,9	0,2978		
Total	1979	2046,5				Total	1979	945,4			
Resumen del modelo						Resumen del modelo					
S	R-cuad.	R-cuad.(ajustado)	R-cuad.(pred)			S	R-cuad.	R-cuad.(ajustado)	R-cuad.(pred)		
0,788605	40,84%	39,86%	38,81%			0,545734	38,66%	37,65%	36,57%		
Medias						Medias					
Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%		Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%	
FP-14-0540	60	8,7368	0,4765	(8,5371; 8,9364)		FP-14-0540	60	6,8842	0,3758	(6,7460; 7,0223)	
FP-15-0024	60	8,5786	0,2616	(8,3789; 8,7782)		FP-15-0024	60	6,3868	0,2462	(6,2487; 6,5250)	

FP-15-1204	60	11,285	2,295	(11,085; 11,484)	FP-15-1204	60	7,559	1,013	(7,421; 7,697)
FP-17-1484	60	10,745	2,526	(10,546; 10,945)	FP-17-1484	60	7,611	1,618	(7,473; 7,749)
FP-18-1553	60	8,6284	0,3599	(8,4287; 8,8281)	FP-18-1553	60	6,3869	0,3483	(6,2487; 6,5251)
FP-20-0115	60	9,0119	0,4935	(8,8122; 9,2116)	FP-20-0115	60	6,3876	0,3789	(6,2495; 6,5258)
FP-20-0228	60	8,7175	0,6700	(8,5178; 8,9171)	FP-20-0228	60	6,2539	0,6994	(6,1157; 6,3921)
FP-20-0268	60	8,9906	0,5344	(8,7909; 9,1903)	FP-20-0268	60	6,8679	0,3874	(6,7298; 7,0061)
FP-20-0542	60	8,6629	0,4704	(8,4632; 8,8625)	FP-20-0542	60	7,0576	0,5668	(6,9195; 7,1958)
FP-20-0577	60	8,9343	0,4500	(8,7347; 9,1340)	FP-20-0577	60	6,2282	0,3880	(6,0901; 6,3664)
FP-21-0003	60	9,3785	0,4035	(9,1788; 9,5781)	FP-21-0003	60	6,7213	0,3390	(6,5831; 6,8595)
FP-21-0015	60	7,8259	0,4987	(7,6263; 8,0256)	FP-21-0015	60	6,5862	0,6566	(6,4480; 6,7243)
FP-21-0016	60	9,9457	0,6482	(9,7460; 10,1453)	FP-21-0016	60	7,0594	0,5295	(6,9212; 7,1976)
FP-21-0034	60	8,5675	0,2551	(8,3678; 8,7671)	FP-21-0034	60	7,0771	0,4193	(6,9390; 7,2153)
FP-21-0101	60	8,7936	0,4399	(8,5939; 8,9932)	FP-21-0101	60	6,6924	0,2936	(6,5543; 6,8306)
FP-21-0121	60	9,0233	0,5021	(8,8237; 9,2230)	FP-21-0121	60	6,3228	0,3931	(6,1846; 6,4610)
FP-21-0327	60	9,0900	0,5631	(8,8903; 9,2897)	FP-21-0327	60	6,6641	0,5341	(6,5259; 6,8023)
FP-21-0328	60	9,5135	0,7024	(9,3138; 9,7131)	FP-21-0328	60	6,4501	0,4520	(6,3119; 6,5883)
FP-21-0378	60	9,0239	0,7443	(8,8242; 9,2235)	FP-21-0378	60	6,1882	0,4394	(6,0500; 6,3264)
FP-21-0379	60	8,6698	0,3880	(8,4701; 8,8694)	FP-21-0379	60	6,4308	0,2632	(6,2926; 6,5690)
FP-21-0614	60	9,1710	0,4210	(8,9714; 9,3707)	FP-21-0614	60	6,4663	0,3818	(6,3281; 6,6044)
FP-21-0695	60	9,0232	0,4868	(8,8235; 9,2229)	FP-21-0695	60	6,7754	0,2991	(6,6372; 6,9135)
FP-21-0697	60	9,1644	0,6488	(8,9647; 9,3641)	FP-21-0697	60	6,6673	0,5361	(6,5292; 6,8055)
FP-21-0698	60	9,0637	0,3843	(8,8640; 9,2633)	FP-21-0698	60	6,3742	0,3254	(6,2360; 6,5124)
FP-21-0699	60	8,9600	0,6599	(8,7603; 9,1596)	FP-21-0699	60	6,3867	0,5706	(6,2485; 6,5249)
FP-21-0705	60	8,8998	0,5811	(8,7001; 9,0995)	FP-21-0705	60	6,7795	0,4967	(6,6413; 6,9177)
FP-21-0707	60	8,6530	0,6039	(8,4533; 8,8526)	FP-21-0707	60	6,4042	0,3449	(6,2660; 6,5424)
FP-21-0709	60	10,0460	0,6108	(9,8464; 10,2457)	FP-21-0709	60	7,6738	0,4565	(7,5357; 7,8120)
FP-21-0713	60	8,8174	0,7026	(8,6178; 9,0171)	FP-21-0713	60	6,1887	0,5180	(6,0505; 6,3268)
FP-21-0717	60	8,9840	0,4336	(8,7844; 9,1837)	FP-21-0717	60	6,4433	0,3337	(6,3052; 6,5815)
FP-21-0718	60	9,3546	0,5637	(9,1549; 9,5542)	FP-21-0718	60	6,8417	0,5195	(6,7035; 6,9799)
FP-21-0728	60	10,0033	0,4788	(9,8036; 10,2029)	FP-21-0728	60	7,7500	0,4851	(7,6118; 7,8882)
FP-21-0809	60	8,7188	0,6850	(8,5191; 8,9184)	FP-21-0809	60	6,5117	0,4461	(6,3735; 6,6498)

Desv.Est. agrupada = 0,788605

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
FP-15-1204	60	11,285	A
FP-17-1484	60	10,745	A
FP-21-0709	60	10,0460	B
FP-21-0728	60	10,0033	B
FP-21-0016	60	9,9457	B
FP-21-0328	60	9,5135	B C
FP-21-0003	60	9,3785	C D
FP-21-0718	60	9,3546	C D E
FP-21-0614	60	9,1710	C D E F
FP-21-0697	60	9,1644	C D E F
FP-21-0327	60	9,0900	C D E F G
FP-21-0698	60	9,0637	C D E F G
FP-21-0378	60	9,0239	C D E F G
FP-21-0121	60	9,0233	C D E F G
FP-21-0695	60	9,0232	C D E F G
FP-20-0115	60	9,0119	C D E F G
FP-20-0268	60	8,9906	C D E F G
FP-21-0717	60	8,9840	C D E F G
FP-21-0699	60	8,9600	D E F G
FP-20-0577	60	8,9343	D E F G
FP-21-0705	60	8,8998	D E F G
FP-21-0713	60	8,8174	E F G
FP-21-0101	60	8,7936	F G
FP-14-0540	60	8,7368	F G
FP-21-0809	60	8,7188	F G
FP-20-0228	60	8,7175	F G
FP-21-0379	60	8,6698	F G
FP-20-0542	60	8,6629	F G
FP-21-0707	60	8,6530	F G
FP-18-1553	60	8,6284	F G
FP-15-0024	60	8,5786	G

Desv.Est. agrupada = 0,545734

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

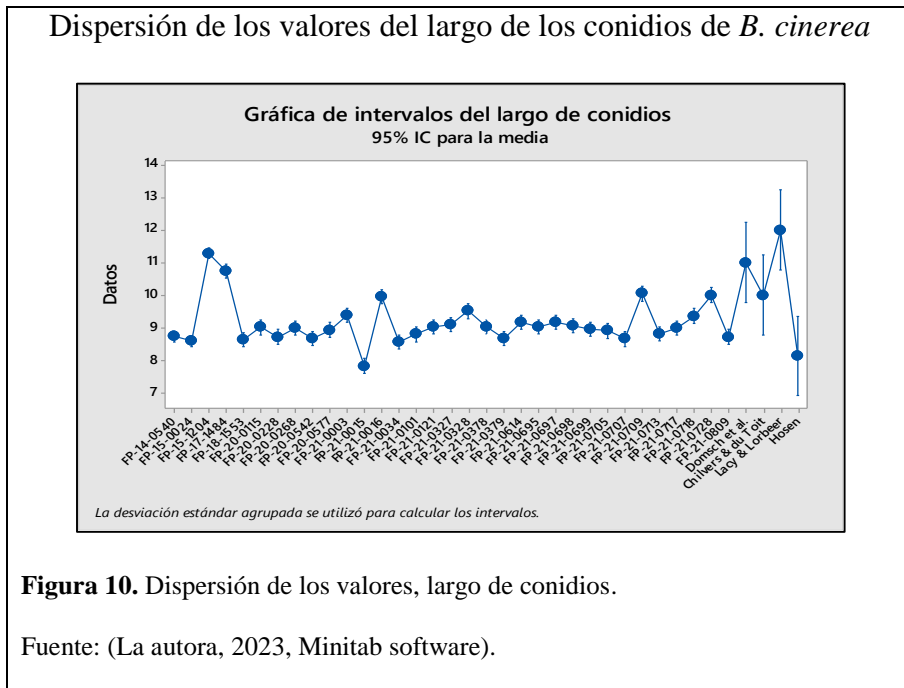
Factor	N	Media	Agrupación
FP-21-0728	60	7,7500	A
FP-21-0709	60	7,6738	A
FP-17-1484	60	7,611	A
FP-15-1204	60	7,559	A
FP-21-0034	60	7,0771	B
FP-21-0016	60	7,0594	B C
FP-20-0542	60	7,0576	B C
FP-14-0540	60	6,8842	B C D
FP-20-0268	60	6,8679	B C D
FP-21-0718	60	6,8417	B C D E
FP-21-0705	60	6,7795	B C D E F
FP-21-0695	60	6,7754	B C D E F
FP-21-0003	60	6,7213	B C D E F G
FP-21-0101	60	6,6924	C D E F G H
FP-21-0697	60	6,6673	D E F G H
FP-21-0327	60	6,6641	D E F G H
FP-21-0015	60	6,5862	D E F G H I
FP-21-0809	60	6,5117	D E F G H I J
FP-21-0614	60	6,4663	E F G H I J
FP-21-0328	60	6,4501	F G H I J
FP-21-0717	60	6,4433	F G H I J
FP-21-0379	60	6,4308	F G H I J
FP-21-0707	60	6,4042	F G H I J
FP-20-0115	60	6,3876	G H I J
FP-18-1553	60	6,3869	G H I J
FP-15-0024	60	6,3868	G H I J
FP-21-0699	60	6,3867	G H I J
FP-21-0698	60	6,3742	G H I J
FP-21-0121	60	6,3228	H I J
FP-20-0228	60	6,2539	I J
FP-20-0577	60	6,2282	I J

FP-21-0034	60	8,5675	G	FP-21-0713	60	6,1887	J
FP-21-0015	60	7,8259	H	FP-21-0378	60	6,1882	J
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.				Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

Fuente: (La autora, 2023) Minitab software

Como se puede evidenciar la variación entre las medias de los aislados y dentro de las muestras son diferentes, esta variación se presenta tanto en aislados reconstituidos como nuevos, esto se debe a factores evolutivos que infieren en el desarrollo del hongo cuando es aislado en medios artificiales (Jarvis, 1977), además, contrasta con la información morfológica obtenida durante el crecimiento del micelio y detallados en el Anexo 13.

Para la identificación morfométrica se realizó una comparación de las medidas de los aislados con medidas de referencia bibliográfica. La desviación estándar agrupada para la medida de largo de conidios es 0,879564 y la desviación estándar agrupada para las medidas de ancho fue 0,57263, estos valores indican que la mayor parte de los datos están agrupados cerca de su media, en las Figuras 10 y 11 se muestran las dispersiones de los datos y se puede observar que las medidas de los conidios se encuentran dentro de los límites de las medidas utilizadas como referencia bibliográfica.



Dispersión de los valores del ancho de conidios de *B. cinerea*

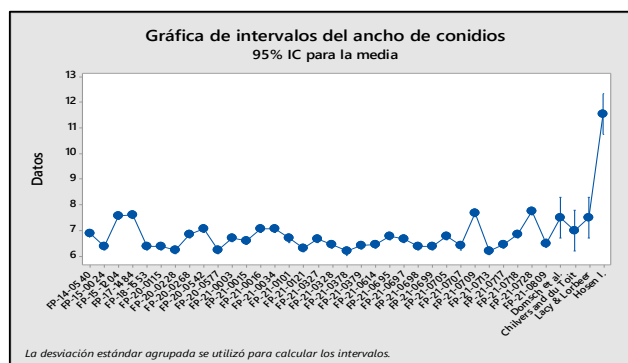


Figura 11. Dispersión de los valores, ancho de conidios

Fuente: (La autora, 2023, Minitab software).

3.2. Análisis bioquímico

Los datos obtenidos al día 4 de incubación, permite verificar la capacidad de los aislados para utilizar las fuentes de carbono de la FF MicroPlates tales como: D-celobiosa, α -D-Glucosa, D-xilosa, sucrosa, L-arabinosa, maltosa, manosa, entre otros (Anexo 8), las cuales son degradadas por las enzimas que posee *B. cinerea* (pectinasas, celulasas, xilanasas, arabinasas, proteasas aspárticas y lacasas) (Kars & van Kan, 2007), durante la incubación permitiéndolo obtener su perfil metabólico que se muestra en el Anexo 15. Como se puede observar en la Tabla 12, todas las identificaciones de los aislados tuvieron un ID: *B. cinerea* Persoon BGA, con valor de 1,00 para la probabilidad de confianza (BIOLOG, 2010).

Tabla 12. Datos de las probabilidades de lecturas (96 h) para la identificación de *B. cinerea* en

las FF MicroPlates

No	CODIGO	PROB	SIM	ID
1	FP-14-0540	1,00	0,827	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
2	FP-15-0024	1,00	0,827	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
3	FP-15-1204	1,00	0,827	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
4	FP-17-1484	1,00	0,835	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
5	FP-18-1553	1,00	0,802	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
6	FP-20-0115	1,00	0,827	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
7	FP-20-0228	1,00	0,813	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
8	FP-20-0268	1,00	0,707	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
9	FP-20-0542	1,00	0,722	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
10	FP-20-0577	1,00	0,880	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA

11	FP-21-0003	1,00	0,827	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
12	FP-21-0015	1,00	0,626	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
13	FP-21-0016	1,00	0,827	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
14	FP-21-0034	1,00	0,728	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
15	FP-21-0101	1,00	0,687	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
16	FP-21-0121	1,00	0,739	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
17	FP-21-0327	1,00	0,707	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
18	FP-21-0328	1,00	0,713	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
19	FP-21-0378	1,00	0,827	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
20	FP-21-0379	1,00	0,676	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
21	FP-21-0614	1,00	0,815	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
22	FP-21-0695	1,00	0,793	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
23	FP-21-0697	1,00	0,850	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
24	FP-21-0698	1,00	0,676	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
25	FP-21-0699	1,00	0,739	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
26	FP-21-0705	1,00	0,783	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
27	FP-21-0707	1,00	0,812	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
28	FP-21-0709	1,00	0,827	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
29	FP-21-0713	1,00	0,714	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
30	FP-21-0717	1,00	0,783	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
31	FP-21-0718	1,00	0,700	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
32	FP-21-0728	1,00	0,828	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA
33	FP-21-0809	1,00	0,867	<i>B. cinerea</i> Persoon BGA

Fuente: (La autora, 2023)

3.3. Análisis inmunoensayo

La Tabla 13, presenta resultados de lecturas fotométricas (650 nm) de la conjugación de anticuerpos-antígenos según la distribución de las muestras en la placa descrita en el Anexo 16.

Tabla 13. Datos obtenidos para la identificación de *B. cinerea* en el ensayo bioquímico

Código muestra	DO 650 nm			Resultado
	1R	2R	\bar{x}	
FP-14-0540	0,679	0,612	0,6455	Reactivo
FP-15-0024	0,620	0,586	0,6030	Reactivo
FP-15-1204	0,603	0,573	0,5880	Reactivo
FP-17-1484	0,437	0,583	0,5100	Reactivo
FP-18-1553	0,657	0,628	0,6425	Reactivo
FP-20-0115	0,475	0,508	0,4915	Reactivo
FP-20-0228	0,603	0,538	0,5705	Reactivo
FP-20-0268	0,671	0,699	0,6850	Reactivo
FP-20-0542	0,499	0,519	0,5090	Reactivo
FP-20-0577	0,627	0,559	0,5930	Reactivo
FP-21-0003	0,539	0,700	0,6195	Reactivo
FP-21-0015	0,511	0,494	0,5025	Reactivo
FP-21-0016	0,568	0,544	0,5560	Reactivo
FP-21-0034	0,380	0,477	0,4285	Reactivo

FP-21-0101	0,250	0,249	0,2495	Reactivo
FP-21-0121	0,405	0,404	0,4045	Reactivo
FP-21-0327	0,489	0,508	0,4985	Reactivo
FP-21-0328	0,471	0,427	0,4490	Reactivo
FP-21-0378	0,527	0,524	0,5255	Reactivo
FP-21-0379	0,510	0,482	0,4960	Reactivo
FP-21-0614	0,441	0,489	0,4650	Reactivo
FP-21-0695	0,410	0,496	0,4530	Reactivo
FP-21-0697	0,389	0,389	0,3890	Reactivo
FP-21-0698	0,634	0,652	0,6430	Reactivo
FP-21-0699	0,413	0,411	0,4120	Reactivo
FP-21-0705	0,333	0,372	0,3525	Reactivo
FP-21-0707	0,455	0,484	0,4695	Reactivo
FP-21-0709	0,615	0,635	0,6250	Reactivo
FP-21-0713	0,396	0,431	0,4135	Reactivo
FP-21-0717	0,316	0,332	0,3240	Reactivo
FP-21-0718	0,621	0,597	0,6090	Reactivo
FP-21-0728	0,672	0,615	0,6435	Reactivo
FP-21-0809	0,642	0,763	0,7025	Reactivo
Positivo (CP)	0,536	0,714	0,6250	Reactivo
Negativo (CN)	0,035	0,032	0,0335	No reactivo
Blancos (B)	0,034	0,036	0,0350	No reactivo
	0,035	0,034	0,0345	No reactivo
Muestras ciegas (MC 1) (MC 2) (MC 3) (MC 4)	0,037	0,039	0,0380	No reactivo
	0,037	0,035	0,0360	No reactivo
	0,036	0,036	0,0360	No reactivo
	0,037	0,032	0,0345	No reactivo
Cut off	$\bar{x}(CN) \times 2 = 0,067$			

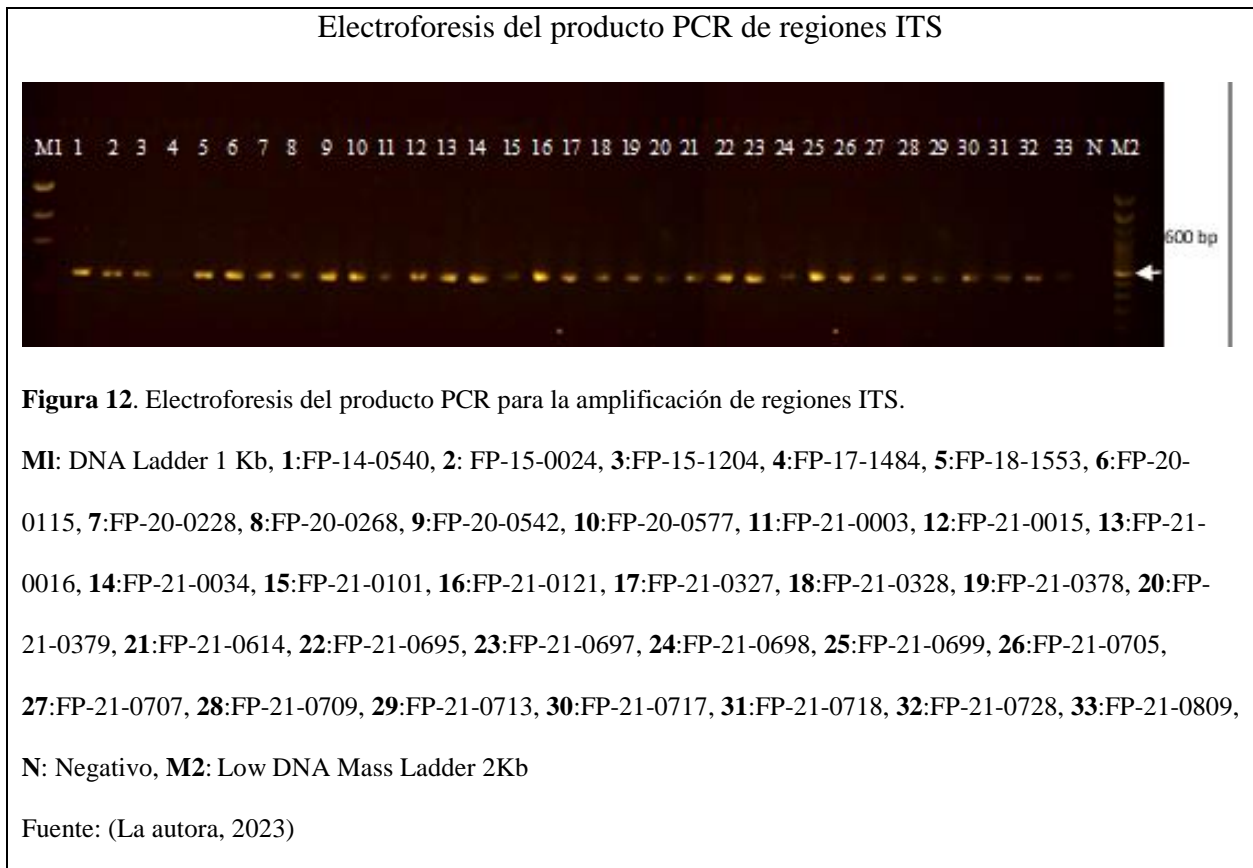
Fuente: (La autora, 2023)

Después del tiempo de incubación se visualizó un incremento en el color del control positivo y de las muestras, confirmando su reactividad, los controles negativos, muestras ciegas y blancos no presentaron color permitiendo evidenciar la especificidad y selectividad del anticuerpo (Dewey & Yohalem, 2007). Al aplicar el punto de corte (0,067) se puede evidenciar que las muestras superan el límite de los controles negativos, siendo reactivos para la detección de *B. cinerea* (LOEWE, 2016).

3.4. Análisis molecular

- **Amplificación y visualización de los fragmentos ITS y Bc**

Como se puede visualizar los producto de PCR amplificados de las 33 muestras de ADN, permitió obtener fragmentos de aprox. 600 pb (White T. , Bruns, Lee, & Taylor, 1990) para el gen ITS (Figura 12) y 480 pb (Rigotti, Viret, & Gindro, 2006) para el gen Bc (Figura 13), esto evidencia el tamaño de los productos de amplificación y corroborar la similitud entre las muestras. La amplificación de los cebadores $C_{729+/-}$ diseñados para detectar *B. cinerea* no permitió la amplificación de los fragmentos, posiblemente por el deterioro de los cebadores.



Electroforesis del producto PCR de regiones Bc

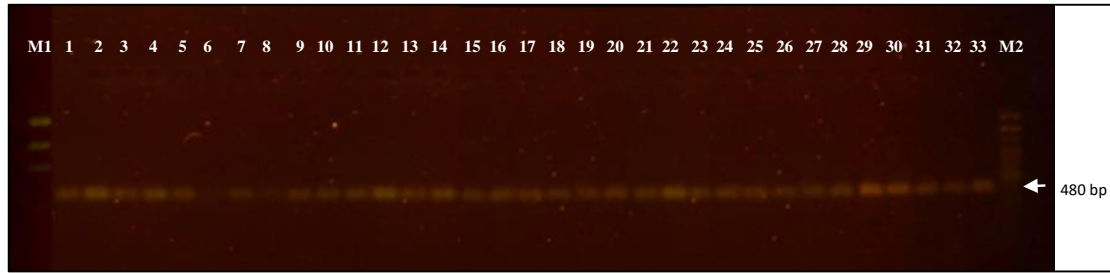


Figura 13. Electroforesis del producto PCR, para la amplificación de regiones Bc.

M1: DNA Ladder 1 Kb, **1:**FP-14-0540, **2:** FP-15-0024, **3:**FP-15-1204, **4:**FP-17-1484, **5:**FP-18-1553, **6:**FP-20-0115, **7:**FP-20-0228, **8:**FP-20-0268, **9:**FP-20-0542, **10:**FP-20-0577, **11:**FP-21-0003, **12:**FP-21-0015, **13:**FP-21-0016, **14:**FP-21-0034, **15:**FP-21-0101, **16:**FP-21-0121, **17:**FP-21-0327, **18:**FP-21-0328, **19:**FP-21-0378, **20:**FP-21-0379, **21:**FP-21-0614, **22:**FP-21-0695, **23:**FP-21-0697, **24:**FP-21-0698, **25:**FP-21-0699, **26:**FP-21-0705, **27:**FP-21-0707, **28:**FP-21-0709, **29:**FP-21-0713, **30:**FP-21-0717, **31:**FP-21-0718, **32:**FP-21-0728, **33:**FP-21-0809, *N:* Negativo, *M2:* Low DNA Mass Ladder 2Kb

Fuente: (La autora, 2023)

- **Alineamiento múltiple para la región ITS**

El alineamiento se realizó con las secuencias consenso de 24 muestras, la muestra FP-18-1553 y FP-20-0115 fueron eliminadas porque generaron inconvenientes por su calidad inaceptable; la Figura 14, contiene las 24 muestras de estudio, las secuencias de *B. cinerea* y *Botryotinia fuckeliana* que corresponden a la base de datos de BLAST las cuales presentaron estadísticamente coincidencia con la especie asignada (Query Cover 100%, Per. Ident. 95-100%, E value 0.0), (NCBI, 2022).

Segmento del alineamiento múltiple para regiones ITS

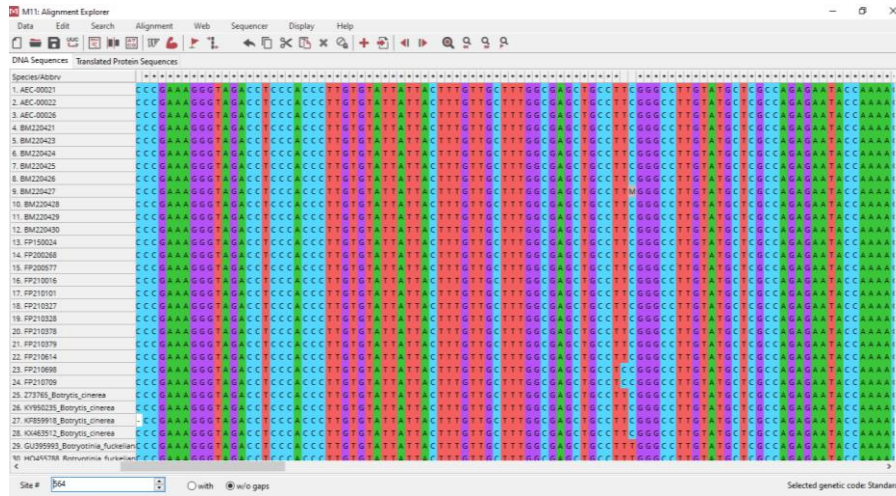


Figura 14. Segmento del alineamiento múltiple para regiones ITS.

Muestras: **BM-22-0421:FP-15-0024**, **BM-22-0423:FP-21-0003**, **BM-22-0424:FP-21-0695**, **BM-22-0425:FP-21-0697**, **BM-22-0426:FP-21-0707**, **BM-22-0427:FP-21-0717**, **BM-22-0428:FP-21-0718**, **BM-22-0429:FP-21-0728**, **BM-22-0430:FP-21-0015**, **FP-15-0024**, **FP-20-0268**, **FP-20-0577**, **FP-21-0016**, **FP-21-0101**, **FP-21-0327**, **FP-21-0328**, **FP-21-0378**, **FP-21-0379**, **FP-21-0614**, **FP-21-0698**, **FP-21-0709**, **AEC-00021:FP-14-0540**, **AEC-00022:FP-15-0024**, **AEC-00026:FP-15-1204**; muestras ID GenBank: **AJ422103**, **AJ539088**, **Z73765**, **KY950235**, **KF859918** y **KX463512** y muestras ID GenBank: **GU395993**, **HQ455788**, **FJ169666**, **EU563123** y **EU563120**. Con el algoritmo Muscle y bajo la configuración predeterminada del programa MEGA 11.

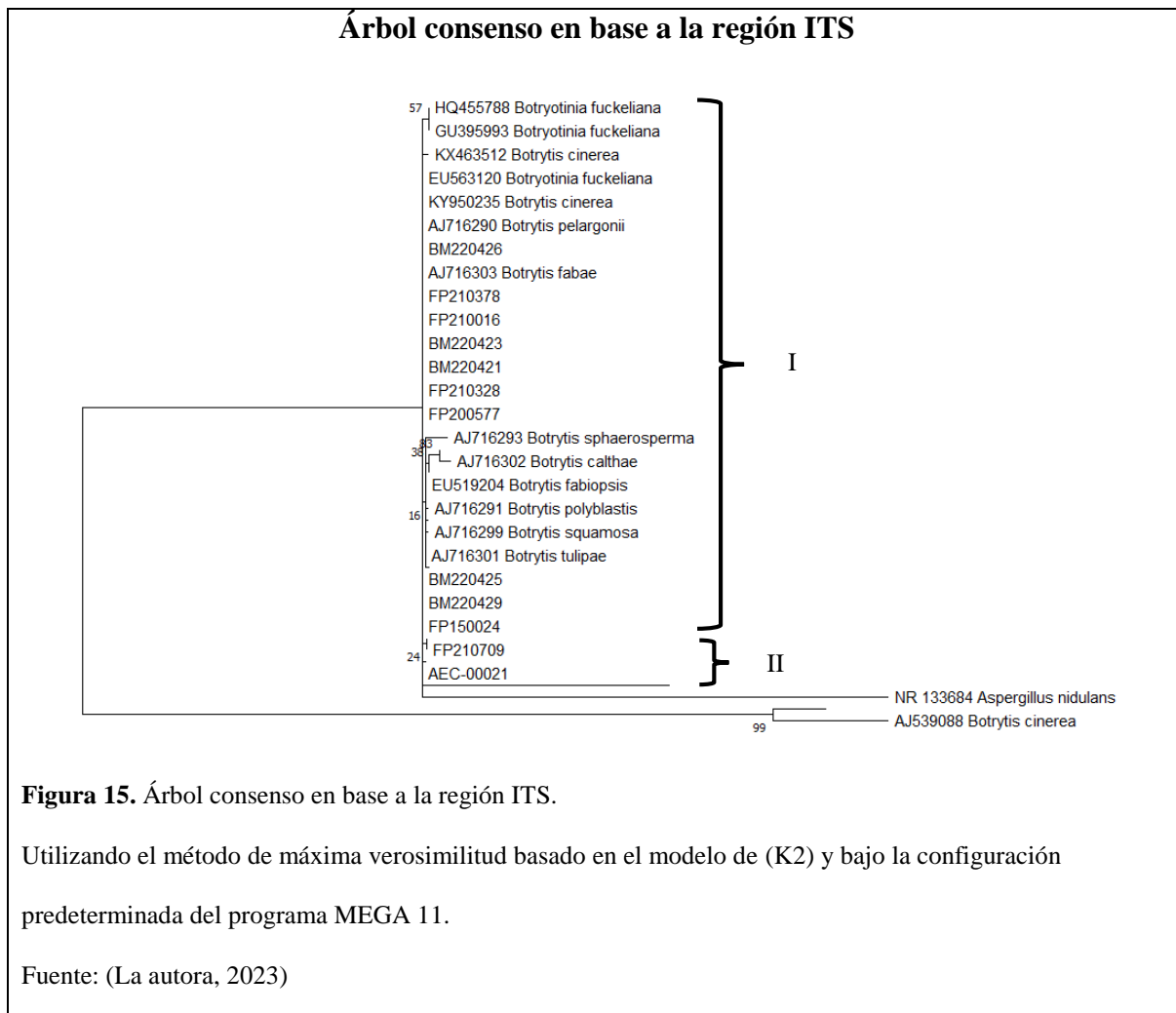
Fuente: (La autora, 2023)

La matriz presenta columnas marcadas con asterisco indicando los residuos con posiciones estructurales comunes y/o residuos ancestrales (Tamura, Stecher, & Kumar, 2021), además los nucleótidos diferenciados por colores (T: rojo; G: morado; C: celeste y A: verde); los resultados comprenden 564 caracteres (555 conservados, 6 variables y 2 con parsimonia informativa), el alineamiento presenta la comparación de las secuencias editadas con las secuencias de la base

de datos del programa BLAST con el fin de evidenciar que existe correspondencia entre sitios homólogos (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018).

- **Construcción del árbol filogenético para la región ITS**

La topología del árbol condensado obtenido en base a regiones ITS que se observa en la Figura 15, indicó la formación de dos grupos, el primero incluye 21 muestras de estudio con especies de: *B. cinerea* (ID GenBank: Z73765, KY950235, KF859918 y KX463512), *Botryotinia fuckeliana* (ID GenBank: GU395993, HQ455788, FJ169666, EU563123 y EU563120), *B. fabae*, (ID GenBank: MH855020 y AJ716303) *B. pelargonii*, (ID GenBank: AJ716290) y *B. sphaerosperma* (ID GenBank: AJ716293); algunos de ellos agrupados con un buen soporte y separados por pequeñas ramas internas, además sobresalen ramas que fueron condensadas resultando en politomías; y el segundo grupo incluye dos muestras de estudio. Para esto, el uso de la secuenciación tiene como principio el método extrínseco el cual se trata de comparar un gen de función desconocida con la base de datos de secuencias con función conocida en las bases de datos existentes, una limitación importante de este enfoque es el hecho de que, al presente, alrededor de un tercio de las secuencias de organismos recién secuenciados no coinciden lo suficiente con secuencias conocidas, los errores en las secuencias depositadas en bases de datos pueden suponer un grave problema. (Tsui, y otros, 2011). Por lo que la robustez de la reconstrucción filogenética se validó mediante el test estadístico de análisis de bootstrap (bs), considerando que un nodo con un valor $bs \geq 70\%$ posee un buen soporte estadístico (Hall, 2018); es así que el árbol consenso obtenido provee información para pensar que las cepas de *Botrytis cinerea* tienen un ancestro en común.



- **Alineamiento múltiple para la región Bc**

La Figura 16, contiene las 10 muestras de estudio y las secuencias de *B. cinerea* (ID GenBank: *KR080282*, *KR080281*, *KR080280*, *KU936085*, *KU936084* y *LN866604*) que corresponden a la base de datos del NCBI, 2022, las cuales presentaron estadísticamente coincidencia con la especie asignada (Query Cover 100%, Per. Ident. 100%, E value 0.0).

Segmento del alineamiento múltiple para las regiones Bc

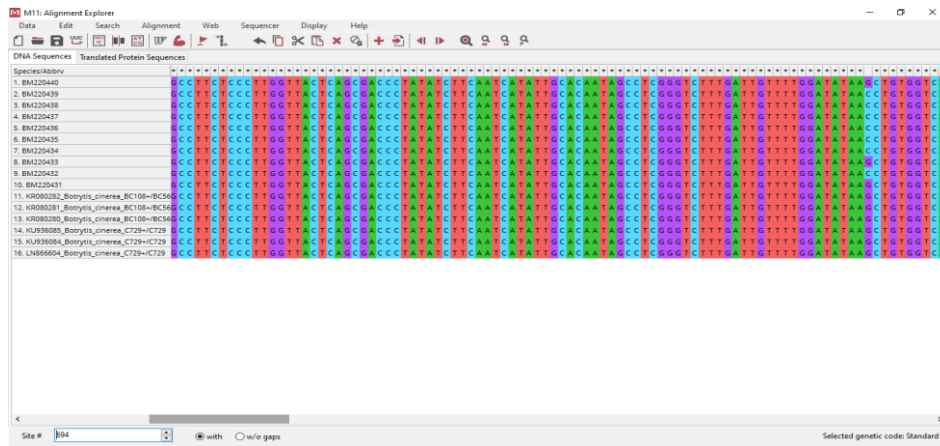


Figura 16. Segmento del alineamiento múltiple para las regiones Bc.

Muestras: (***BM-22-0431:FP-15-0003***, ***BM-22-0432:FP-21-0015***, ***BM-22-0433:FP-21-0101***, ***BM-22-0434:FP-21-0328***, ***BM-22-0435:FP-21-0695***, ***BM-22-0436:FP-21-0697***, ***BM-22-0437:FP-21-0707***, ***BM-22-0438:FP-21-0717***, ***BM-22-0439:FP-21-0718***, ***BM-22-0440:FP-15-0728***). Con el algoritmo Muscle y bajo la configuración predeterminada del programa MEGA 11.

Fuente: (La autora, 2023)

Los resultados comprenden 714 caracteres (669 conservados, 22 variables y 4 con parsimonia informativa), el alineamiento presenta la comparación de las secuencias editadas con las secuencias de la base de datos del programa BLAST con el fin de evidenciar que existe correspondencia entre sitios homólogos (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018)

- **Construcción del árbol filogenético para la región Bc**

La topología del árbol condensado obtenido en base a regiones Bc que se observa en la Figura 17, indicó la formación de un solo grupo, el cual incluye 10 muestras de estudio con especies de: *B. cinerea* (ID GenBank: *KR080282*, *KR080281*, *KR080280*, *KU936085*, *KU936084* y *LN866604*).

La robustez de la reconstrucción filogenética se validó mediante el test estadístico de análisis de bootstrap (bs), considerando que un nodo con un valor $bs \geq 70\%$ posee un buen soporte

estadístico (Hall, 2018); además se puede evidenciar que las región C₇₂₉ +/- contiene la región BC₁₀₈ +/- BC₅₆₃- (Rigotti, Viret, & Gindro, 2006) por lo que se forman un solo clado con las muestras analizadas, esto provee información para pensar que se agrupan de acuerdo a la similitud de secuencias que contienen las muestras.

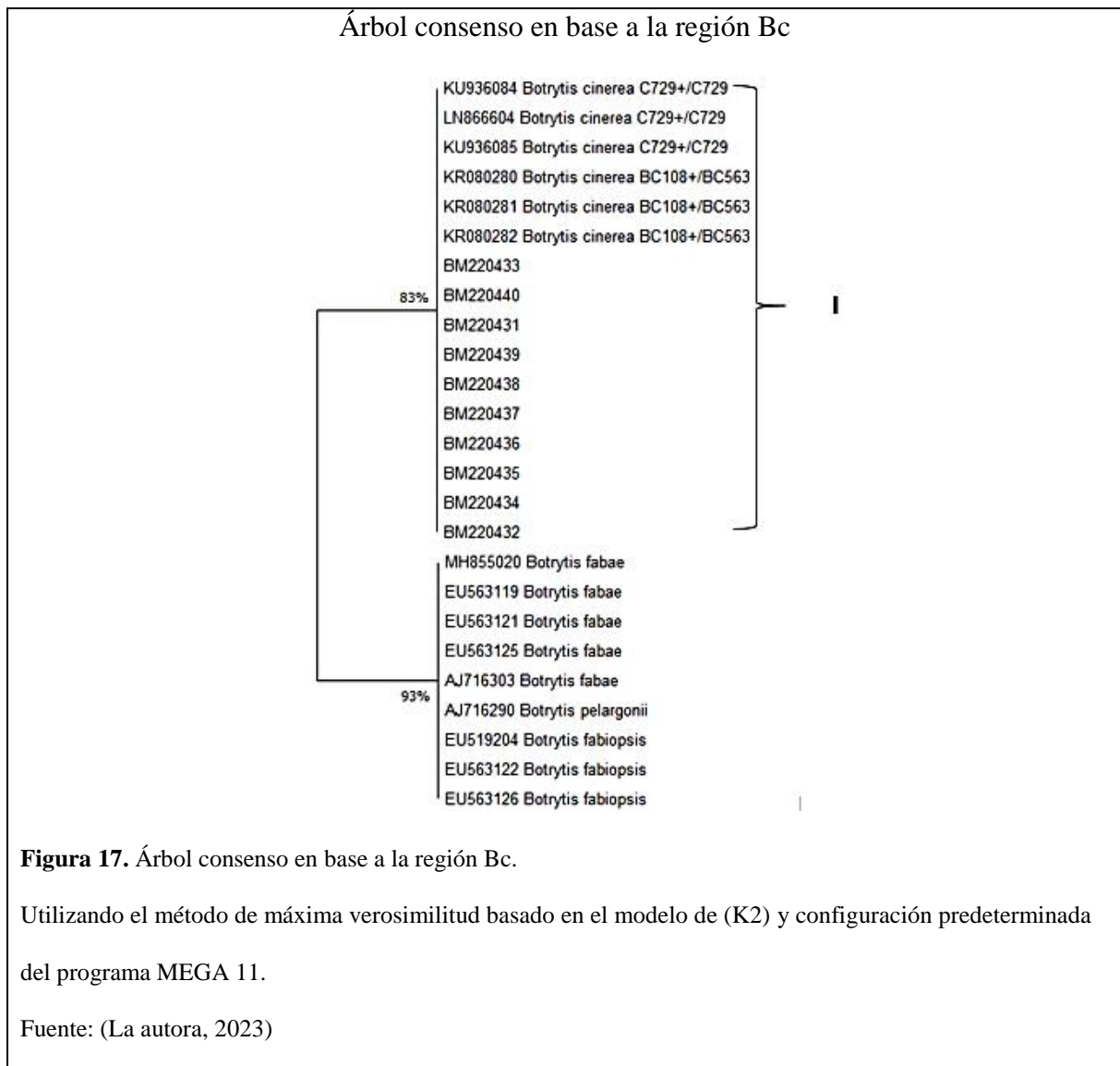


Figura 17. Árbol consenso en base a la región Bc.

Utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de (K2) y configuración predeterminada del programa MEGA 11.

Fuente: (La autora, 2023)

3.5. Análisis de la Validación y del aseguramiento de la calidad del ensayo

- **Selectividad/especificidad**

Para este análisis se combinaron los resultados obtenidos en el Anexo 17, con los resultados de repetibilidad del Anexo 18 del cual se extrae que todos los valores pertenecen a verdaderos positivos (n=18), obteniéndose una sensibilidad y especificidad del 100% (NATA, 2018).

- **Precisión (Repetibilidad / Reproducibilidad)**

Dado que los ensayos fueron preparados independientemente sin variaciones de concentraciones, reactivos, equipos de prueba o que tuvieran influencias externas, se les considera muestras aleatorias, de lo cual se obtuvo; 9 muestras verdadero positivas y ninguna muestra asociada a falso positivo, verdadero negativo y falso negativo. Realizado el cálculo se tiene de precisión el 100%, lo que significa que la medida de los valores es exactamente iguales a los valores dados (NATA, 2018).

- **Veracidad**

La veracidad del método se estableció con la cepa conservada y secuenciada del laboratorio como material de referencia, la cual al ser analizada mediante el sistema de identificación microbiana BIOLOG, permitió determinar que el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor esperado fue del 100%, tal como se muestra en el Anexo 19. Una vez revisado los resultados de la validación y comparados con los objetivos establecidos, se procedió a realizar el respectivo informe y la declaración de que el método de ensayo es validado por los responsables de la institución.

Conclusiones

- Esta investigación proporcionó información para la identificación de *Botrytis cinerea* mediante el sistema de identificación microbiana BIOLOG, las cuales permitirán realizar la validación del procedimiento específico de ensayo.
- Los resultados obtenidos del muestreo realizado en las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura, fue de 33 aislados pertenecientes a la especie *B. cinerea*; con ciertas diferencias morfológicas, las cuales están relacionadas a la capacidad de los hongos complejos para formar diferentes morfotipos, existen referencias que el micelio joven preferentemente guarda relación con la vigorosidad y principios activos para la producción de enzimas que producen la infección.
- El análisis de la morfometría mediante ANOVA de las magnitudes (largo y ancho) de los aislados presentó cepas morfológicamente heterogéneas, pero que morfométricamente se encuentran relacionadas con medidas determinadas bibliográficamente.
- Mediante la evaluación del perfil metabólico de los aislados purificados y monospóricos, se identificó que con valor de 1,00 para la probabilidad de confianza todos los aislados fueron identificados como *Botrytis cinerea*.
- El uso de kit comerciales para la obtención de ADN a partir de micelio de estructuras miceliales permitió la obtención de ADN de alta calidad y concentración, facilitando la amplificación tanto de regiones conservadas como del gen específico en todas las cepas de estudio.
- El análisis del gen ITS4 es útil para resolver relaciones entre especies pero no garantiza una filogenia de especies completamente segura, particularmente si las especies son muy

cercanas. Pero al usar primers específicos tales como BC₁₀₈ y BC₅₆₃ se asegura una identificación adecuada.

Recomendaciones

- Realizar la evaluación de los aislados obtenidos mediante postulados de Koch en diferentes fases fenológicas de los huéspedes.
- Evaluar la capacidad del patógeno para formar estructuras morfológicas que permitan obtener el ciclo de vida completo del fitopatógeno.
- Evaluar la capacidad enzimática de los patógenos en las pruebas que permiten medir la actividad del proceso enzimático de las fuentes de carbono.
- Adquirir cebadores específicos para la identificación de diferentes géneros de *Botrytis* spp.

Bibliografía

- Agrios, G. (2005). Plant Diseases Caused by Fungi. En G. Agrios, *Plant Pathology* (págs. 398 - 410). USA: Elsevier. Academic Press.
- AGROCALIDAD. (31 de Enero de 2018). *Laboratorio de Fitopatología*. Obtenido de Instructivo INT/FP/01: <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/dxi3.pdf>
- AGROCALIDAD. (2019). PGC/LA/08. *Trabajo de ensayos no conforme*. Tumbaco, Pichincha, Ecuador: AGROCALIDAD.
- AGROCALIDAD. (2019). PGT/LA/03. *Validación métodos analíticos*. Tumbaco, Pichincha, Ecuador: AGROCALIDAD.
- Amaya Oñate, E. (Marzo de 2021). *Universidad Técnica de Cotopaxi*. Obtenido de Control de botrytis (*Botrytis cinerea*), con fungicidas en pos cosecha de rosas, en la empresa Royal Flowers - Mulaló: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/7620>
- Behr, M., Legay, S., & Evers, D. (2013). Molecular Identification of botrytis *cinerea*, *Penicillium* spp. and *Cladosporium* spp. in Luxembourg. *Journal International. Sci. Vigne et Vin 47 No 3*, 239-247.
- BIOLOG. (2008). Microbial Identification Database for Biolog Systems. USA: BIOLOG Inc.
- BIOLOG. (2008). Omnilog Data Collection Software Identification System. *User Guide*. USA: BIOLOG Inc.
- BIOLOG. (2010). FF MicroPlate Instructions for Use. USA: BIOLOG.
- Bochner, B. (1989). Sleuthing out bacterial identities. *Nature vol 339*, 157-158.
- CABI. (2022). *Botrytis cinerea*. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK. Obtenido de Centre for Agricultural Bioscience International: www.cabi.org/isc.<https://www.cabi.org/isc/datasheet/59666061>

- Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (2011). Guía Práctica 4 *Fusarium oxysporum*. En G. Castellanos, C. Jara, & G. Mosquera, *Guías Prácticas de laboratorio para el Manejo de Patógenos del Frijol*. Colombia: CIAT.
- Chilvers, M., & du Toit, L. (2006). detection and identification of *Botrytis* Species Associated with Neck Rot, Scape Blight, and Umbel Blight of Onion. *Plant Health Progress*.
- Crous, P., Schumacher, R., Wingfield, M., Lombard, L., Giraldo, A., Christensen, M., . . . Groenewald, J. (2009). Fungal Systematics and Evolution: FUSE 1. *Funga Biodiversity*.
- Delcán, J., Moyano, C., Raposo, R., & Melgarejo, P. (2002). Storage of *Botrytis cinerea* Using Different Methods. *Journal of Plant Pathology* 84 (1), 3-9.
- Dewey, F., & Cole, L. (1997). Monoclonal antibody-Based assays for Detection and Quantification of *Botrytis cinerea*. En H. Dehne, G. Adam, M. Diekmann, J. Frahm, A. Mauler, & P. van Halteren, *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens. Developments in Plant Pathology vol 11* (págs. 91-94). Dordrecht: Springer.
- Dewey, F., & Grant, R. (2016). *Botrytis-Biology. detection and Quantification*. En S. Fillinger, & Y. Elad, *Botrytis - the Fungus the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (págs. 27-42). Switzerland: Springer.
- Dewey, F., & Yohalem, D. (2007). Detection, Quantification and Immunolocalisation of *Botrytis* species. En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen, *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (págs. 181-194). The Netherlands: Springer.
- Domsch, K., Gams, W., & Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi. Volumes 1 and 2*. London, UK: Academic Press Ltd.

- Domsch, K., Gams, W., & Anderson, T. (2007). Classification of and Keys to the Genera Treated. En K. Domsch, W. Gams, & T. Anderson, *Compendium of soil fungi* (págs. 9-18). London: IHV-Verlag, Eching.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. (2007). Botrytis spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems - An Introduction. En Y. Elad, B. Williamsom, P. Tudzynski, & N. Delen, *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (págs. 34-58). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- EURACHEM, & CITAC. (2021). Obtenido de <https://www.citac.cc>:
https://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf
- Fillinger, S., Amselem, J., Artiguenave, F., Billault, A., Choquer, M., Couloux, A., . . . Lebrun, M. (2006). The genome projects of the plant pathogenic fungi Botrytis cinerea and Sclerotinia sclerotiorum. En P. Jeandet, & C. Clément, *Macromolecules of Grape and Wines*. London: Lavoisier.
- Fontecha, G., Trabanino, R., Pérez-Borrero, B., Catalán, P., Aguilar, E., Gallego, F., . . . Benito, C. (2011). Caracterización Molecular de Aislados Centroamericanos de Beauveria bassiana para el Control de la Broca del Café. *Ciencia y Tecnología*, 8, 38-61. doi:10.5377/rct.v0i8.699
- Hall, B. (2018). *Phylogenetic Trees Made easy*. Oxford University Press.
- Hansen, H., & Smith, R. (1932). The mechanism of variation in imperfect fungi: Botrytis cinerea. *Phytopatology* 22 (12), 953-964.
- Invitrogen. (2011). Obtenido de <https://www.fishersci.es/>: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_gel_extraction_pcr_combo_man.pdf?_ga=2.169010209.1889051510.1645531761-588128943.1645531761

- Invitrogen. (2011). <https://www.thermofisher.com/>. Obtenido de https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Low_DNA_Mass_Ladder_man.pdf?_ga=2.130163599.1889051510.1645531761-588128943.1645531761
- Jarvis, W. R. (1977). *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology, and pathogenicity*. Harrow, Ontario: Hignell Printing Limited.
- JCGM, J. C. (2012). <https://www.cem.es/>. Obtenido de <https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>
- Kars, I., & van Kan, J. (2007). Extracellular enzymes and Metabolites Involved in Pathogenesis of Botrytis. En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen, *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (págs. 99-118). The Netherlands: Springer.
- Kritzman, G., & Netzer, D. (1978). A selective medium for isolation and identification of Botrytis spp. from soil and onion seed. *Phytoparasitica* 6 (1), 3-7.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Plataforms. En *Molecular biology and Evolution* 36(6) (págs. 1547-1549). Oxford Academic.
- Lacy, M., & Lorbeer, J. (2012). Disease of arial Parts Caused by Fungi and Oomycetes. *american Pathology*, 24-27.
- Leroux, P. (2007). Chemical Control of Botrytis and its Ressitence to Chemical Fungicides. En Y. Elad, B. Williamsom, P. Tudzynski, & N. Delen, *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (págs. 195-222). The Netherlands: Springer.
- LOEWE. (2016). *Complete Kit for 96 Test for Cocktail ELISA_LOEWEBLUE*. Germany: LOEWE Biochemica GmbH.

Minitab. (2022). *Minitab.com*. Obtenido de <https://www.minitab.com/es-mx/products/minitab/>

Mycobank. (2022). *MYCOBANK Database*. Obtenido de Fungal Database, Nomenclatura & Species Bank.:

<https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/name/Botrytis%20cinerea>

NATA. (2018). *National Association of Testing Authorities* . Obtenido de

<https://nata.com.au/>: <https://nata.com.au/files/2021/05/Validation-and-Verification-of-Quantitative-and-Qualitative-Test-Methods.pdf>

NCBI. (2022). *National Library of Medicine*. Obtenido de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

NCBI. (2022). *National Library of Medicine*. Obtenido de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Paul, W. (1929). A comparative morphological and physiological study of a number of strains of *Botrytis cinerea* Pers. *Transactions of the British Mycological Society Vol 14 Issues 1-2*, 118-135.

QIAGEN. (2016). *www.qiagen.com*. Obtenido de support.qiagen.com:

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-plant-pro-and-plant-kits/>

QIAGEN. (2020). *DNeasy Plant Handbook*. Obtenido de

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-plant-pro-and-plant-kits/>

Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., & Viret, O. (2002). Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 169–174.

Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/11363154_Characterization_of_molecular_markers_for_specific_and_sensitive_detection_of_Botrytis_cinerea_Pers_Fr_in_strawberry_FragariaXananassa_Duch_using_PCR

Rigotti, S., Viret, O., & Gindro, K. (2006). Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *Phytopathologia Mediterranea Vol. 45 No 3*, 253-260.

Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Chapter 5 Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field agarose Gel Electrophoresis. En J. Sambrook, & D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory*. New York: Cold Spring Harbor.

Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Preparation and analysis of Eukaryotic Genomic DNA. En J. Sambrook, & D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.



Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2012). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 3022-3027.

- Thermo Scientific. (2009). *www.thermofisher.com*. Obtenido de NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- Tsui, C., Woodhall, J., Chen, W., Lévesque, A., Lau, A., Schoen, C., . . . Hoog, S. (2011). Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA FUNGUS*, 177-189.
- Urbasch, I. (1985). Ultrastructural Studies on the Microconidia of *Botrytis cinerea* Pers. and their Phialoconidial Development. *Phytopathology Z.* 112, 229 - 237.
- USDA-ARS. (2020). Obtenido de Fungal database – Quick Search: https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Botrytis%20cinerea&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes
- Weeds, P. (1997). Genetic Studies of Pathogenicity in *Botrytis cinerea* (botryotinia fuckeliana). *Tesis presentada para el grado de Doctor en Filosofía en Ciencias Vegetales*.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Meyer, W. (1995). *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. Boca Raton: CRC pRESS.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. En M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, & T. White, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (págs. 315 - 322). California: Academic Press, Inc.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. En M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, & T. White, *PCR Protocols: A Guide to Methods ans Applications* (págs. 315-322). California: Academic Press, Inc.

ANEXOS

Anexo 1. Convenio Específico con la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario – AGROCALIDAD

QG-VICS-385-2022- J43-OF
Quito, D.M. a 3 de octubre de 2022

Asunto: CONVENIO ESPECÍFICO

Ingeniero
Patricio Almeida
DIRECTOR EJECUTIVO
AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO
Ciudad. -

De mi consideración:

Me es grato dirigirme a usted con un cordial saludo de quienes hacemos la Universidad Politécnica Salesiana.

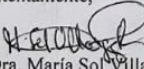
A través de la presente se remiten cuatro ejemplares del convenio específico de la Srta. Estudiante Grace Pallares, entre la AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO y la Universidad Politécnica Salesiana.

Solicitamos que una vez suscritos los convenios nos remitan un ejemplar con los siguientes documentos:

- Copia simple del nombramiento del Ing. Patricio Almeida
- Copia simple de la cédula de identidad
- Ruc

Favor enviar a la siguiente dirección: Av. 12 de octubre N24-22 y Wilson, a nombre de Mgtr. Nancy Bastidas, Dirección de Vinculación con la Sociedad, sede Quito.

Sin más por el momento, quedo de usted muy agradecida.

Atentamente,

Dra. María Sol Villagómez PhD
VICERRECTORA DE SEDE


Anexo: Cuatro ejemplares del convenio ESPECÍFICO entre la UPS y la AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

NUT: 385-QG-VICS-UPS-2022

MV/JCH

VICERRECTORADO - SEDE QUITO

AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO
AGROCALIDAD / Teléfono(s) 23828860
Documento No.: AGR-AGROCALIDAD/DGDA-2022-5904
Fecha: 2022-10-05 11:19:02 GMT-05
Recibido por: Luis Ricardo Toala Ochoa
Para verificar el estado de su documento ingrese a:
<https://www.gestiondocumental.gob.ec>
con el usuario:JV115599DRH



Campus El Girón, Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson, Bloque A, Teléfonos: 3962 800 / 3962 900 Ext: 2208
Teléfono directo: 3962 868 / Correo electrónico: svicerrectorio@ups.edu.ec

Nro. 002

**CARTA COMPROMISO PARA LA REALIZACIÓN DE TRABAJOS DE
TITULACIÓN ENTRE LA "UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA" Y LA AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y
ZOOSANITARIO.**

Concurren a la celebración del presente Carta Compromiso, por una parte, AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO - AGROCALIDAD., representada legalmente por Ing. Patricio Almeida Granja, a quien en adelante se le denominará "LA AGENCIA" y, por otra parte, la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, representada por María Sol Villagómez, PhD. en su calidad de Vicerrectora de la Sede Quito y la Dra. Ana Reino Molina, en calidad de Procuradora, quienes en adelante se le denominará como LA UNIVERSIDAD. Las partes libre y voluntariamente convienen en celebrar el presente Carta Compromiso interinstitucional con sujeción a las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES. -

1. El artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior determina que: Todas las instituciones de educación superior estarán obligadas a entregar los trabajos de titulación que se elaboren para la obtención de títulos académicos de grado y posgrado en formato digital para ser integradas al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. El artículo 6 de la Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria, publicada en el Registro Oficial Suplemento 27 de 3 de julio de 2017, establece: "*La Autoridad Agraria Nacional ejerce las competencias en materia de sanidad agropecuaria y es la responsable de prevenir, preservar, mejorar y fortalecer el estatus fito y zoosanitario de los vegetales, animales y productos agropecuarios en el territorio nacional. Tendrá a su cargo la formulación, implementación y ejecución de las políticas nacionales de sanidad agropecuaria y ejercerá las competencias establecidas en esta Ley.*"
3. El artículo 12 de la Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria, publicada en el Registro Oficial Suplemento 27 de 3 de julio de 2017, establece: "*Créase la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario entidad técnica de derecho público, con personería jurídica, autonomía administrativa y financiera, desconcentrada, con sede en la ciudad de*

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec



Quito y competencia nacional, adscrita a la Autoridad Agraria Nacional. A esta Agencia le corresponde la regulación y control de la sanidad y bienestar animal, sanidad vegetal y la inocuidad de los alimentos en la producción primaria, con la finalidad de mantener y mejorar el estatus fito y zoosanitario de la producción agropecuaria (...);

4. El numeral 2.4. del Estatuto Orgánico de Gestión Organizacional por Procesos de Agrocalidad establece como misión de la Gestión General de Laboratorios: *"Gestionar estratégicamente el proceso de análisis y diagnóstico de muestras, para la detección oportuna de enfermedades veterinarias, plagas, contaminantes en productos agropecuarios; y, verificar la calidad de sus insumos."*
5. La Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador creada mediante Ley N° 63, publicada en el Registro Oficial N° 499 de 5 de agosto del 1994, es una Institución de Educación Superior particular, católica. Es una persona jurídica de derecho privado, con finalidad social, sin fines de lucro.

Su Sede Matriz y domicilio principal se halla en la ciudad de Cuenca, con sedes en las ciudades de Quito y Guayaquil, y con una extensión en el cantón Cayambe dependiente académico y administrativamente, de la Sede Quito.

Entre otros, su fin es formar personas con madurez humana que sepan hacer coherentemente la síntesis de ética, vida y cultura, para que actúen en la historia en la línea de la justicia, solidaridad y fraternidad, testimoniando los valores éticos más altos del ser humano.

6. Con la resolución No. 161-SE-33-CACES-2020 el CACES acreditó a la UPS por el período de cinco años y de esta forma se ratifica el compromiso con la comunidad universitaria a nivel nacional y dentro de las redes académicas a nivel internacional.
7. Mediante Directorio de la Agencia de Regulación de Control Fito y Zoosanitario, en sesión extraordinaria llevada a efecto el 16 de mayo de 2022; se resolvió designar al señor Mgs. Wilson Patricio Almeida Granja como Director Ejecutivo de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario.
8. El artículo 1 de la Resolución Nro. S-Ext-010-16-05-22 de 16 de mayo de 2022, se resolvió: "Designar al señor Mgs. Wilson Patricio Almeida Granja, como Director Ejecutivo de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario."

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec

SEGUNDA. OBJETO. -

La presente carta compromiso, que tiene por objeto establecer mecanismos necesarios, oportunos y ágiles para que la estudiante Grace Vanessa Pallares Castro con C.C 1718582164 previo a la obtención de su título de Ingeniera en Biotecnología, desarrolle su trabajo de titulación científica: Validación del Método Analítico para Diagnosticar *Botrytis Cinerea* mediante el Sistema de Identificación Microbiana Biolog, y el Aseguramiento de la Calidad del Ensayo Mediante Análisis Genético cuya tutora es MSc. Andrea Denisse Benítez Quintana., previo a la obtención de su título de grado, con el fin de fortalecer el aprendizaje de la estudiante, aportar resultados, conclusiones y recomendaciones que constituyan un aporte.

TERCERA: RESPONSABILIDADES. -

3.1. Responsabilidades de la Agencia

- 3.1.1. Brindar las facilidades necesarias durante la ejecución de la investigación conforme a un cronograma de actividades.
- 3.1.2. Designar un Tutor de la Investigación con quien el Tutor o docente guía, designado por la Universidad, coordinará el monitoreo y avances de la misma.
- 3.1.3. Proporcionar a las estudiantes la guía, asesoramiento e información que necesite para llevar a cabo las actividades de la investigación.
- 3.1.4. Poner a disposición de las estudiantes bajo la dirección del tutor guía con respecto a equipos y materiales que se necesiten para llevar a cabo las actividades de la investigación.
- 3.1.5. Proveer (de ser el caso) de equipo y prendas de seguridad a las estudiantes.
- 3.1.6. Asignar (de ser el caso) un técnico o responsable de departamento que guíe y oriente las actividades de las estudiantes.

3.2. Responsabilidad de la Universidad Politécnica Salesiana. -

- 3.2.1. Autorizar y asignar a la estudiante Grace Vanessa Pallares Castro realice su investigación en la Agencia, a quienes brindarán las facilidades para la realización de la misma.

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec

- 3.2.2. Reconocer como Cotutor del trabajo de investigación al técnico responsable en la AGENCIA quien monitoreará y evaluará los avances de la investigación de las estudiantes, en conjunto o coordinación con la contraparte docente de la Universidad Politécnica Salesiana.
- 3.2.3. La U.P.S. se compromete, conforme a su propio reglamento de proyectos de titulación, a hacer un seguimiento de cada uno de los estudiantes.
- 3.2.4. Para la realización de cada proyecto se establecerá una propuesta del proyecto bajo el formato SENPLADES avalado y aprobado por el tutor asignado y por el Consejo de Carrera por cada alumno, en el cual se regularán las relaciones entre la Agencia y el alumno, de conformidad a los requerimientos institucionales.
- 3.2.5. Al finalizar el plazo del presente documento, el administrador del Carta Compromiso deberá entregar un informe de las actividades realizadas con la institución contra parte.
- 3.2.6. Todos los proyectos de grado enmarcados bajo este Carta Compromiso deberán determinar los derechos de autor establecidos en la Ley de Propiedad Intelectual, según se registra en el anexo A, adjunto a este Carta Compromiso.

CUARTA. PLAZO. -

La presente Carta de Compromiso tendrá vigencia por el lapso de doce meses, desde la firma de esta carta de compromiso por los representantes de las entidades.

QUINTA. COORDINACIÓN DE LA CARTA COMPROMISO. -

LA AGENCIA designará un Coordinador del convenio, funcionario que tendrá la obligación de velar por el cabal y oportuno cumplimiento de todas y cada una de las obligaciones derivadas del mismo. El coordinador de la Carta Compromiso deberá realizar el seguimiento, control y supervisión del mismo, para tales efectos la Agencia cruzará el debido oficio comunicando el responsable encargado de la coordinación.

La Universidad Politécnica Salesiana a través de la carrera de BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES designará al responsable de la Carta Compromiso, persona con quien LA AGENCIA mantendrá contacto para ejecutar adecuadamente la Carta Compromiso, para tales efectos el coordinador designado será la MSc. Andrea Denisse Benítez Quintana.

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec

SEXTA. FINANCIAMIENTO. -

La presente Carta Compromiso de carácter general no implica, por sí solo, compromisos presupuestarios para ninguna de las partes.

SÉPTIMA. TERMINACIÓN. -

La Carta de Compromiso termina por:

- 7.1. En incumplimiento del objeto y plazo establecida para la realización del trabajo de titulación.
- 7.2. Por mutuo acuerdo de las partes.
- 7.3. Decisión unilateral de LA AGENCIA previo informe de la causa motivadora, en los casos que el estudiante incurra en faltas repetidas de asistencia y/o impuntualidad no justificadas o falta de cumplimiento de las actividades planificadas.
- 7.4. Decisión unilateral de la Universidad Politécnica Salesiana, para el caso de incumplimiento por parte de la institución, respecto de las cláusulas de la presente Carta de Compromiso o del plan de actividades del estudiante planificadas para realizar la investigación.

OCTAVA. PROPIEDAD INTELECTUAL Y CONFIDENCIALIDAD. -

Los derechos de propiedad intelectual (DPI) de los resultados de la investigación, informes u otros documentos relativos a la misma serán atribuidos a LA AGENCIA y la Universidad. LA AGENCIA y/o la Universidad podrán publicar, difundir, reproducir y distribuir dichos resultados e informes solo después de la aprobación de cada una de las partes y con el apropiado reconocimiento a las contribuciones de LA AGENCIA y la Universidad.

La Información Confidencial, así como los materiales de investigaciones utilizados, no podrán bajo ninguna circunstancia ser relevada a terceros, excepto que existiere autorización expresa y por escrito de la parte propietaria de la Información Confidencial, ni podrán realizar las Partes, actos de disposición sobre la misma, sea con fines comerciales o científicos, con la excepción de las autorizaciones expresamente previstas en el presente artículo.

Las Partes se obligan a sí mismos a comprometer al personal que tuviera acceso a la Información Confidencial, a no revelarla a terceros y mantenerla estrictamente confidencial, asumiendo en forma personal quien así obrare, la responsabilidad civil y/o penal que le fuera aplicable. A fin de dar cumplimiento a lo anterior, los profesionales y/o el personal técnico y/o asistentes que deban intervenir total o parcialmente de las tareas relacionadas con la investigación objeto del presente, deberán suscribir Acuerdos de Confidencialidad.

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoon sanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec



GUILLERMO LASSO
PRESIDENTE



NOVENA. DOMICILIO. –

Para todos los efectos previstos en esta carta compromiso, las comunicaciones serán dirigidas por escrito, bastando en cada caso, que el remitente tenga la correspondiente constancia de que su comunicación ha sido recibida en las direcciones de la otra parte. Para estos efectos, las partes fijan las siguientes direcciones:

LA AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO:

Provincia: Pichincha
Ciudad: Quito;
Dirección: Av. Eloy Alfaro y Amazonas, Edif. MAG, Piso 7 y/o Av. Interoceánica Km 141/2 y Eloy Alfaro. Sector la Granja – Tumbaco
Teléfono: (02) 3828860
Correo Electrónico: direccion@agrocalidad.gob.ec

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA:

Domicilio de la UPS Quito
Lic. Andrea Denisse Benítez Quintana, M.Sc
Docente de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales
Teléfono: 0983387221
Correo electrónico: abenitez@ups.edu.ec

Cualquier cambio de dirección deberá ser notificado por escrito a las otras Partes para que surta sus efectos legales; de lo contrario tendrán validez los avisos efectuados a las direcciones antes indicadas.

DÉCIMA. CONTROVERSIAS. -

En caso de controversias entre las partes contratantes, derivadas de la aplicación o interpretación del presente Convenio, se intentará lograr un acuerdo directo entre las mismas y será resuelto por sus representantes legales o a quienes ellos deleguen para el efecto, acuerdo que deberá constar por escrito.

De no ser posible llegar a un acuerdo directo entre las partes suscriptoras del Convenio se someterán a acudir al Centro de Mediación de la Procuraduría General del Estado, con la particularidad que su proceso estará sujeto a la Ley de Arbitraje y Mediación y al Reglamento de Funcionamiento del Centro de Mediación de la Procuraduría General del Estado.

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec



DÉCIMA PRIMERA. DOCUMENTOS HABILITANTES. -

Se adjuntan los documentos habilitantes que acreditan la calidad de los comparecientes y su capacidad para celebrar el convenio.

DÉCIMA SEGUNDA. ACEPTACIÓN Y RATIFICACIÓN. -

Las partes suscriptoras de la presente Carta Compromiso, aceptan y ratifican las cláusulas que anteceden y para constancia de lo estipulado firman el presente instrumento en cuatro ejemplares de igual tenor y valor, en la ciudad de Quito, 27 de septiembre del 2022.

POR: LA AGENCIA



Ing. Patricio Almeida Granja
DIRECTOR EJECUTIVO
AGENCIA DE REGULACIÓN
Y CONTROL FITO Y
ZOOSANITARIO

POR: LA UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA SALESIANA



María Sol Villagómez Ph.D.
VICERRECTORA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA
SEDE QUITO



Dra. Ana Reino Molina
PROCURADORA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA

Gestionado por:	Dr. Paco Noriega	26-07-2022
Realizado por:	Psic. Cristina Gaibor	06-09-2022
Revisado por:	Mgtr. Nancy Bastidas	06-09-2022
Aprobación de Sede:	María Sol Villagómez R. Ph.D.	06-09-2022
Revisión Legal:	Procuraduría	06-09-2022

Agencia de Regulación y Control Fito y Zootecnario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec

ANEXO A

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo Grace Vanessa Pallares Castro, con cédula de ciudadanía Nro. 1718582164, por medio del presente documento manifiesto y expreso mi voluntad de ceder a la Universidad Politécnica Salesiana, los derechos consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, especialmente los contenidos en los artículos 4, 5 y 6, 20, ello en virtud de que soy autor del trabajo de grado denominado: "VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DIAGNOSTICAR *Botrytis cinerea* MEDIANTE EL SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA BIOLOG, Y EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL ENSAYO MEDIANTE ANÁLISIS GENÉTICO", que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedandola Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Universidad Politécnica Salesiana.

Dado en Quito, al 27 de septiembre de 2022

(Firma)



Nombre: Grace Vanessa Pallares Castro

Cédula: 1718582164

Fecha: 27/09/2022

FIN DEL ANEXO

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas

Código postal: 170518 / Quito-Ecuador

Teléfono: +593 2 382 8860

www.agrocalidad.gob.ec

Anexo 2. Base de datos del género *Botrytis* spp.

<i>B. acinorum</i>	<i>B. caerulescens</i>	<i>B. depraedans</i>	<i>B. flavocinerea</i>
<i>B. aclada</i>	<i>B. californica</i>	<i>B. destructor</i>	<i>B. fragariae</i>
<i>B. acmospora</i>	<i>B. calthae</i>	<i>B. devastrix</i>	<i>B. fritillariae-pallidiflorae</i>
<i>B. acridiorum</i>	<i>B. campsotricha</i>	<i>B. dichotoma</i>	<i>B. fritillarii-pallidoflori</i>
<i>B. aeruginosa</i>	<i>B. camptopoda</i>	<i>B. didyma</i>	<i>B. fuckeliana</i>
<i>B. affinis</i>	<i>B. cana</i>	<i>B. diffusa</i>	<i>B. fulgens</i>
<i>B. africana</i>	<i>B. candidula</i>	<i>B. diospyri</i>	<i>B. fuliginosa</i>
<i>B. agaricina</i>	<i>B. canescens</i>	<i>B. divaricata</i>	<i>B. fulva</i>
<i>B. alba</i>	<i>B. capitata</i>	<i>B. doryphora</i>	<i>B. fumago</i>
<i>B. albidocaesia</i>	<i>B. capsularum</i>	<i>B. douglasii</i>	<i>B. funicola</i>
<i>B. allii</i>	<i>B. carnea</i>	<i>B. effusa</i>	<i>B. furcata</i>
<i>B. allii-fistulosi</i>	<i>B. caroliniana</i>	<i>B. elegans</i>	<i>B. fusca</i>

<i>B. allochroa</i>	<i>B. carthami</i>	<i>B. elegantula</i>	<i>B. fuscata</i>
<i>B. ampelophila</i>	<i>B. ceratioides</i>	<i>B. elliptica</i>	<i>B. galanthina</i>
<i>B. anacardii</i>	<i>B. cercosporaecola</i>	<i>B. ellisii</i>	<i>B. gangliformis</i>
<i>B. angularia</i>	<i>B. cercosporicola</i>	<i>B. elongata</i>	<i>B. ganglioniformis</i>
<i>B. angularis</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>B. epichloes</i>	<i>B. gemella</i>
<i>B. angulata</i>	<i>B. cinerea subsp. cinerea</i>	<i>B. epichloës</i>	<i>B. geminata</i>
<i>B. anthophila</i>	<i>B. cinerella</i>	<i>B. epigaea</i>	<i>B. geniculata</i>
<i>B. arachidis</i>	<i>B. cinereoglauca</i>	<i>B. epigaea subsp. epigaea</i>	<i>B. geophila</i>
<i>B. arborescens</i>	<i>B. cinereovirens</i>	<i>B. epiphylla</i>	<i>B. geotricha</i>
<i>B. arenariae</i>	<i>B. cirsii-spinosissimi</i>	<i>B. eriophyes</i>	<i>B. geranii</i>
<i>B. argillacea</i>	<i>B. citricola</i>	<i>B. eriophyis</i>	<i>B. gigantea</i>
<i>B. arisaemae</i>	<i>B. citrina</i>	<i>B. eriophytis</i>	<i>B. gladioli</i>
<i>B. artocarpi</i>	<i>B. coccotricha</i>	<i>B. erubescens</i>	<i>B. gladiolorum</i>

<i>B. asperula</i>	<i>B. coccotrichoidea</i>	<i>B. erythropus</i>	<i>B. glauca</i>
<i>B. atrata</i>	<i>B. coerulescens</i>	<i>B. eucalypti</i>	<i>B. globosa</i>
<i>B. atrofumosa</i>	<i>B. compacta</i>	<i>B. euphorbiae</i>	<i>B. glomerulosa</i>
<i>B. atroviridis</i>	<i>B. conferta</i>	<i>B. euroamericana</i>	<i>B. gonatobotryoides</i>
<i>B. aurantiaca</i>	<i>B. convallariae</i>	<i>B. fabae</i>	<i>B. gossypina</i>
<i>B. bassiana</i>	<i>B. convoluta</i>	<i>B. fabiopsis</i>	<i>B. granuliformis</i>
<i>B. bicolor</i>	<i>B. corolligena</i>	<i>B. fallax</i>	<i>B. grisea</i>
<i>B. bifurcata</i>	<i>B. croci</i>	<i>B. farinosa</i>	<i>B. grisella</i>
<i>B. bonordenii</i>	<i>B. crustosa</i>	<i>B. farinulenta</i>	<i>B. griseola</i>
<i>B. brevior</i>	<i>B. cryptomeriae</i>	<i>B. fascicularis</i>	<i>B. griseolilacina</i>
<i>B. brongniartii</i>	<i>B. crystallina</i>	<i>B. fasciculata</i>	<i>B. haplaria</i>
<i>B. brunneola</i>	<i>B. curta</i>	<i>B. felisiana</i>	<i>B. hepatica</i>
<i>B. bryi</i>	<i>B. delacroixii</i>	<i>B. ficariarum</i>	<i>B. hormini</i>

<i>B. bryophila</i>	<i>B. dendroides</i>	<i>B. flavicans</i>	<i>B. hortensis</i>
<i>B. byssoidea</i>	<i>B. densa</i>	<i>B. flavida</i>	<i>B. hyacinthi</i>
<i>B. hydrastidis</i>	<i>B. ochracea</i>	<i>B. ramosa</i>	
<i>B. hypophylla</i>	<i>B. oligospora</i>	<i>B. ramulosa</i>	<i>B. streptothrix</i>
<i>B. infestans</i>	<i>B. olivacea</i>	<i>B. ranunculi</i>	<i>B. suberis</i>
<i>B. interrupta</i>	<i>B. olivaceolutea</i>	<i>B. repens</i>	<i>B. taxi</i>
<i>B. isabellina</i>	<i>B. ovulifera</i>	<i>B. reptans</i>	<i>B. tenella</i>
<i>B. jonesii</i>	<i>B. paeoniae</i>	<i>B. rhinotrichoides</i>	<i>B. tenera</i>
<i>B. lactucae</i>	<i>B. pallida</i>	<i>B. rhodochroa</i>	<i>B. tephroidea</i>
<i>B. lanea</i>	<i>B. pannosa</i>	<i>B. rhodospora</i>	<i>B. terrestris</i>
<i>B. latebricola</i>	<i>B. papyrigena</i>	<i>B. ricini</i>	<i>B. tilletii</i>
<i>B. lateritia</i>	<i>B. papyrogena</i>	<i>B. rileyi</i>	<i>B. tillettei</i>
<i>B. laxa</i>	<i>B. paradoxa</i>	<i>B. rivoltae</i>	<i>B. torta</i>

<i>B. laxissima</i>	<i>B. parasitica</i>	<i>B. rosea</i>	<i>B. trabea</i>
<i>B. leucospora</i>	<i>B. patula</i>	<i>B. rubescens</i>	<i>B. tracheiphila</i>
<i>B. leucoxantha</i>	<i>B. pelargonii</i>	<i>B. rudiculoides</i>	<i>B. tracheiphilum</i>
<i>B. lilacina</i>	<i>B. pellicula</i>	<i>B. rufa</i>	<i>B. tricephala</i>
<i>B. liliorum</i>	<i>B. peronosporoides</i>	<i>B. schweinitzii</i>	<i>B. trifolii</i>
<i>B. limacidae</i>	<i>B. phymatotricha</i>	<i>B. sect. botrytis</i>	<i>B. truncata</i>
<i>B. linkii</i>	<i>B. pilulifera</i>	<i>B. sect. Cristularia</i>	<i>B. tulipae</i>
<i>B. longibrachiata</i>	<i>B. pistiae</i>	<i>B. sekimotoi</i>	<i>B. turbinata</i>
<i>B. luteobrunnea</i>	<i>B. platensis</i>	<i>B. septospora</i>	<i>B. umbellata</i>
<i>B. lutescens</i>	<i>B. plebeja</i>	<i>B. seriata</i>	<i>B. umbrina</i>
<i>B. macrospora</i>	<i>B. polyactis</i>	<i>B. setuligera</i>	<i>B. uredinicola</i>
<i>B. mali</i>	<i>B. polyblastis</i>	<i>B. similis</i>	<i>B. urticae</i>
<i>B. martii</i>	<i>B. polyphyllae</i>	<i>B. simplex</i>	<i>B. variosperma</i>

<i>B. medusae</i>	<i>B. polysperma</i>	<i>B. simplex var. preussii</i>	<i>B. varisperma</i>
<i>B. melolonthae</i>	<i>B. polyspora</i>	<i>B. sinoallii</i>	<i>B. vastatrix</i>
<i>B. micheneri</i>	<i>B. porri</i>	<i>B. sinoviticola</i>	<i>B. velutina</i>
<i>B. minutula</i>	<i>B. prasina</i>	<i>B. solani</i>	<i>B. vera</i>
<i>B. monilioides</i>	<i>B. preussii</i>	<i>B. sonchicola</i>	<i>B. verrucosa</i>
<i>B. moricola</i>	<i>B. pruinosa</i>	<i>B. sonchina</i>	<i>B. verticillioides</i>
<i>B. mucedo</i>	<i>B. prunorum</i>	<i>B. spectabilis</i>	<i>B. vicia-hirssutae</i>
<i>B. multifida</i>	<i>B. pseudocinerea</i>	<i>B. sphaeriae-typhinae</i>	<i>B. viciae</i>
<i>B. murina</i>	<i>B. pulcherrima</i>	<i>B. sphaerosperma</i>	<i>B. viciae-hirsutae</i>
<i>B. muscae</i>	<i>B. pulla</i>	<i>B. sphaerospora</i>	<i>B. violacea</i>
<i>B. muscaria</i>	<i>B. pulvinata</i>	<i>B. sphaerulifera</i>	<i>B. virella</i>
<i>B. narcissicola</i>	<i>B. pulvinulus</i>	<i>B. sphagnum</i>	<i>B. viridans</i>
<i>B. nebularis</i>	<i>B. purpureospadicea</i>	<i>B. spicata</i>	<i>B. viticola</i>

B. necans

B. pussila

B. splendida

B. vulgaris

B. nigra

B. pygmaea

B. spongiosa

B. wallrothii

B. nivea

B. pyogenes

B. sporotrichoides

B. yuae

B. nivosa

B. pyramidalis

B. squamosa

B. novaesii

B. pyriformis

B. stellata

B. nutans

B. racemosa

B. stephanoderis

Fuente: (MycoBank, 2022)

Anexo 3. Sinónimos y agrupamiento taxonómico de *Botrytis cinerea* con sus respectivos años de publicación

Sinónimos	Año publicación	Agrupamiento taxonómico de <i>B. cinerea</i>	Año publicación
<i>Botrytis cinerea</i> f. <i>cinerea</i>	1794/1797	<i>B. c.</i> f. <i>punicae</i>	1909
<i>Botrytis cinerea</i>	1797/1801	<i>B. c.</i> f. <i>ocymi</i>	1909
<i>Polyactis vulgaris</i>	1809	<i>B. c.</i> var. <i>dianthi</i>	1909
- <i>Botrytis polyactis</i>	1824	<i>B. c.</i> f. <i>narcissicola</i>	1930
- <i>Monilia vulgaris</i>	1822	<i>B. c.</i> f. <i>primulae-sinensis</i>	1930
- <i>Botrytis vulgaris</i>	1832	<i>B. c.</i> f. <i>pruni-trilobae</i>	1930
<i>Polyactis sclerotiophila</i>	1852/1853	<i>B. c.</i> f. <i>syringae</i>	1930
- <i>Botrytis cinerea</i> var. <i>sclerotiophila</i>	1886	<i>B. c.</i> f. <i>vitis</i>	1930
- <i>Botrytis cinerea</i> subsp. <i>sclerotiophila</i>	1881	<i>B. c.</i> f. <i>gentianae-asclepiadeae</i>	1933
<i>Peziza fuckeliana</i>	1866	<i>B. c.</i> f. <i>theobaldiae</i>	1933
- <i>Sclerotinia fuckeliana</i>	1870	<i>B. c.</i> f. <i>veratri</i>	1933

<i>-Botryotinia fuckeliana</i>	1945	<i>B. c. f. erythronii</i>	1935
<i>Phymatotrichum gemellum</i>	1851	<i>B. c. f. coffeae</i>	1939
<i>-Botrytis gemella</i>	1881	<i>B. c. f. convallariae</i>	
<i>Botrytis diospyri</i>	1901	<i>B. c. f. douglasii</i>	
<i>Botrytis citricola</i>	1903		
<i>Botrytis cinerea f. lini</i>	1929		
<i>Botrytis fuckeliana</i>	1949		
<i>Gonatobotryum sclerotigenum</i>	1971		
<i>Haplaria grisea</i>			

Fuente: (CABI, 2022); (Index Fungorum, 2020); (Mycobank, 2022); (USDA-ARS, 2020)

Anexo 4. Especies huéspedes que son afectados por *B. cinerea*

<i>Abelmoschus esculentus</i>	<i>Allium</i> sp.	<i>Araucaria araucana</i>	<i>Berberis buxifolia</i>	<i>Callistephus hortensis</i>	<i>Cedrus deodara</i>
<i>Abies alba</i>	<i>Allium tuberosum</i>	<i>Arctium lappa</i>	<i>Berberis</i> sp.	<i>Calluna</i> sp.	<i>Cela pentandra</i>
<i>Abies firma</i>	<i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i>	<i>Arctium tomentosum</i>	<i>Berberis vulgaris</i>	<i>Calluna vulgaris</i>	<i>Celastia cristata</i>
<i>Abies fraseri</i>	<i>Alnus incana</i>	<i>Arctostaphylos</i>	<i>Beta</i> sp.	<i>Caltha</i> sp.	<i>Centaurea cyanus</i>
<i>Abies grandis</i>	<i>Alnus rubra</i>	<i>Arisaema triphyllum</i>	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Calycanthus ferulifolius</i>	<i>Centaurea moschata</i>
<i>Abies homolepis</i>	<i>Alnus</i> sp.	<i>Aristolochia durior</i>	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>	<i>Calyxstegia hederacea</i>	<i>Centaurea</i> sp.
<i>Abies lasiocarpa</i>	<i>Alocasia macrorrhiza</i>	<i>Aristolochia maquii</i>	<i>Betula alleghaniensis</i>	<i>Camassia leichlinii</i>	<i>Cephalanthera damasonium</i>
<i>Abies mariesii</i>	<i>Alopecurus pratensis</i>	<i>Armeria maritima</i> subsp. <i>sibirica</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Camassia</i> sp.	<i>Cerasus</i> sp.
<i>Abies nordmanniana</i>	<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Arrhenatherum elatius</i>	<i>Bidens bipinnata</i>	<i>Camellia japonica</i>	<i>Cercis canadensis</i>
<i>Abies procera</i>	<i>Alsophila australis</i>	<i>Artemisia annua</i>	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Camellia sasanqua</i>	<i>Cereus</i> sp.
<i>Abies sachalinensis</i>	<i>Althaea rosea</i>	<i>Artemisia</i> sp.	<i>Bidens sulphurea</i>	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Cestrum purpureum</i>
<i>Abies sachalinensis</i> var. <i>mayriana</i>	<i>Alyssum</i> sp.	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	<i>Bilbergia</i> sp.	<i>Campanula</i> sp.	<i>Chaenomeles japonica</i>
<i>Abies</i> sp.	<i>Amaranthus</i> sp.	<i>Arum cyrenaicum</i>	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	<i>Campanula persicifolia</i>	<i>Chaenomeles lagenaria</i>
<i>Abutilon</i> sp.	<i>Amaranthus tricolor</i>	<i>Asarum sieboldii</i>	<i>Bouvardia longiflora</i>	<i>Campanula</i> sp.	<i>Chaenomeles sinensis</i>
<i>Acacia mearnsii</i>	<i>Amaryllis bella donna</i>	<i>Asclepias rotundifolia</i>	<i>Brassica campestris</i>	<i>Campsis grandiflora</i>	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>
<i>Acalypha australis</i>	<i>Amaryllis</i> sp.	<i>Aspalathus linearis</i>	<i>Brassica campestris</i> var. <i>napobrassica</i>	<i>Cananga odorata</i>	<i>Chamaecyparis nootkatensis</i>
<i>Acer platanoides</i>	<i>Ambrosia trifida</i>	<i>Asparagus asparagoides</i>	<i>Brassica campestris</i> var. <i>oleifera</i>	<i>Canna generalis</i>	<i>Chamaecyparis obtusa</i>
<i>Acer pseudoplatanus</i>	<i>Amelanchier alnifolia</i>	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	<i>Brassica juncea</i>	<i>Canna indica</i>	<i>Chamaecyparis pisifera</i>
<i>Acer</i> sp.	<i>Amorphophallus muelleri</i>	<i>Asparagus officinalis</i>	<i>Brassica napus</i>	<i>Canna</i> sp.	<i>Chamaedaphne calyculata</i>
<i>Aconitum barbatum</i>	<i>Amorphophallus</i> sp.	<i>Asparagus officinalis</i> var. <i>altissimus</i>	<i>Brassica napus</i> subsp. <i>napobrassica</i>	<i>Cannabis sativa</i>	<i>Chamaedorea elegans</i>
<i>Aconitum carmichaelii</i>	<i>Anemone coronaria</i>	<i>Aster</i> sp.	<i>Brassica napus</i> subsp. <i>napus</i>	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	<i>Chamaelobos uncinatum</i>
<i>Acorus calamus</i>	<i>Anemone japonica</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	<i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i>	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Cheiranthus cheiri</i>
<i>Actinidia chinensis</i>	<i>Anemone</i> sp.	<i>Athyrium</i> sp.	<i>Brassica oleracea</i>	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>acuminatum</i>	<i>Chionanthus retusus</i>
<i>Actinidia delicata</i>	<i>Anemone vitifolia</i>	<i>Atractylodes lancea</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>	<i>Chirita diezii</i>
<i>Adiantum capillus-veneris</i>	<i>Anethum graveolens</i>	<i>Atropa belladonna</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	<i>Capsicum frutescens</i>	<i>Chlorophytum comosum</i> var. <i>marginatum</i>
<i>Adiantum</i> sp.	<i>Angelica arguta</i>	<i>Aucuba japonica</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	<i>Capsicum</i> sp.	<i>Chrysanthemum xmarifolium</i>
<i>Aechmea fasciata</i>	<i>Angelica lucida</i>	<i>Avena sativa</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	<i>Cardamine bellifolia</i>	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>
<i>Aeonium arboreum</i>	<i>Angelica sinensis</i>	<i>Azalea indica</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	<i>Cardamine lyrata</i>	<i>Chrysanthemum coccineum</i>
<i>Aeschynanthus</i> sp.	<i>Angelica</i> sp. :	<i>Bartsia alpina</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>ramosa</i>	<i>Carica xhellowii</i> var. <i>pentagona</i>	<i>Chrysanthemum coronarium</i> var. <i>spatiobium</i>
<i>Aeschynomene americana</i>	<i>Anigozanthos manglesii</i>	<i>Bauhinia tomentosa</i>	<i>Brassica pekinensis</i>	<i>Carica pentagona</i>	<i>Chrysanthemum frutescens</i>
<i>Aeschynomene indica</i>	<i>Anoectochilus roxburghii</i>	<i>Begonia xfeastii</i>	<i>Brassica rapa</i>	<i>Carpinus betulus</i>	<i>Chrysanthemum indicum</i>
<i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Anthurium</i> sp.	<i>Begonia xuberhybrida</i>	<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapifera</i>	<i>Carthamus lanatus</i>	<i>Chrysanthemum</i> sp.
<i>Aethionema grandiflorum</i>	<i>Antirrhinum cornutum</i>	<i>Begonia argyrostigma</i>	<i>Brassica</i> sp.	<i>Carthamus tinctorius</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Agave americana</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	<i>Begonia cucullata</i> var. <i>hookeri</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	<i>Carum petroselinum</i>	<i>Cichorium intybus</i>
<i>Agave sisalana</i>	<i>Antirrhinum</i> sp.	<i>Begonia cucullata</i> var. <i>hookeri</i>	<i>Bromus mollis</i>	<i>Cassia mimosoides</i>	<i>Cicuta maculata</i>
<i>Agave</i> sp.	<i>Apium graveolens</i>	<i>Begonia evansiana</i>	<i>Cajanus cajan</i>	<i>Cassia siamea</i>	<i>Cineraria cruenta</i>
<i>Alisma plantago-aquatica</i>	<i>Apium graveolens</i> var. <i>dulce</i>	<i>Begonia president-carnor</i>	<i>Calamintha chinensis</i>	<i>Cassia siamea</i>	<i>Cineraria</i> sp.
<i>Alliaria petiolata</i>	<i>Apium</i> sp.	<i>Begonia rex-cultorum</i>	<i>Calceolaria chinensis</i>	<i>Castilleja miniata</i>	<i>Cineraria</i> sp.
<i>Allium ameloprasum</i>	<i>Aquilaria sinensis</i>	<i>Begonia semperflorens</i>	<i>Calceolaria xiberbeohybrida</i>	<i>Catalpa bignonioides</i>	<i>Cirsium arvense</i>
<i>Allium cepa</i>	<i>Aquilegia vulgaris</i>	<i>Begonia</i> sp.	<i>Calceolaria</i> sp.	<i>Catalpa</i> sp.	<i>Cissis discolor</i>
<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	<i>Arabis</i> sp.	<i>Begonia</i> sp. <i>Indies</i>	<i>Calceolaria</i> sp.	<i>Catalpa speciosa</i>	<i>Citrullus lanatus</i>
<i>Allium fistulosum</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Bellis perennis</i>	<i>Calla palustris</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>
<i>Allium porrum</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Bellis</i> sp.	<i>Callispathia guttata</i>	<i>Cattleya xhybrida</i>	<i>Citrullus edulis</i>
<i>Allium sativum</i>	<i>Aralia cordata</i>	<i>Benincasa hispida</i>	<i>Callistephus chinensis</i>	<i>Cattleya</i> sp.	<i>Citrus xgrandis-reticulata</i>

<i>Citrus xparadisi</i>	<i>Conyza japonica</i>	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>melopepo</i>	<i>Delphinium xcultorum</i>	<i>Epidendrum</i> sp.	<i>Eucalyptus robusta</i>
<i>Citrus xangelo</i>	<i>Cochorus capsularis</i>	<i>Cucurbita</i> sp.	<i>Delphinium ajacis</i>	<i>Epilobium angustifolium</i>	<i>Eucalyptus rostrata</i>
<i>Citrus aurantifolia</i>	<i>Cordyline</i> sp.	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>Delphinium</i> sp.	<i>Epilobium latifolium</i>	<i>Eucalyptus saligna</i>
<i>Citrus aurantiolum</i>	<i>Cordyline terminalis</i>	<i>Cuphea platycentra</i>	<i>Dendranthema morifolium</i>	<i>Epilobium</i> sp.	<i>Eucalyptus</i> sp.
<i>Citrus australis</i>	<i>Coreopsis grandiflora</i>	<i>Cuphea</i> sp.	<i>Dendranthema</i> sp.	<i>Epimedium brevicornu</i>	<i>Eucalyptus stellulata</i>
<i>Citrus chrysocarpa</i>	<i>Coreopsis lanceolata</i>	<i>Cupressus macrocarpa</i>	<i>Dendrobium</i> sp.	<i>Epiphyllum hybridum</i>	<i>Eucalyptus striatocalyx</i>
<i>Citrus grandis</i>	<i>Coreopsis</i> sp.	<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Dianthus barbatus</i>	<i>Epipremnum aureum</i>	<i>Eucalyptus tereticornis</i>
<i>Citrus jambhiri</i>	<i>Coreopsis tinctoria</i>	<i>Curcuma aromatica</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i>	<i>Episcia</i> sp.	<i>Eucalyptus torquata</i>
<i>Citrus junos</i>	<i>Coriandrum sativum</i>	<i>Cyclamen europaeum</i>	<i>Dianthus chinensis</i>	<i>Erigeron</i> sp.	<i>Eucalyptus transcantentalis</i>
<i>Citrus kharma</i>	<i>Cornus alba</i>	<i>Cyclamen indicum</i>	<i>Dianthus chinensis</i> var. <i>heddewigii</i>	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Eucalyptus viminalis</i>
<i>Citrus limon</i>	<i>Cornus florida</i>	<i>Cyclamen persicum</i>	<i>Dianthus heddewigii</i>	<i>Erythronium parviflorum</i>	<i>Eucharis grandiflora</i>
<i>Citrus limonia</i>	<i>Cornus mas</i>	<i>Cyclamen</i> sp.	<i>Dianthus japonicus</i>	<i>Eschscholzia californica</i>	<i>Euonymus alatus</i>
<i>Citrus maxima</i>	<i>Cornus nuttallii</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Dianthus plumarius</i>	<i>Eucalyptus alba</i>	<i>Euonymus</i> sp.
<i>Citrus medica</i>	<i>Cornus racemosa</i>	<i>Cymbalaria muralis</i>	<i>Dianthus</i> sp.	<i>Eucalyptus andrewsii</i>	<i>Eupatorium coelestinum</i>
<i>Citrus meyerii</i>	<i>Corylus americana</i>	<i>Cymbidium goeringii</i>	<i>Dicentra spectabilis</i>	<i>Eucalyptus benthamii</i>	<i>Eupatorium</i> sp.
<i>Citrus nobilis</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Cymbidium hookerianum</i>	<i>Digitalis atropurpurea</i>	<i>Eucalyptus bicostata</i>	<i>Euphorbia dentata</i>
<i>Citrus reticulata</i>	<i>Corylus heterophylla</i>	<i>Cymbidium</i> sp.	<i>Digitaria adscendens</i>	<i>Eucalyptus botryoides</i>	<i>Euphorbia lathyris</i>
<i>Citrus sinensis</i>	<i>Corylus maxima</i>	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>	<i>Digitaria sanguinalis</i>	<i>Eucalyptus caesia</i>	<i>Euphorbia lunulata</i>
<i>Citrus</i> sp.	<i>Cosmos bipinnatus</i>	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Dimorphotheca annua</i>	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	<i>Euphorbia marginata</i>
<i>Citrus unshiu</i>	<i>Cosmos</i> sp.	<i>Cynoglossum</i> sp.	<i>Dimorphotheca aurantiaca</i>	<i>Eucalyptus citriodora</i>	<i>Euphorbia milli</i>
<i>Clarkia elegans</i>	<i>Cosmos sulphureus</i>	<i>Cyphomandra betacea</i>	<i>Dimorphotheca</i> sp.	<i>Eucalyptus coriacea</i>	<i>Euphorbia peplus</i>
<i>Clarkia</i> sp.	<i>Cotinus coggynia</i>	<i>Cyphomandra</i> sp.	<i>Dioscorea batatas</i>	<i>Eucalyptus dalympleana</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>
<i>Clarkia unguiculata</i>	<i>Cotoneaster frigidus</i>	<i>Cypripedium japonicum</i>	<i>Diospyros kaki</i>	<i>Eucalyptus delegatensis</i>	<i>Euphorbia</i> sp.
<i>Clematis recta</i>	<i>Crassula arborescens</i>	<i>Cyrtanthera carnea</i>	<i>Diospyros kaki</i> var. <i>domestica</i>	<i>Eucalyptus diversicolor</i>	<i>Eustoma grandiflorum</i>
<i>Clematis</i> sp.	<i>Crataegus oxyacantha</i>	<i>Cyrtomium falcatum</i>	<i>Diospyros lotus</i>	<i>Eucalyptus elata</i>	<i>Exacum affine</i>
<i>Cleome spinosa</i>	<i>Crataegus pinnatifida</i>	<i>Cyrtomium</i> sp.	<i>Diospyros</i> sp.	<i>Eucalyptus fastigata</i>	<i>Excoecaria cochinchinensis</i>
<i>Clerodendrum splendens</i>	<i>Crataegus</i> sp.	<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Diospyros texana</i>	<i>Eucalyptus gigantea</i>	<i>Fagopyrum esculentum</i>
<i>Clerodendrum trichotomum</i>	<i>Crinum angustum</i>	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Diospyros virginiana</i>	<i>Eucalyptus globoides</i>	<i>Fagopyrum tataricum</i>
<i>Cilanthus formosus</i>	<i>Crinum asiaticum</i>	<i>Dactylorhiza incurvata</i>	<i>Dolichos lablab</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Fagraea cellanica</i>
<i>Cilvia miniata</i>	<i>Crocus</i> sp.	<i>Dahlia Australia</i>	<i>Doryopteris pedata</i>	<i>Eucalyptus globulus</i> subsp. <i>maidenii</i>	<i>Fagus grandifolia</i>
<i>Coccoloba gasslerana</i>	<i>Crossandra</i> sp.	<i>Dahlia pinnata</i>	<i>Dracaena</i> sp.	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Fagus sylvatica</i>
<i>Cleome spinosa</i>	<i>Crotalaria intermedia</i>	<i>Dahlia</i> sp.	<i>Dracaena surculosa</i>	<i>Eucalyptus hemiphloia</i>	<i>Fatsia japonica</i>
<i>Clerodendrum sp.</i>	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Dahlia variabilis</i>	<i>Dryas octopetala</i>	<i>Eucalyptus longifolia</i>	<i>Feijoa sellowiana</i>
<i>Clerodendrum splendens</i>	<i>Crotalaria</i> sp.	<i>Daphne mezereum</i>	<i>Duchesnea indica</i>	<i>Eucalyptus macarthurii</i>	<i>Felicia bergeriana</i>
<i>Coccoloba laurifolius</i>	<i>Crotalaria spectabilis</i>	<i>Daphne</i> sp.	<i>Duranta repens</i>	<i>Eucalyptus maidenii</i>	<i>Ficus aurea</i>
<i>Codiaeum variegatum</i>	<i>Cruciata glabra</i>	<i>Dasyliiron serratifolium</i>	<i>Dyosma veitchii</i>	<i>Eucalyptus muelleriana</i>	<i>Ficus benjamina</i>
<i>Coffea arabica</i>	<i>Cryptanthus</i> sp.	<i>Datura stramonium</i>	<i>Echeveria glauca</i>	<i>Eucalyptus nitens</i>	<i>Ficus carica</i>
<i>Coleus</i> sp.	<i>Cryptomeria japonica</i>	<i>Daucus carota</i>	<i>Echinacea pallida</i> var. <i>angustifolia</i>	<i>Eucalyptus obliqua</i>	<i>Ficus elastica</i>
<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Cucumis melo</i>	<i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i>	<i>Echinacea purpurea</i>	<i>Eucalyptus oreades</i>	<i>Ficus elastica</i> var. <i>decora</i>
<i>Colocasia gigantea</i>	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Davallia</i> sp.	<i>Echinosia coquimbana</i>	<i>Eucalyptus ovata</i>	<i>Ficus lyrata</i>
<i>Commelina communis</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	<i>Davallia trichomanoides</i> f. <i>barbata</i>	<i>Elaeagnus</i> sp.	<i>Eucalyptus pilularis</i>	<i>Filipendula ulmaria</i>
<i>Conioselinum benthamii</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Decaisnea fargesii</i>	<i>Elaeagnus</i> sp.	<i>Eucalyptus quadrangulata</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>
<i>Consolidia ambigua</i>	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>medullosa</i>	<i>Delonix regia</i>	<i>Eleutherococcus senticosus</i>	<i>Eucalyptus regnans</i>	<i>Forsythia xintermedia</i>
<i>Convallaria majalis</i>	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>medullosa</i>	<i>Delonix regia</i>	<i>Emilia sagittata</i>	<i>Eucalyptus resinifera</i>	<i>Forsythia</i> sp.
<i>Convolvulus arvensis</i>	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>medullosa</i>	<i>Delonix regia</i>	<i>Emilia sagittata</i>	<i>Eucalyptus resinifera</i>	<i>Forsythia</i> sp.

<i>Forsythia suspensa</i>	<i>Gleditsia triacanthos</i>	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	<i>Iris xgermanica</i>	<i>Lathyrus odoratus</i>	<i>Lolium multiflorum</i>
<i>Forsythia viridissima</i>	<i>Gloriosa sp.</i>	<i>Hibiscus schizopetalus</i>	<i>Iris confusa</i>	<i>Lathyrus sp.</i>	<i>Lonicera fragrantissima</i>
<i>Fragaria xananassa</i>	<i>Gloxinia sp.</i>	<i>Hibiscus sp.</i>	<i>Iris germanica</i>	<i>Lathyrus vernus</i>	<i>Lonicera involucrata</i>
<i>Fragaria ananassa</i>	<i>Glyceria maxima</i>	<i>Hibiscus syriacus</i>	<i>Iris nertchinskia</i>	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Lonicera japonica</i>
<i>Fragaria chilensis</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Hieracium sabaudum</i>	<i>Iris sp.</i>	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Lonicera marockii</i>
<i>Fragaria hybrida</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	<i>Hieracium umbellatum</i>	<i>Iris tectorum</i>	<i>Lavandula stoechas</i>	<i>Lonicera sp.</i>
<i>Fragaria mexicana</i>	<i>Godetia amoena</i>	<i>Hippeastrum equestre</i>	<i>Iva sp.</i>	<i>Lens culinaris</i>	<i>Lonicera tatarica</i>
<i>Fragaria sp.</i>	<i>Godetia grandiflora</i>	<i>Hippeastrum hybridum</i>	<i>Ixeris denticulata</i>	<i>Leptochloa chinensis</i>	<i>Lotus sp.</i>
<i>Fragaria vesca</i>	<i>Godetia sp.</i>	<i>Hippeastrum sp.</i>	<i>Ixia sp.</i>	<i>Leucadendron discolor</i>	<i>Lucuma nervosa</i>
<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Gossypium arboreum</i>	<i>Hippeastrum vittatum</i>	<i>Jacaranda acutifolia</i>	<i>Leucadendron laxum</i>	<i>Luffa cylindrica</i>
<i>Fraxinus sp.</i>	<i>Gossypium herbaceum</i>	<i>Hippophae rhamnoides</i>	<i>Jacaranda sp.</i>	<i>Leucadendron sp.</i>	<i>Lupinus albus</i>
<i>Freesia hybrida</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Hordeum distichon</i>	<i>Jasminum mesnyi</i>	<i>Leucospermum xcordifolium-lineare</i>	<i>Lupinus angustifolius</i>
<i>Freesia refracta</i>	<i>Gossypium sp.</i>	<i>Hosta plantaginea</i>	<i>Jasminum nudiflorum</i>	<i>Leucospermum cordifolium</i>	<i>Lupinus arboreus</i>
<i>Freesia sp.</i>	<i>Grewia biloba var. parviflora</i>	<i>Hosta sp.</i>	<i>Jasminum officinale</i>	<i>Leucospermum cordifolium-pateronii</i>	<i>Lupinus augustifolius</i>
<i>Fritillaria camschatcensis</i>	<i>Gueldenstaedtia multiflora</i>	<i>Hosta ventricosa</i>	<i>Jasminum primulinum</i>	<i>Leucospermum nutans</i>	<i>Lupinus leucophyllus</i>
<i>Fritillaria pallidiflora</i>	<i>Gynura sp.</i>	<i>Howeia forsteriana</i>	<i>Jasminum sp.</i>	<i>Leucospermum reflexum</i>	<i>Lupinus luteus</i>
<i>Fuchsia fulgens</i>	<i>Gypsophila elegans</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Jatropha podagrica</i>	<i>Leucospermum sp.</i>	<i>Lupinus polyphyllus</i>
<i>Fuchsia hybrida</i>	<i>Gypsophila paniculata</i>	<i>Hyacinthus orientalis</i>	<i>Joannesia princeps</i>	<i>Levisticum officinale</i>	<i>Lupinus sp.</i>
<i>Fuchsia magellanica</i>	<i>Haemanthus multiflorus</i>	<i>Hydrangea arborescens</i>	<i>Juglans sinensis</i>	<i>Libertia ixioides</i>	<i>Luzula confusa</i>
<i>Fuchsia sp.</i>	<i>Halesia monticola</i>	<i>Hydrangea hortensis</i>	<i>Juncus trifidus</i>	<i>Lilium auratum</i>	<i>Lychnis sp.</i>
<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Hedera canariensis</i>	<i>Hydrangea macrophylla</i>	<i>Juniperus procera</i>	<i>Lilium brownii var. colchesteri</i>	<i>Lycopersicon cerasiforme</i>
<i>Gaillardia picta</i>	<i>Hedera helix</i>	<i>Hydrangea macrophylla var. otaksa</i>	<i>Juniperus sp.</i>	<i>Lilium canadense</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Galium odoratum</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Hydrangea paniculata</i>	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i>	<i>Lilium candidum</i>	<i>Lycopersicon esculentum var. cerasiforme</i>
<i>Gardenia jasminoides</i>	<i>Helianthus sp.</i>	<i>Hydrangea paniculata cv. Grandiflora</i>	<i>Kalanchoe sp.</i>	<i>Lilium cernuum</i>	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>
<i>Gardenia jasminoides f. grandiflora</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Hydrangea petiolaris</i>	<i>Kalopanax pictus</i>	<i>Lilium dahuricum</i>	<i>Lycopersicon sp.</i>
<i>Gardenia sp.</i>	<i>Helichrysum bracteatum</i>	<i>Hydrangea sp.</i>	<i>Kerria japonica</i>	<i>Lilium davidii var. unicolor</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Gaura lindheimeri</i>	<i>Heliotropium arborescens</i>	<i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	<i>Kniphofia sp.</i>	<i>Lilium formosanum</i>	<i>Lycoris aurea</i>
<i>Gentiana andrewsii</i>	<i>Heliotropium peruvianum</i>	<i>Hyloteris sp.</i>	<i>Lablab purpureus</i>	<i>Lilium longiflorum</i>	<i>Lycoris radiata</i>
<i>Gentiana antarctica</i>	<i>Helleborus niger</i>	<i>Hymenocallis littoralis</i>	<i>Laburnum anagyroides</i>	<i>Lilium longiflorum var. eximium</i>	<i>Lyonia lucida</i>
<i>Geranium dissectum</i>	<i>Hemerocallis fulva</i>	<i>Hymenocallis tubiflora</i>	<i>Lactuca repens</i>	<i>Lilium regale</i>	<i>Lysimachia davurica</i>
<i>Geranium sp.</i>	<i>Hemstleya amabilis</i>	<i>Hypericum ascyron</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Lilium sp.</i>	<i>Lysimachia thyriflora</i>
<i>Geranium wilfordii</i>	<i>Heuchera sanguinea</i>	<i>Hypericum chinense</i>	<i>Lactuca sativa var. capitata</i>	<i>Lilium tigrinum</i>	<i>Lythrum salicaria</i>
<i>Gerbera hybrida</i>	<i>Heuchera sp.</i>	<i>Iberis sp.</i>	<i>Lactuca sp.</i>	<i>Limonium bonducellii</i>	<i>Macadamia integrifolia</i>
<i>Gerbera jamesonii</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Iberis umbellata</i>	<i>Laelia sp.</i>	<i>Limonium peregrinum</i>	<i>Machilus sp.</i>
<i>Gerbera sp.</i>	<i>Hibiscus -</i>	<i>Impatiens balsamina</i>	<i>Laelocattleya sp.</i>	<i>Limonium sinuatum</i>	<i>Maclura pomifera</i>
<i>Geum aleppicum</i>	<i>Hibiscus acetosella</i>	<i>Impatiens holstii</i>	<i>Lagenaria siceraria</i>	<i>Limonium sp.</i>	<i>Magnolia xsoulangiana</i>
<i>Geum montanum</i>	<i>Hibiscus cannabinis</i>	<i>Impatiens sp.</i>	<i>Lagerstroemia indica</i>	<i>Linaria cymbalaria</i>	<i>Magnolia alba</i>
<i>Geum urbanum</i>	<i>Hibiscus cannabinus</i>	<i>Impatiens wallerana</i>	<i>Lallemantia iberica</i>	<i>Linaria sp.</i>	<i>Magnolia liliflora</i>
<i>Gilia sp.</i>	<i>Hibiscus coccineus</i>	<i>Impatiens walleriana</i>	<i>Lantana camara</i>	<i>Linnaea borealis</i>	<i>Magnolia obovata</i>
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Hibiscus diversifolius</i>	<i>Indigofera arrecta</i>	<i>Larix decidua</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Magnolia sp.</i>
<i>Glaadiolus xgandavensis</i>	<i>Hibiscus medius</i>	<i>Indigofera pseudotinctoria</i>	<i>Larix kaempferi</i>	<i>Liquidambar styraciflua</i>	<i>Maianthemum bifolium</i>
<i>Glaadiolus xhortulanus</i>	<i>Hibiscus moscheutos</i>	<i>Ipomoea aquatica</i>	<i>Larix leptolepis</i>	<i>Lithospermum ruderale</i>	<i>Malus domestica</i>
<i>Glaadiolus princeps</i>	<i>Hibiscus mutabilis</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Larix olgensis</i>	<i>Lobelia erinus</i>	<i>Malus halliana</i>
<i>Glaadiolus sp.</i>	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	<i>Ipomoea reptans</i>	<i>Larix sibirica</i>	<i>Lobelia sp.</i>	<i>Malus pumila</i>

<i>Malus pumila</i> var. <i>domestica</i>	<i>Nicotiana rustica</i>	<i>Papaver nudicaule</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	<i>Pinus patula</i>	<i>Primula vulgaris</i>
<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	<i>Nicotiana sp.</i>	<i>Papaver orientale</i>	<i>Phaseolus multiflorus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Pringlea antiscorbutica</i>
<i>Malus sp.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Papaver rhoeas</i>	<i>Phaseolus sp.</i>	<i>Pinus ponderosa</i>	<i>Protea cynaroides</i>
<i>Malus sylvestris</i>	<i>Nierembergia frutescens</i> var. <i>atro-violacea</i>	<i>Papaver somniferum</i>	<i>Phaseolus trimerius</i>	<i>Pinus radiata</i>	<i>Protea nutans</i>
<i>Malva verticillata</i>	<i>Nierembergia sp.</i>	<i>Papaver sp.</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Pinus resinosa</i>	<i>Protea repens</i>
<i>Malvaceus arboreus</i>	<i>Nopalochia ackermannii</i>	<i>Paphiopedilum insigne</i>	<i>Phladelphus coronarius</i>	<i>Pinus silvestris</i>	<i>Prunella grandiflora</i>
<i>Mandevilla sp.</i>	<i>Nathofagus dombeyi</i>	<i>Paris polyphylla</i>	<i>Phladelphus pekinensis</i>	<i>Pinus sp.</i>	<i>Prunella vulgaris</i>
<i>Manettia sp.</i>	<i>Nymphaea alba</i>	<i>Parthenium argentatum</i>	<i>Phladelphus sp.</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Prunus americana</i>
<i>Mangifera indica</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Paspalum dilatatum</i>	<i>Phillyrea angustifolia</i>	<i>Pinus taiwanensis</i>	<i>Prunus armeniaca</i>
<i>Marthalia incana</i>	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>pilosum</i>	<i>Passiflora caerulea</i>	<i>Phloddendron scandens</i>	<i>Pinus thunbergii</i>	<i>Prunus armeniaca</i> var. <i>ansu</i>
<i>Marthalia incana</i> var. <i>annua</i>	<i>Ocimum minimum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	<i>Phloddendron sp.</i>	<i>Pistacia chinensis</i>	<i>Prunus avium</i>
<i>Matthia sp.</i>	<i>Oenanthe javanica</i>	<i>Passiflora ligularis</i>	<i>Phlox paniculata</i>	<i>Pistacia vera</i>	<i>Prunus cerasifera</i>
<i>Medicago hispida</i>	<i>Oenanthe biennis</i>	<i>Pastinaca sativa</i>	<i>Phoenix roebelenii</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Prunus cerasus</i>
<i>Medicago sativa</i>	<i>Oenanthe glazioviana</i>	<i>Paulownia fortunei</i>	<i>Phormium tenax</i>	<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>arvense</i>	<i>Prunus domestica</i>
<i>Melissa officinalis</i>	<i>Oenothera rosea</i>	<i>Paulownia tomentosa</i>	<i>Photinia serrulata</i>	<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	<i>Prunus dulcis</i>
<i>Mentha x piperita</i>	<i>Oenothera sp.</i>	<i>Pelargonium x domesticum</i>	<i>Physalis peruviana</i>	<i>Pisum sativum</i> var. <i>arvense</i>	<i>Prunus jamaesakura</i>
<i>Mentha piperita</i>	<i>Omphalodes sp.</i>	<i>Pelargonium x hortorum</i>	<i>Picea abies</i>	<i>Plantago major</i>	<i>Prunus japonica</i>
<i>Mespilus germanica</i>	<i>Oncidium sp.</i>	<i>Pelargonium x hortorum</i> var. <i>marginatum</i>	<i>Picea engelmannii</i>	<i>Platyodon grandiflorum</i>	<i>Prunus lannesiana</i>
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	<i>Onobrychis sp.</i>	<i>Pelargonium grandiflorum</i>	<i>Picea glauca</i>	<i>Plectranthus australis</i>	<i>Prunus lannesiana</i> var. <i>speciosa</i>
<i>Metasequoia sp.</i>	<i>Onobrychis vicifolia</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	<i>Picea glehnii</i>	<i>Poa secunda</i>	<i>Prunus mahaleb</i>
<i>Miconia cinnamomifolia</i>	<i>Oplonanax horridum</i>	<i>Pelargonium inquinans</i>	<i>Picea jezoensis</i>	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	<i>Prunus mume</i>
<i>Mimulus luteus</i>	<i>Oplonanax sp.</i>	<i>Pelargonium peltatum</i>	<i>Picea jezoensis</i> var. <i>hondoensis</i>	<i>Podophyllum peltatum</i>	<i>Prunus persica</i>
<i>Monstera deliciosa</i>	<i>Opuntia cylindrica</i>	<i>Pelargonium sp.</i>	<i>Picea mariana</i>	<i>Pollanthes tuberosa</i>	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>
<i>Morus alba</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i>	<i>Pelargonium zonale</i>	<i>Picea rubens</i>	<i>Polygonatum multiflorum</i>	<i>Prunus persica</i> var. <i>vulgaris</i>
<i>Morus sp.</i>	<i>Orchiaceae (Gray)</i>	<i>Penstemon centranthifolius</i>	<i>Picea sitchensis</i>	<i>Polygonatum sp.</i>	<i>Prunus pseudocerasus</i>
<i>Musa cavendishii</i>	<i>Orchis sp.</i>	<i>Penstemon hartwegii</i>	<i>Picea sp.</i>	<i>Polygonum barbatum</i>	<i>Prunus salicina</i>
<i>Musa nana</i>	<i>Oreodoxa regia</i>	<i>Penstemon sp.</i>	<i>Pilea cadieirei</i>	<i>Polygonum lineare</i>	<i>Prunus serrulata</i> var. <i>spontanea</i>
<i>Mutellina purpurea</i>	<i>Origanum majorana</i>	<i>Peperomia ferreyrae</i>	<i>Pilea involucrata</i>	<i>Polygonum persicaria</i>	<i>Prunus sp.</i>
<i>Myoporum parvifolium</i>	<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	<i>Peperomia obtusifolia</i>	<i>Pilea micromphala</i>	<i>Polygonum sp.</i>	<i>Prunus tomentosa</i>
<i>Myoporum sp.</i>	<i>Orbanche fasciculata</i>	<i>Peperomia sp.</i>	<i>Pilea nummularifolia</i>	<i>Polygonum tataricum</i>	<i>Prunus triloba</i>
<i>Myosotis scorpioides</i>	<i>Osmanthus fragrans</i> var. <i>aurantiacus</i>	<i>Perilla frutescens</i>	<i>Pilea peperomioides</i>	<i>Poncirus trifoliata</i>	<i>Prunus virginiana</i>
<i>Myosotis sylvatica</i>	<i>Oxalis comiculata</i>	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i>	<i>Pimpinella brachycarpa</i>	<i>Populus canadensis</i>	<i>Psammophiella muralis</i>
<i>Myrica faya</i>	<i>Oxalis corymbosa</i>	<i>Perilla ocymoides</i>	<i>Pinus banksiana</i>	<i>Populus alba</i>	<i>Pseudocycdonia sinensis</i>
<i>Myrica rubra</i>	<i>Oxalis latifolia</i>	<i>Persea americana</i>	<i>Pinus brutia</i>	<i>Populus tremuloides</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
<i>Narcissus sp.</i>	<i>Oxalis sp.</i>	<i>Persea gratissima</i>	<i>Pinus cembra</i>	<i>Potamogeton nodosus</i>	<i>Pseudotsuga taxifolia</i>
<i>Nelumbo nucifera</i>	<i>Pachysandra axillaris</i> var. <i>stylosa</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Pinus contorta</i> var. <i>latifolia</i>	<i>Potentilla fruticosa</i>	<i>Psidium cattianum</i>
<i>Neomaria longifolia</i>	<i>Pachysandra bodinieri</i>	<i>Petunia x hybrida</i>	<i>Pinus densiflora</i>	<i>Potentilla reptans</i>	<i>Psidium guajava</i>
<i>Nepeta cataria</i>	<i>Paeonia lactiflora</i>	<i>Petunia sp.</i>	<i>Pinus eliotii</i>	<i>Primula elatior</i>	<i>Psidium littorale</i> var. <i>longipes</i>
<i>Nephrolepis exaltata</i>	<i>Paeonia lactiflora</i> var. <i>hortensis</i>	<i>Phaius tankervilleae</i>	<i>Pinus griffithii</i>	<i>Primula malacoides</i>	<i>Psoralea coryifolia</i>
<i>Nephrolepis sp.</i>	<i>Paeonia sp.</i>	<i>Phalaenopsis sp.</i>	<i>Pinus halepensis</i>	<i>Primula obconica</i>	<i>Pteris ensiformis</i>
<i>Nerium indicum</i>	<i>Paeonia suffruticosa</i>	<i>Pharbitis nil</i>	<i>Pinus muricata</i>	<i>Primula obconica</i> cv. <i>Gigantea</i>	<i>Pterocarya stenoptera</i>
<i>Nerium oleander</i>	<i>Panax ginseng</i>	<i>Phaseolus aureus</i>	<i>Pinus nigra</i>	<i>Primula polyantha</i>	<i>Puccinella angustata</i>
<i>Nicotiana glauca</i> var. <i>grandiflora</i>	<i>Panax notoginseng</i>	<i>Phaseolus coccineus</i>	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>laricio</i>	<i>Primula sinensis</i>	<i>Pulsatilla cernua</i>
<i>Nicotiana glauca</i> var. <i>grandiflora</i>	<i>Panax quinquefolius</i>	<i>Phaseolus limensis</i>	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>nigra</i>	<i>Primula sp.</i>	<i>Pulsatilla millefolium</i>

<i>Punica granatum</i>	<i>Rhododendron simsii</i>	<i>Rubus strigosus</i>	<i>Serrula florida</i>	<i>Tagetes patula</i>	<i>Vaccinium angustifolium</i>	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Pyracantha coccinea</i>	<i>Rhododendron sp.</i>	<i>Rubus ursinus</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	<i>Tagetes sp.</i>	<i>Vaccinium ashei</i>	<i>Vitis vinifera var. vinifera</i>
<i>Pyrula rotundifolia var. americana</i>	<i>Rhus typhina</i>	<i>Rubus ursinus var. loganobaccus</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Tamarix sp.</i>	<i>Vaccinium australe</i>	<i>Wasabia japonica</i>
<i>Pyrus betulifolia</i>	<i>Ribes americanum</i>	<i>Rudbeckia hirta</i>	<i>Setaria magna</i>	<i>Taraxacum kok-saghyz</i>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	<i>Weigela coraeensis</i>
<i>Pyrus communis</i>	<i>Ribes aureum</i>	<i>Rudbeckia hybrida</i>	<i>Setaria repens</i>	<i>Taraxacum mongolicum</i>	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	<i>Weigela florida</i>
<i>Pyrus malus</i>	<i>Ribes fasciculatum</i>	<i>Ruellia makoyana</i>	<i>Silybum marianum</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Vaccinium myrtillus</i>	<i>Xanthium saccharatum</i>
<i>Pyrus serotina</i>	<i>Ribes grossularia</i>	<i>Rumex acetosa</i>	<i>Sinningia sp.</i>	<i>Taraxacum sp.</i>	<i>Vaccinium sp.</i>	<i>Xerodrysum bracteatum</i>
<i>Pyrus serotina var. culta</i>	<i>Ribes hirtellum</i>	<i>Rumex sp.</i>	<i>Sinningia speciosa</i>	<i>Tecomaria capensis</i>	<i>Valeriana jatamansi</i>	<i>Zantedeschia aethiopica</i>
<i>Pyrus sinkiangensis</i>	<i>Ribes nigrum</i>	<i>Sagittaria montevidensis</i>	<i>Smilacanthus szechifolius</i>	<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	<i>Valerianella locusta</i>	<i>Zantedeschia sp.</i>
<i>Pyrus sp.</i>	<i>Ribes rubrum</i>	<i>Saintpaulia ionantha</i>	<i>soil Italy</i>	<i>Tetrasigma planicaule</i>	<i>Vanda sp.</i>	<i>Zauschneria californica</i>
<i>Quercus ilex pennata</i>	<i>Ribes sanguinellum</i>	<i>Saintpaulia sp.</i>	<i>Solanum khasianum</i>	<i>Thalassia testudinum</i>	<i>Veratrum californicum</i>	<i>Zea mays</i>
<i>Quercus ilex</i>	<i>Ribes sanguineum</i>	<i>Salicornia bigelovii</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Theobroma cacao</i>	<i>Verbena xhybrida</i>	<i>Zinnia elegans</i>
<i>Quercus petraea</i>	<i>Ribes sativum</i>	<i>Salix silesiaca</i>	<i>Solanum melongena</i>	<i>Thevetia peruviana</i>	<i>Verbena tenera</i>	<i>Zinnia sp.</i>
<i>Quercus robur</i>	<i>Ribes sp.</i>	<i>Salpiglossis sinuata</i>	<i>Solanum melongena var. esculentum</i>	<i>Thuja orientalis</i>	<i>Veronica sp.</i>	<i>Ziziphus jujuba var. inermis</i>
<i>Quercus rubra</i>	<i>Ribes triste</i>	<i>Salpiglossis sp.</i>	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Thuja plicata</i>	<i>Viburnum lantana</i>	
<i>Ranunculus abortivus</i>	<i>Ribes uva-crispa</i>	<i>Salvia dorisiana</i>	<i>Solanum sp.</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Viburnum odoratissimum</i>	
<i>Ranunculus asiaticus</i>	<i>Ribes uva-crispa var. sativum</i>	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Thymus sp.</i>	<i>Viburnum opulus</i>	
<i>Ranunculus auricomus</i>	<i>Ribes vulgare</i>	<i>Salvia splendens</i>	<i>Solidago sp.</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Viburnum sp.</i>	
<i>Ranunculus cassubicus</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Sambucus sp.</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Toona sinensis</i>	<i>Viburnum tinus</i>	
<i>Ranunculus sceleratus</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Sanchezia nobilis</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Torenia foenieri</i>	<i>Vicia angustifolia</i>	
<i>Ranunculus sp.</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Sanguisorba officinalis</i>	<i>Sophora flavescens</i>	<i>Tradescantia fluminensis</i>	<i>Vicia faba</i>	
<i>Raphanus sativus</i>	<i>Rosa acicularis</i>	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	<i>Sorghum halepense</i>	<i>Tradescantia sp.</i>	<i>Vicia faba var. equina</i>	
<i>Rauwolfia yunnanensis</i>	<i>Rosa banksiae</i>	<i>Sarcococca sp.</i>	<i>Sorghum vulgare</i>	<i>Trapogon portifolius</i>	<i>Vicia faba var. minor</i>	
<i>Ravenara rivularis</i>	<i>Rosa canina</i>	<i>Saxifraga rivularis</i>	<i>Spathiphyllum patinii</i>	<i>Trichocereus sp.</i>	<i>Vicia sativa</i>	
<i>Rheum officinale</i>	<i>Rosa chinensis</i>	<i>Saxifraga sp.</i>	<i>Specularia perfoliata</i>	<i>Triadax procumbens</i>	<i>Vicia sp.</i>	
<i>Rheum rhubarbarum</i>	<i>Rosa hybrida</i>	<i>Saxifraga stolonifera</i>	<i>Spinacea oleracea</i>	<i>Trifolium arvense</i>	<i>Vicia tetrasperma</i>	
<i>Rheum rhaponticum</i>	<i>Rosa multiflora var. carnea</i>	<i>Schisandra columbaria</i>	<i>Spinacea oleracea</i>	<i>Trifolium cherleri</i>	<i>Vicia unguiculata</i>	
<i>Rheum undulatum</i>	<i>Rosa odorata</i>	<i>Schisandra chinensis</i>	<i>Staphylea trifolia</i>	<i>Trifolium hybridum</i>	<i>Vicia villosa</i>	
<i>Rhinanthus sp.</i>	<i>Rosa rugosa</i>	<i>Schiumbergera bridgesii</i>	<i>Stephanotis floribunda</i>	<i>Trifolium incarnatum</i>	<i>Vigna sinensis</i>	
<i>Rhododendron adenogynum</i>	<i>Rosa sinensis</i>	<i>Scleranthus fucliana:</i>	<i>Stevia rebaudiana</i>	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Vinca major</i>	
<i>Rhododendron albrechtii</i>	<i>Rosa sp.</i>	<i>Scorzonera hispanica</i>	<i>Stevia sp.</i>	<i>Trifolium repens</i>	<i>Vinca minor</i>	
<i>Rhododendron arboreum</i>	<i>Roystonea regia</i>	<i>Scutellaria baicalensis</i>	<i>Stewartia pseudocamellia</i>	<i>Trifolium sp.</i>	<i>Vinca sp.</i>	
<i>Rhododendron cantabile</i>	<i>Rubus chamaemorus</i>	<i>Scutellaria galericulata</i>	<i>Stokesia laevis</i>	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	<i>Vincetoxicum hirundinaria</i>	
<i>Rhododendron catarwbiense</i>	<i>Rubus corcharifolius</i>	<i>Scutellaria sp.</i>	<i>Strelitzia reginae</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Viola xwittrockiana</i>	
<i>Rhododendron decarum</i>	<i>Rubus crataegifolius</i>	<i>Secale cereale</i>	<i>Strelitzia sp.</i>	<i>Triticum secale</i>	<i>Viola acuminata</i>	
<i>Rhododendron gandavense</i>	<i>Rubus fruticosus</i>	<i>Sedum sp.</i>	<i>Stylosanthes guianensis</i>	<i>Triticum spelta</i>	<i>Viola cornuta</i>	
<i>Rhododendron indicum</i>	<i>Rubus hybrid</i>	<i>Senecio cruentus</i>	<i>Stylosanthes hamata</i>	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Viola montana</i>	
<i>Rhododendron japonicum</i>	<i>Rubus idaeus</i>	<i>Senecio sp.</i>	<i>Stylosanthes humilis</i>	<i>Tsuga heterophylla</i>	<i>Viola odorata</i>	
<i>Rhododendron maximum</i>	<i>Rubus loganobaccus</i>	<i>Sequoia gigantea</i>	<i>Stylosanthes sp.</i>	<i>Tsuga sp.</i>	<i>Viola sp.</i>	
<i>Rhododendron mucronatum</i>	<i>Rubus multiflorus</i>	<i>Sequoia sempervirens</i>	<i>Stylosanthes viscosa</i>	<i>Tulipa gesneriana</i>	<i>Viola tricolor</i>	
<i>Rhododendron nudiflorum</i>	<i>Rubus parviflorus</i>	<i>Sequoia wellingtonia</i>	<i>Syringia dilatata</i>	<i>Tulipa sp.</i>	<i>Viola tricolor var. hortensis</i>	
<i>Rhododendron obtusum</i>	<i>Rubus pinnatus</i>	<i>Sequoiadendron giganteum</i>	<i>Syringia sp.</i>	<i>Ulmus laevis</i>	<i>Vitis xabrusca-vinifera</i>	
<i>Rhododendron obtusum var. kaempferi</i>	<i>Rubus sp.</i>	<i>Senecio foetida var. aureo-marginata</i>	<i>Syringia vulgaris</i>	<i>Urena lobata</i>	<i>Vitis labrusca</i>	
<i>Rhododendron ponticum</i>	<i>Rubus spectabilis</i>	<i>Serratula sp.</i>	<i>Tagetes erecta</i>	<i>Vaccinium alaskaense</i>	<i>Vitis sp.</i>	

Fuente: (USDA-ARS, 2020)

Anexo 5. Plaguicidas categorizados y aceptados en el Ecuador para el control de *Botrytis* spp.

y *B. cinerea*

Ingrediente activo	Categoría Toxicológica*	Uso Autorizado (patógeno/cultivo)
Aceite del árbol de té (melaleuca alternifolia)	IV	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Uva; <i>Botrytis</i> sp./Cebollín/cebolla/Ajo
Aromatic solvent naphtha + Difenconazole	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Ascorbic acid	IV	<i>B. cinerea</i> /Frutilla
Azoxystrobin	II	<i>B. cinerea</i> /Tomate riñón
Azoxystrobin + Chlorothalonil	II	<i>B. cinerea</i> /Tomate riñón
Azoxystrobin + Difenconazole	II	<i>B. cinerea</i> /Uva
Azoxystrobin + Tebuconazole	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Bacillus amyloliquefaciens cepa MBI 600	IV	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate riñón
Bacillus subtilis cepa qst 713	IV	<i>B. cinerea</i> /Fresa, Rosa
Bacillus subtilis gb03	IV	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Boscalid	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate riñón

Boscalid + Cyprodinil	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Boscalid + Iprodione	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Boscalid + Kresoxim-methyl	III	<i>B. cinerea</i> /Tomate de árbol, Fresa, Kiwi
Boscalid + Pyraclostrobin	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Captan	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Gypsophila
Carbendazim	IV	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate de árbol, Tomate riñón, Fresa
Carbendazim + Propiconazole	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Carbendazim + Tebuconazole	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate de árbol
Carboxin + Thiram	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Chlorothalonil	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Chlorothalonil + Metalaxyl	II	<i>B. cinerea</i> /Tomate riñón
Cinnamaldehyde + Eugenol	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Copper sulphate pentahydrate	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Brócoli
Cymoxanil + Propineb	III	<i>B. cinerea</i> /Tomate riñón

Cyprodinil	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Cyprodinil + Difenconazole	III	<i>B. cinerea</i> /Tomate riñón
Cyprodinil + Fludioxonil	II	<i>B. cinerea</i> /Brócoli, Tomate riñón, Rosa, Uva
Cyprodinil + Prochloraz	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Diethofencarb	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Difenconazole	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Difenconazole + Kresoxim-methyl	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Difenconazole + Pyraclostrobin	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Dimethomorph + Folpet	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate riñón
Dodine	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate riñón
Extracto de rutacea (limonene)	IV	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Fenaminstrobin + Tebuconazole	III	<i>B. cinerea</i> /Tomate riñón
Fenhexamid	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Fenhexamid + Fludioxonil	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa

Fenhexamid + Tebuconazole	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Uva
Fenpropidin + Penconazole	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa

Continuación....

Fluazinam	II	<i>B. cinerea</i> Rosa, Tomate riñón
Fludioxonil	II	<i>B. cinerea</i> /Tomate riñón, Rosa, Brócoli
Fludioxonil + Pydiflumetofen	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Fluopyram + Pyrimethanil	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Fluxapyroxad	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Fluxapyroxad + Pyraclostrobin	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Folpet	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Iminoctadine tris(albesilate)	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate riñón
Iprodione	IV	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate de árbol, Tomate riñón, Frutilla; <i>Botrytis</i> sp./Pepino, Ajo, Melón, Cebolla perla

Iprodione + Thiophanate-methyl	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Isofetamid	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Kresoxim-methyl	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Mancozeb	III	<i>B. allii</i> /Cebolla perla, Ajo, Cebolla bulbo
Mepanipyrim	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Metalaxyl + Propamocarb hydrochloride	III	<i>B. cinerea</i> /Tomate riñón
Phenamacril + Tebuconazole	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Polyoxin b	IV	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Prochloraz	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa, <i>B. allii</i> /Cebolla
Procymidone	II	<i>B. cinerea</i> /Tomate riñón, Rosa
Propineb	III	<i>B. allii</i> /Cebollin, Cebolla perla, Cebolla bulbo, Ajo; <i>B. cinerea</i> /Uva
Pyrimethanil	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate riñón, Uva
Pyrimethanil + Thiram	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Ají, Berenjena, Naranjilla, Pepino dulce, Pimiento, Tomate de árbol, Uvilla

Sal sodica de ácido hidroximetano sulfinico	IV	<i>B. cinerea</i> /Rosa
Tebuconazole	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate riñón
Tebuconazole + Triadimefon	III	<i>Botrytis</i> sp./Ajo, Cebolla bulbo
Thiabendazole	III	<i>Botrytis</i> sp./Rosa
Thiophanate-methyl	II	<i>B. cinerea</i> /Rosa, Tomate de árbol, Tomate riñón
Thiram	III	<i>B. cinerea</i> /Rosa

Nota: * II Moderadamente peligrosa, III Ligeramente peligrosa, IV Cuidado

Fuente: (AGROCALIDAD, 2022)

Anexo 6. Clave dicotómica para la identificación de *Botrytis* spp.

Classification of and Keys to the Genera Treated

Pleomorphic fungi are keyed out according to both teleomorphic and anamorphic genera, though the text refers only to one of them. Order and family names are given for information about the present classification, without pretending that the keys would adequately distinguish these taxa.

(Figures in parentheses refer to numbered illustrations).

I. OOMYCOTA: Hyphae coenocytic, without regularly spaced septa; cell walls containing cellulose; zoospores with two unequal flagella; sexual organs immobile; oogonia and antheridia.

A. Saprolegniales, Saprolegniaceae: Mycelium producing sacculate or filamentous zoosporangia; zoospores in the first discharge ovoid with flagella inserted at the anterior end or encysting at once, secondary zoospores reniform with laterally inserted flagella.

Zoosporangia filamentous, forming a single row of zoospores, which encyst at the mouth at emergence; oogonia without pits, containing a single oospore; aquatic and terrestrial species. *Aphanogonyx*

B. Peronosporales: Mycelium producing variously shaped zoosporangia; zoosporangia sometimes dichotomous and acting as conidia; zoospores released either directly or from a thin-walled vesicle, reniform, with laterally inserted flagella; oogonia mostly containing a single oospore.

Sporangiophores usually not differentiated from the mycelium; sporangia usually ovoid or obpyriform with a distinct apical differentiation for zoospore discharge; antheridia amphigynous (1) or parangyous (2), *Uromyces* not filling the oogonium (epitokic) *Peronospora*

C. Pythiales: Sporangia filamentous, irregularly inflated or globose to ovoid, releasing their contents into a spherical vesicle in which the zoospores develop; antheridia parangyous in various modifications; oospores plerotic or aplerotic *Pythium*



II. ZYGOMYCOTA (*Mucoromycotina*): Hyphae coenocytic, cell walls chitinous, asexual spores immobile, produced in many-spored sporangia, few- to 1-spored sporangioles, fragmenting merosporangia, or in clusters on sporocladia; sexual propagation through zygospores produced by fusion of hyphal gametangia.

A. Mortieriales: Mycelium often dichotomously branched; sporangia many-, few- or 1-spored, lacking a columella, often often pedicellate, zygospores hyaline, smooth-walled or indented, sometimes invested by a hyphal coat; oligotrophic, i.e. sporulating optimally on meagre media (*Mortierella*-ceae) *Mortierella*

B. Mucorales: Hyphae forming indefinite coenocytic mycelia with racemose branching, without regularly spaced septa, sporocarpia absent, sporangiospores produced in many-spored sporangia, few- or 1-spored sporangioles, or merosporangia, which are not usually forcibly discharged; when formed in sporangia, the base usually forms a sterile columella. Mostly saprotrophic, occasionally obligate mycoparasites or parasites on animals or plants; sporulating optimally on ordinary laboratory media with various sugars

1 Sporangioles or merosporangia produced synchronously externally on vesicles; saprotrophic ... 2
 Sporangia or sporangioles not produced synchronously on vesicles 3

2(1) Smooth-walled merosporangia fragmenting into a row of sporangiospores (3) (*Syncephalastraceae*) *Syncephalastrum*
 Sporangioles 1-spored, ± ornamented (4) (*Cunninghamellaceae*) *Cunninghamella*

2(1) Sporangioles producing often large, columellate, multi-spored sporangia with deliquescent walls, and always few- or 1-spored sporangioles with deliquescent walls, and always few- or 1-spored sporangioles with a persistent and separable wall on thin lateral branches; all branchlets dichotomously dividing, straight, each bearing a sporangiole; sterile spines absent (*Thamnidaceae*) *Thamnidium*
 Sporangioles, if present, not in dense clusters and with evanescent or inseparable walls 4

4(3) Sporangioles (and stolons) long, forming a mat of several millimetres high; sporangia multi-spored and columellate; zygospores pigmented, ornamented or smooth-walled, naked or surrounded by distinct appendages (*Mucoraceae*) 5
 Sporangioles short, forming a velvet of 1–2 mm; sporangia many-, few- or 1-spored, columella absent or minute; zygospores unknown (*Umbelopsisaceae*) *Umbelopsis*



Anexo 7. Muestras vegetales inoculadas con aislados puros de *B. cinerea*



Fuente: (La autora, 2023)

Anexo 8. Panel de prueba FF MicroPlate™

A1	Water	A2	Tween 80	A3	N-Acetyl-D-Galactosamine	A4	N-Acetyl-D-Glucosamine	A5	N-Acetyl-β-D-Mannosamine	A6	Adonitol	A7	Amygdalin	A8	D-Arabinose	A9	L-Arabinose	A10	D-Arabitol	A11	Arbutin	A12	D-Cellobiose
B1	α-Cyclodextrin	B2	β-Cyclodextrin	B3	Dextrin	B4	l-Erythritol	B5	D-Fructose	B6	L-Fucose	B7	D-Galactose	B8	D-Galacturonic Acid	B9	Geniobiose	B10	D-Gluconic Acid	B11	D-Glucosamine	B12	α-D-Glucose
C1	α-D-Glucose-1-Phosphate	C2	Glucuronamide	C3	D-Glucuronic Acid	C4	Glycerol	C5	Glycogen	C6	m-Inositol	C7	2-Keto-D-Glucuronic Acid	C8	α-D-Lactose	C9	Lactulose	C10	Mallitol	C11	Maltose	C12	Maltotriose
D1	D-Mannitol	D2	D-Mannose	D3	D-Melezitose	D4	D-Melibiose	D5	α-Methyl-D-Galactoside	D6	β-Methyl-D-Galactoside	D7	α-Methyl-D-Glucoside	D8	β-Methyl-D-Glucoside	D9	Palaliose	D10	D- Psicose	D11	D-Raffinose	D12	L-Rhamnose
E1	D-Ribose	E2	Salicin	E3	Sedoheptulosan	E4	D-Sorbitol	E5	L-Sorbose	E6	Stachyose	E7	Sucrose	E8	D-Tagatose	E9	D-Trehalose	E10	Turanose	E11	Xylitol	E12	D-Xylose
F1	γ-Aminobutyric Acid	F2	Bromosuccinic Acid	F3	Fumaric Acid	F4	β-Hydroxybutyric Acid	F5	γ-Hydroxybutyric Acid	F6	p-Hydroxyphenylacetic Acid	F7	α-Ketoglutaric Acid	F8	D-Lactic Acid Methyl Ester	F9	L-Lactic Acid	F10	D-Malic Acid	F11	L-Malic Acid	F12	Quinic Acid
G1	D-Saccharic Acid	G2	Sebacic Acid	G3	Succinamic Acid	G4	Succinic Acid	G5	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	G6	N-Acetyl-L-Glutamic Acid	G7	L-Alaninamide	G8	L-Alanine	G9	L-Alanyl-Glycine	G10	L-Asparagine	G11	L-Aspartic Acid	G12	L-Glutamic Acid
H1	Glycyl-L-Glutamic Acid	H2	L-Ornithine	H3	L-Phenylalanine	H4	L-Proline	H5	L-Pyroglutamic Acid	H6	L-Serine	H7	L-Threonine	H8	2-Aminoethanol	H9	Putrescine	H10	Adenosine	H11	Uridine	H12	Adenosine-5'-Monophosphate

Fuente: (BIOLOG, 2010)

Anexo 9. Base de datos del sistema de identificación microbiana

<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium compactum</i>	<i>Mucor mucedo</i>
<i>Apiospora montagnei</i>	<i>Fusarium crookwellense</i>	<i>Mucor racemosus f sp racemosus</i>
<i>Aspergillus flavus var flavus</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Myrothecium roridum</i>
<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Myrothecium verrucaria</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Nectria aureofulva</i>
<i>Aspergillus niger v. Tiegham</i>	<i>Fusarium fujikuroi</i>	<i>Nectria haematococca</i>
<i>Botryosporium longibrachiatum</i>	<i>Fusarium globosum</i>	<i>Nectria ochroleuca</i>
<i>Botrytis aclada</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Neosartorya fischeri var fischeri</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium gramineum</i>	<i>Neosartorya fischeri var fischeri</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Fusarium heterosporum</i>	<i>Nigrospora oryzae</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Fusarium longipes</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i>

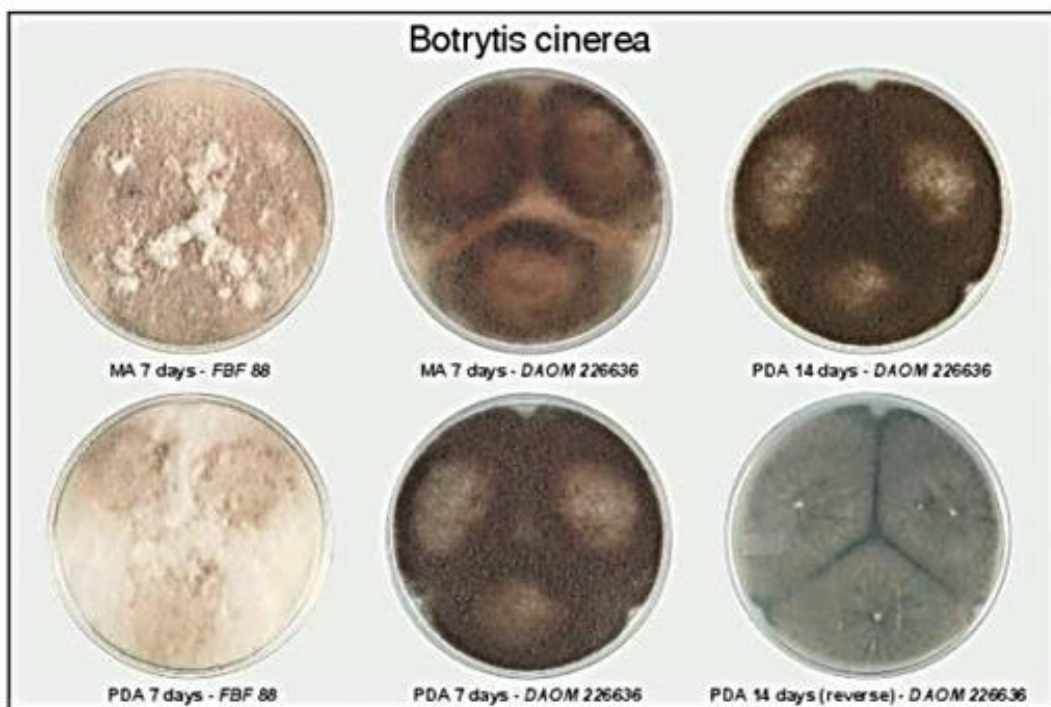
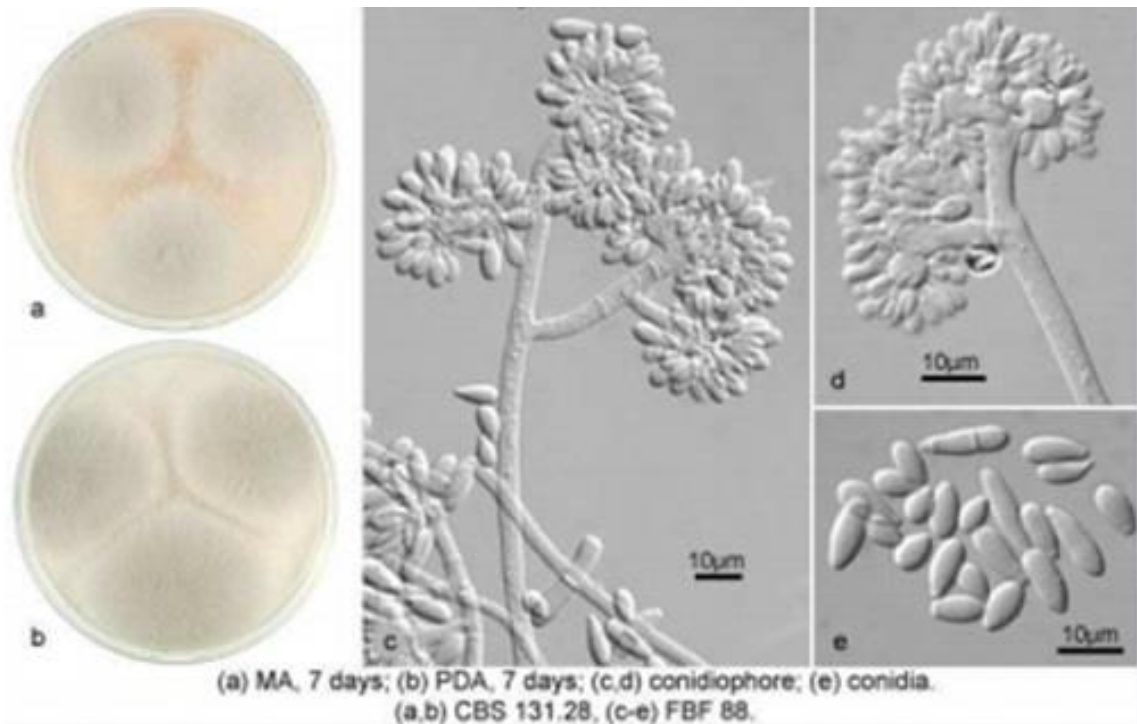
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Ophiostoma ulmi</i>
<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Fusarium pallidoroseum</i>	<i>Penicillium digitatum</i>
<i>Colletotrichum capsici</i>	<i>Fusarium poae</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Fusarium proliferatum</i> var <i>proliferatum</i>	<i>Penicillium hirsutum</i>
<i>Colletotrichum coffeanum</i>	<i>Fusarium pseudoanthophilum</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>
<i>Colletotrichum crassipes</i>	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	<i>Pestalotiopsis maculans</i>
<i>Colletotrichum dematium</i>	<i>Fusarium redolens</i>	<i>Phoma chrysanthemicola</i>
<i>Colletotrichum destructivum</i>	<i>Fusarium reticulatum</i>	<i>Phoma exigua</i> var <i>exigua</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Fusarium sacchari</i>	<i>Phoma glomerata</i>
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> var <i>sambucinum</i>	<i>Phoma herbarum</i>
<i>Colletotrichum trichellum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Phoma macrostoma</i> var <i>macrostoma</i>

<i>Colletotrichum trifolii</i>	<i>Fusarium sporotrichioides</i> var <i>minus</i>	<i>Phoma multirostrata</i>
<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Fusarium sporotrichioides</i> var <i>sporotrichioides</i>	<i>Phoma septicalis</i>
<i>Curvularia lunata</i> var <i>lunata</i>	<i>Fusarium stilboides</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Pithomyces chartarum</i>
<i>Eurotium chevalieri</i>	<i>Fusarium thapsinum</i>	<i>Pithomyces sacchari</i>
<i>Fusarium acuminatum</i>	<i>Fusarium torulosum</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Fusarium annulatum</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i> var <i>stolonifer</i>
<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium udum</i>	<i>Stachybotrys chartarum</i>
<i>Fusarium avenaceum</i> s sp <i>aywerte</i>	<i>Fusarium venenatum</i>	<i>Stachybotrys cylindrospora</i>
<i>Fusarium avenaceum</i> s sp <i>nurragi</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Torula herbarum</i>

<i>Fusarium brevicatenuatum</i>	<i>Fusarium xylarioides</i>	<i>Trichothecium roseum</i>
<i>Fusarium camptoceras</i>	<i>Gliocladium viride</i>	<i>Ulocladium chartarum</i>
<i>Fusarium chlamydosporum</i> var <i>chlamydosporum</i>	<i>Microdochium bolleyi</i>	<i>Ustilago maydis</i>

Fuente: (BIOLOG, 2008) (Modificado de Microbial Identification Database for Biolog Systems, Part. # 00A005, Rev C 05/2008)

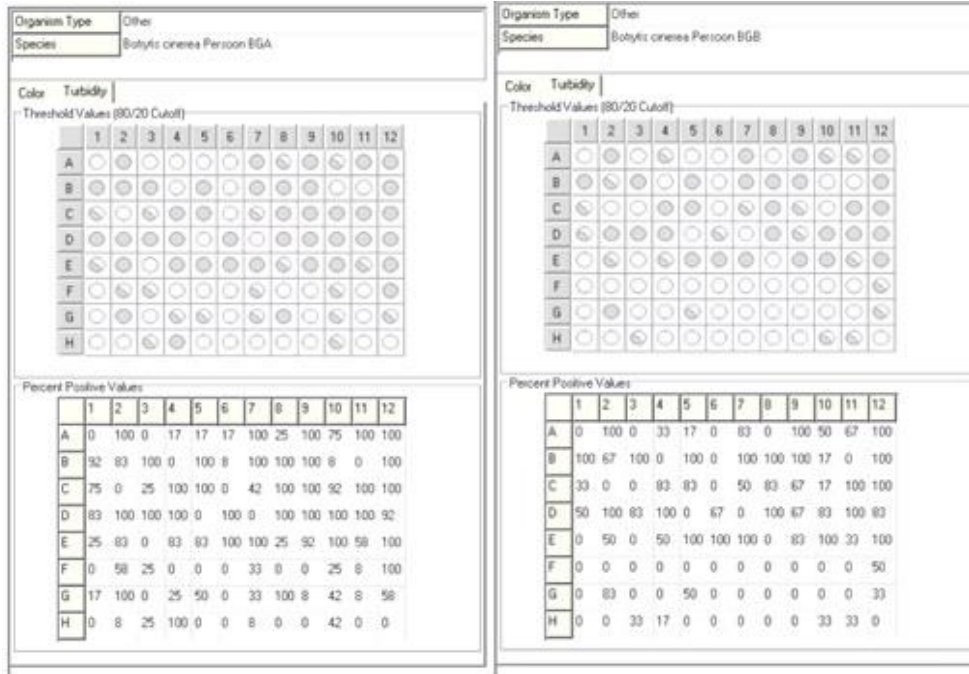
Anexo 10. Cultivos miceliares de *Botrytis cinerea* pertenecientes a la fototeca del sistema de identificación microbiana BIOLOG



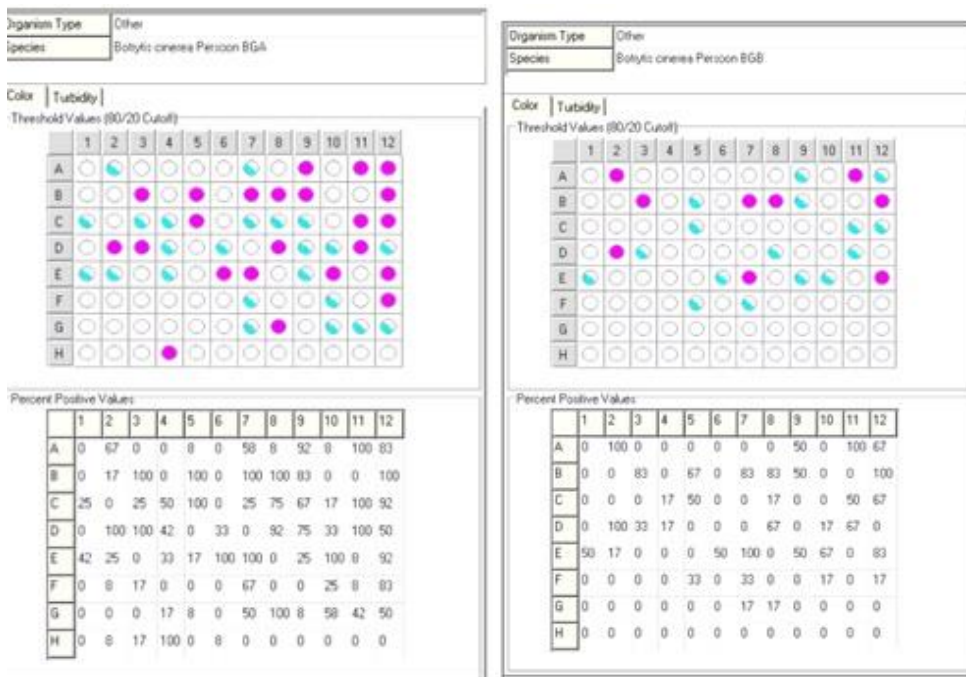
Fuente: (BIOLOG, 2008)

Anexo 11. Perfiles metabólicos de *B. cinerea* del sistema Biolog's Microlog™

a. BGA y BGB (turbidez)



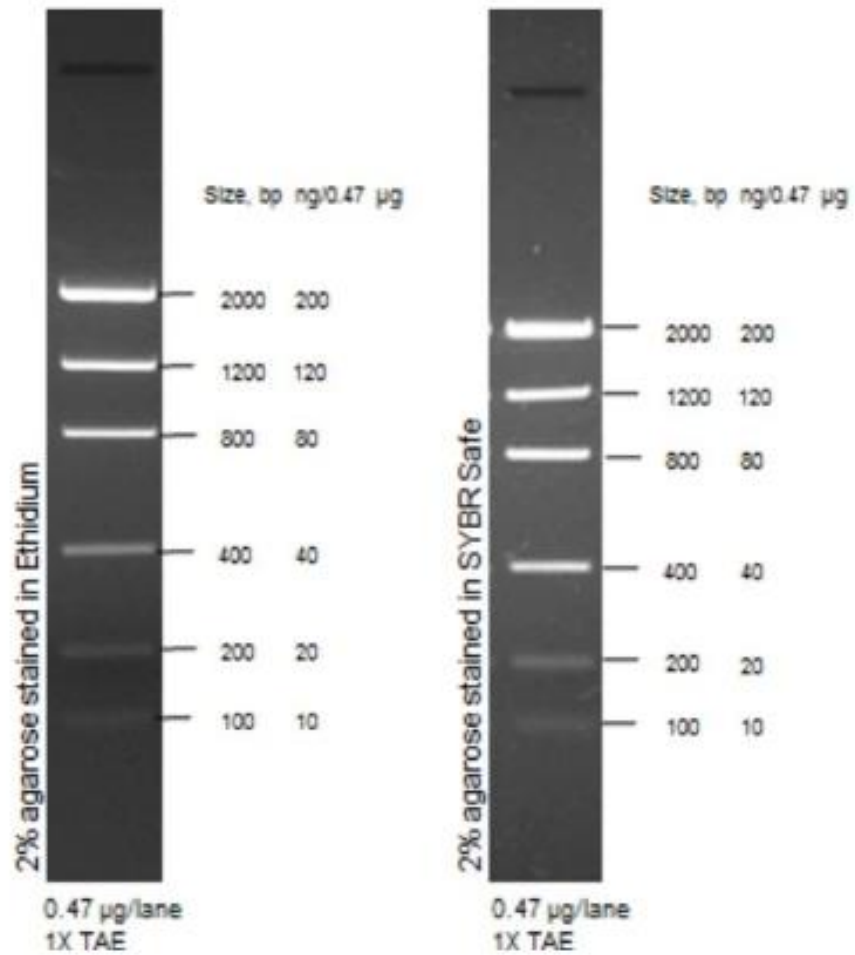
b. BGA y BGB (color)



Fuente: (BIOLOG, 2008)

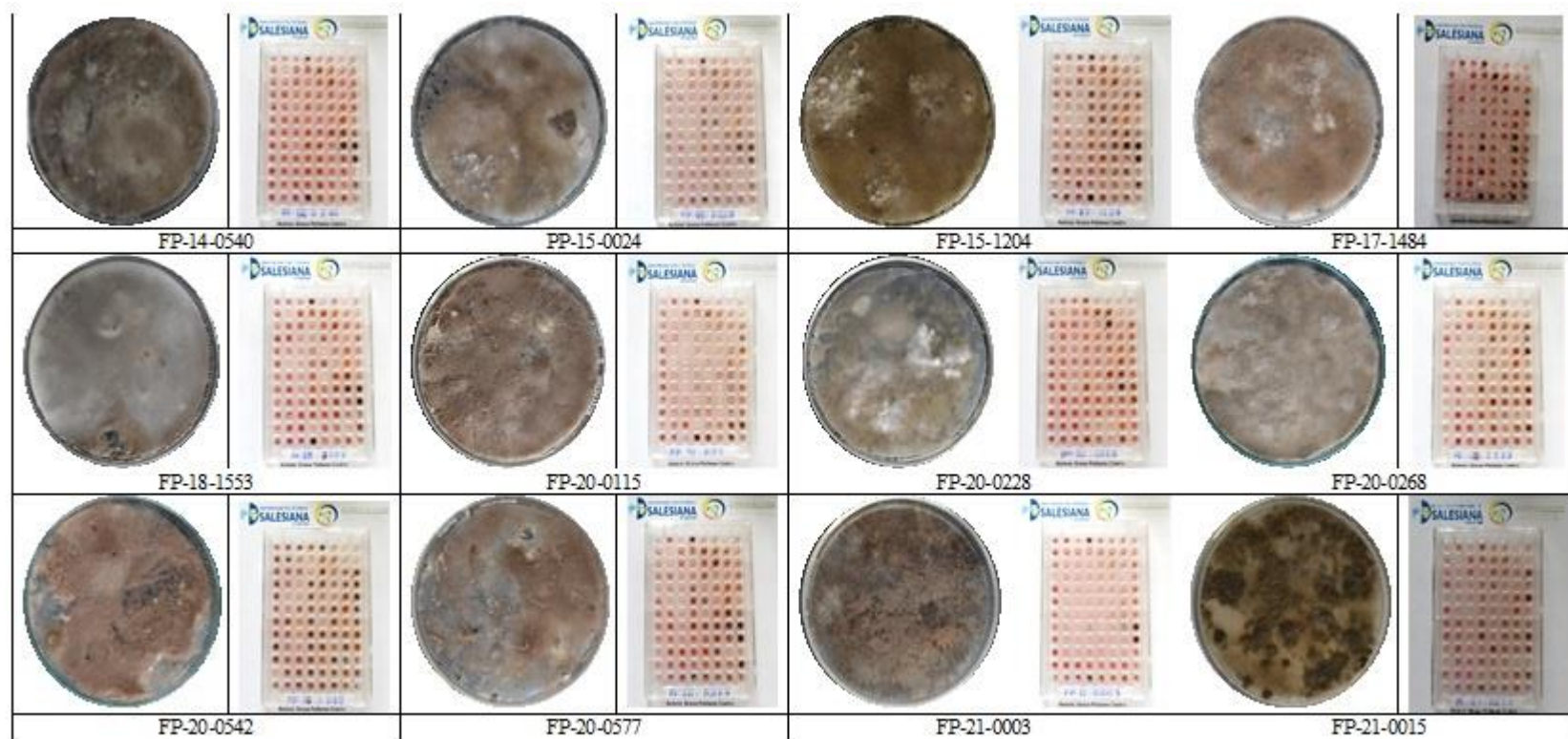
Anexo 12. Patrón electroforético de los marcadores de peso y concentración

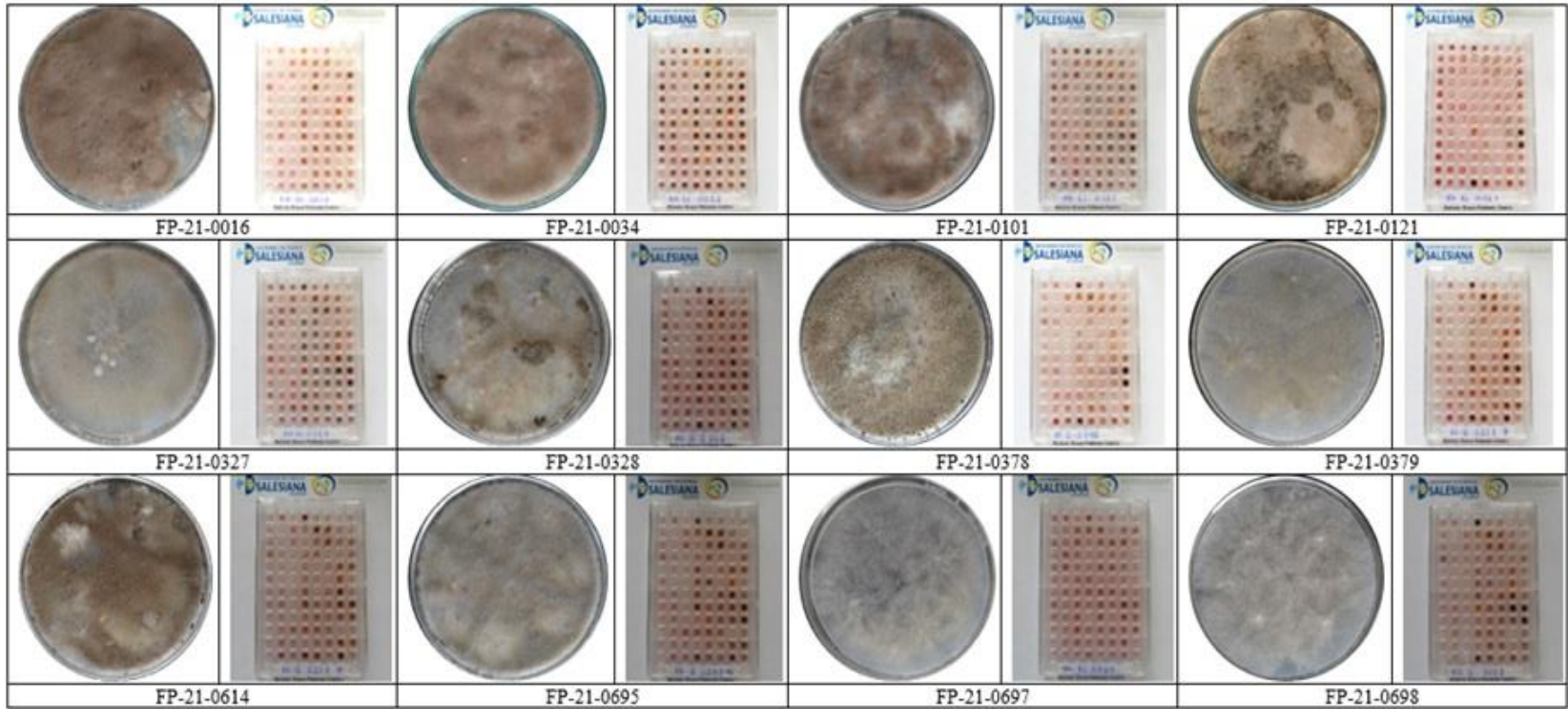
Low DNA Mass Ladder

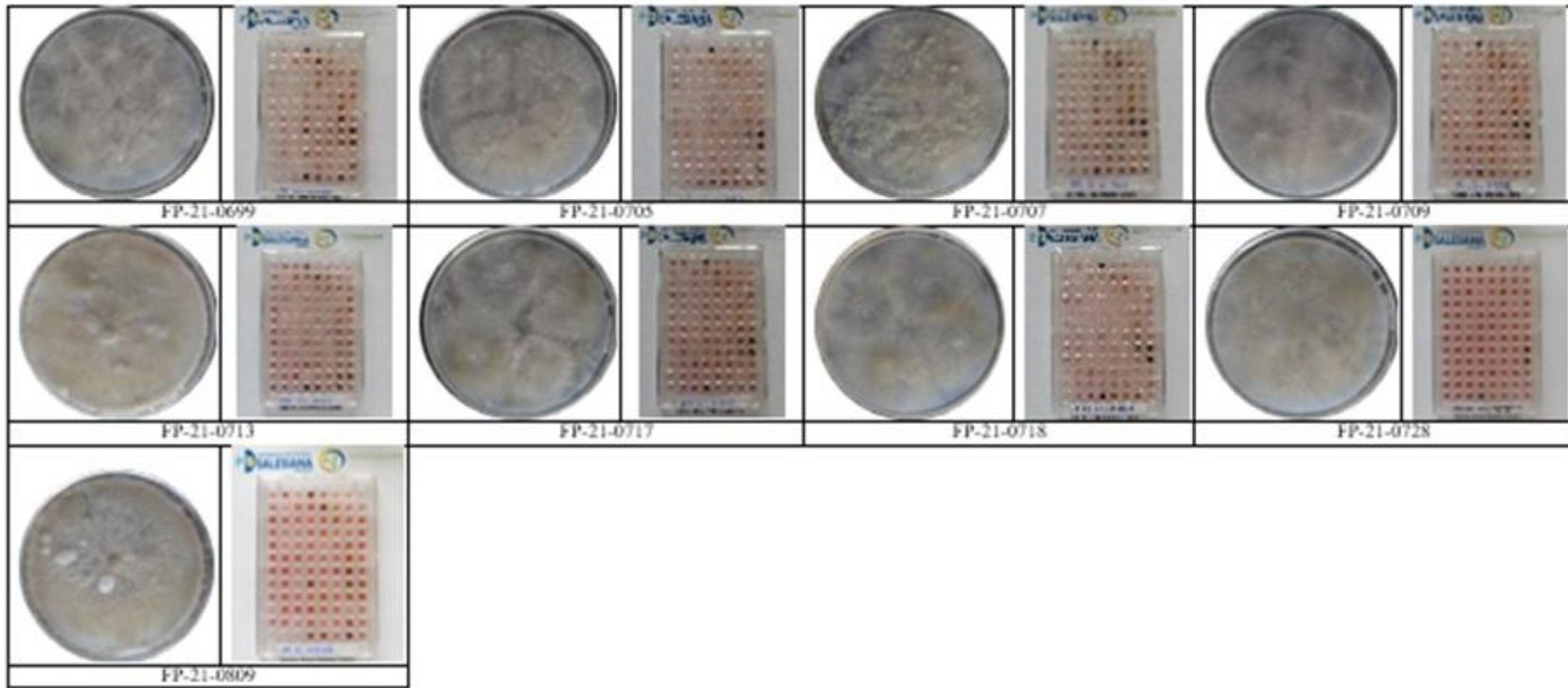


Fuente: (Invitrogen, 2011)

Anexo 13 . Fotografías de los aislados fúngicos (prueba morfológica) y sus perfiles metabólicos correspondientes (prueba bioquímica)







Fuente: (La autora, 2023)

Anexo 14. Características morfológicas desarrolladas por los 33 aislados de *Botrytis* spp.

durante 30 días en medios de cultivos PDA y EMA

Código de muestra	Medio de cultivo (25°C)	Forma de crecimiento (M,Sp,Sc)*				Color/desarrollo	Taza de crecimiento
		7 días	14 días	21 días	>21 días		
FP-14-0540	PDA	Sp	Sp	Sp	Sc	Blanquecino-marrón, micelio denso	Rápido
	EMA	M	Sp	Sp	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-15-0024	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Gris-marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino micelio disperso	Lento
FP-15-1204	PDA	Sp	Sp	Sp	Sc	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-17-1484	PDA	Sp	Sp	Sp	Sc	Marrón, micelio denso	Rápido
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-18-1553	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-20-0115	PDA	Sp	Sp	Sc	Sc	Marrón, micelio denso	Rápido

	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-20-0228	PDA	M	Sp	Sp	Sc	Marrón, micelio disperso	Lento
	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-20-0268	PDA	Sp	Sp	Sp	Sc	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-20-0542	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio denso	Rápido
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Rápido
FP-20-0577	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0003	PDA	Sp	Sc	Sc	Sc	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	Sp	Sp	Gris, micelio disperso	Lento
FP-21-0015	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio denso	Rápido
	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
FP-21-0016	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio denso	Rápido

	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
FP-21-0034	PDA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0101	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Blanquecino-marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0121	PDA	Sp	Sp	Sp	Sc	Gris, micelio disperso	intermedio
	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0327	PDA	M	M	M	M	Gris, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0328	PDA	Sp	Sc	Sc	Sc	Blanquecino-marrón, micelio disperso	Lento
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0378	PDA	M	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio denso	Rápido
	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0379	PDA	M	Sp	Sp	Sc	Marrón, micelio denso	Rápido

	EMA	M	M	M	M	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0614	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Rápido
FP-21-0695	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
FP-21-0697	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0698	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0699	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0705	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0707	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio

	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0709	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0713	PDA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0717	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Gris, micelio disperso	Lento
FP-21-0718	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Gris, micelio disperso	Lento
FP-21-0728	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento
FP-21-0809	PDA	Sp	Sp	Sp	Sp	Marrón, micelio disperso	Intermedio
	EMA	M	M	M	Sp	Blanquecino, micelio disperso	Lento

Fuente: (La autora, 2023); (*) "M" (tipo micelio); "Sp" (tipo esporas) y "Sc" (tipo esclerótico)

Anexo 15. Hoja de resultados del sistema de identificación microbiana BIOLOG

Program: MicroLog 3/5 2.01 35
 Project: ML5
 File Name: Caja 1 Segunda lectura.D5E
 User: Proinstra
 Instrument: MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N: 12090511
 Incubation Hours: 168.00
 Plate Number: 1
 Plate Type: FF
 Strain Type: Filamentous Fungi

Sample ID
 Field 2
 Field 3
 Field 4
 Field 5
 Field 6
 Field 7
 Field 8
 Field 9
 Field 10

Date & Time of Read: Jan 20 2021 8:29 AM
 Biolog ID DB: FF61107.eid

Result: Species ID: Botrytis cinerea Persoon BGA
 Comment:
 Notice:

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	1.000	0.620	5.876	FF	Botrytis cinerea Persoon BGA
2	0.000	0.000	11.573	FF	Botrytis aplada Fresen.
3	0.000	0.000	11.980	FF	Apiospora montagnei Sacc.
4	0.000	0.000	12.498	FF	Emmentella striata (J.N.Rai) Malloch & Cain

Key: <x: positive, x: negative, <x: mismatched positive, x: mismatched negative, (x: borderline, -x: less than A1 well

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0+ < 241 -	41+ < 199 -	62 (103 < 249	[148 < 502	[147 < 747 < 415							
B	40 (132 < 190	45 < 349 (97 < 362	< 220 < 358	[151 62 < 272								
C	(137 26 < 180	(107 [155 51 < 178	< 386 < 379 < 178	< 260 < 394								
D	(139 < 265 < 266	< 258 54 < 333	52 < 265 < 273	(106 < 304 < 247								
E	< 280 < 394	76 (136 < 217 < 389	< 380 [105 < 192 < 373	[143 < 386								
F	< 407 < 178	< 229 [120 [106 75 < 200	73 [117 < 315	< 174 < 375								
G	(137 76 < 593	< 212 < 181 62 < 210	< 409 < 494 < 329	< 232 < 275								
H	(107 [146	(141 < 352	72 < 243	82 [111	[95 78 69 35							

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0+ < 226 -	-317 +< 264 -	-382 < 98	< 222	-221 < 754	< 106 < 496	< 1090					
B	< 336 < 163	< 224 -341 < 1702	-318 < 1507	< 328 < 1232	< 66 -118	< 699						
C	< 101 -403	< 45 < 728	< 146 -315	< 254 < 1842	< 1533 < 782	< 1312 < 830						
D	< 418 < 1109	< 1446 < 1597	-269 < 1893	-245 < 1048	< 1138 < 125	< 1346 < 829						
E	[-45 < 523	-326 < 512	< 1133 < 2211	< 1427	[-75 < 263	< 1037 < 430	< 411					
F	< 832 -88	< 85 -206	-251 -342	(-58 -344	-214 < 262	-86 < 704						
G	-157 (-5 < 694	- [14 < 59	-363 (11 < 598	< 618 < 312	[2 < 117							
H	-174 [-69	(3 < 299	-277 -150	-347 -267	-299 -330	-310 -360						

Report Date: Oct 12 2021 12:55 PM

Fuente: (La autora, 2023)

Anexo 16. Tabla de distribución y datos primarios de las muestras del diagnóstico de
 inmunoensayo

Date 23/12/2021 Test Botólyto cancer
 Test performed by Grace Pallares, Javier Guzman

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	FP-18- 1553	FP-20- 0542	C+	B	B	FP-21- 0695	FP-21- 0705	FP-21- 0717	FP-21- 0809	MC (V)	
B	FP-14- 0540	FP-18- 1553	FP-20- 0542	FP-21- 0016	FP-21- 0101	FP-21- 0379	FP-21- 0695	FP-21- 0705	FP-21- 0717	FP-21- 0809	MC (V)	
C	FP-14- 0540	FP-20- 0115	FP-20- 0577	FP-21- 0016	FP-21- 0101	FP-21- 0379	FP-21- 0697	FP-21- 0707	FP-21- 0718	MC (Ph)		
D	FP-15- 0024	FP-20- 0115	FP-20- 0577	FP-21- 0034	FP-21- 0327	FP-21- 0378	FP-21- 0697	FP-21- 0707	FP-21- 0718	MC (Ph)		
E	FP-15- 0024	FP-20- 0228	FP-20- 0003	FP-21- 0034	FP-21- 0327	FP-21- 0378	FP-21- 0698	FP-21- 0709	FP-21- 0728	MC (A)		
F	FP-15- 1204	FP-20- 0228	FP-21- 0003	FP-21- 0121	FP-21- 0328	FP-21- 0614	FP-21- 0698	FP-21- 0709	FP-21- 0728	MC (A)		
G	FP-15- 1204	FP-20- 0268	FP-21- 0015	FP-21- 0121	FP-21- 0328	FP-21- 0614	FP-21- 0699	FP-21- 0713		MC (A)		
H	C-	FP-20- 0268	FP-21- 0015	C-	B	B	FP-21- 0699	FP-21- 0713		MC (A)		

Software Version 2.01.14

Experiment File Path: D:\Lecturas 2021\BotBo_040122_Grace Pallares.rpt
 Protocol File
 Plate Number Plate 1
 Date 4/1/2022
 Time 3:14:12
 Reader Type: ELx800
 Reader Serial Number: Unknown
 Reading Type Reader

Procedure

Details

Plate Type 96 WELL PLATE
 Read Absorbance
 FullPlate
 Wavelength: 650
 Read Speed: Normal

Results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.536	0.437	0.671	0.714	0.034	0.035	0.441	0.413	0.396	0.642	0.037	650
B	0.679	0.583	0.693	0.511	0.25	0.471	0.463	0.411	0.431	0.763	0.032	650
C	0.612	0.657	0.493	0.494	0.249	0.427	0.41	0.333	0.316	0.037	0.000	650
D	0.62	0.626	0.519	0.568	0.405	0.527	0.496	0.372	0.332	0.039	0.000	650
E	0.586	0.475	0.627	0.544	0.404	0.524	0.389	0.455	0.621	0.037	0.000	650
F	0.603	0.508	0.559	0.38	0.489	0.51	0.389	0.484	0.597	0.035	0.000	650
G	0.573	0.603	0.539	0.477	0.508	0.482	0.634	0.615	0.672	0.036	0.000	650
H	0.035	0.538	0.79	0.032	0.036	0.034	0.652	0.635	0.615	0.036	0.000	650

Fuente: (La autora, 2023) Gen5 Software

Anexo 17. Análisis del proceso de validación

CODIGO	PROB	SIM	ID
REPRODUCIBILIDAD Analista 1			
FP-15-0024	1	0,777	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-20-0115	1	0,772	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-21-0697	1	0,797	<i>B. cinerea</i> Person BGA
REPRODUCIBILIDAD Analista 2			
FP-15-0024	1	0,681	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-20-0115	1	0,797	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-21-0697	1	0,723	<i>B. cinerea</i> Person BGA
REPRODUCIBILIDAD Analista 3			
FP-15-0024	1	0,681	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-20-0115	1	0,693	<i>B. cinerea</i> Person BGA

FP-21-0697	1	1	<i>B. cinerea</i> Person BGA
REPETIBILIDAD (1 día)			
FP-15-0024	1	0,846	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-20-0115	1	0,748	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-21-0697	1	0,621	<i>B. cinerea</i> Person BGA
REPETIBILIDAD (2 día)			
FP-15-0024	1	0,754	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-20-0115	1	0,879	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-21-0697	1	0,885	<i>B. cinerea</i> Person BGA
REPETIBILIDAD (3 día)			
FP-15-0024	1	0,612	<i>B. cinerea</i> Person BGA
FP-20-0115	1	0,612	<i>B. cinerea</i> Person BGA

FP-21-0697	1	0,797	<i>B. cinerea</i> Person BGA
VERACIDAD (Cepa)			
FP-15-0024	1	0,655	<i>B. cinerea</i> Person BGA
	1	0,693	<i>B. cinerea</i> Person BGA
	1	0,797	<i>B. cinerea</i> Person BGA
	1	0,705	<i>B. cinerea</i> Person BGA
	1	0,723	<i>B. cinerea</i> Person BGA

Fuente: (La autora, 2023)

Anexo 18. Diagrama de distribución para la determinación del porcentaje de sensibilidad y especificidad.

		Cepas fúngicas (n=18)		Valores predictivos
		Positivo	Negativo	
Resultado ensayo BIOLOG	Positivo	18	0	100%
	Negativo	0	0	100%
		100%	100%	

Fuente: (La autora, 2023)

Anexo 19. Grado de concordancia en la veracidad

No	Cepa Referencia	Identificación BIOLOG	Interpretación
1	AEC-00022_FP-150024	<i>Botrytis cinerea</i>	100 %
2	AEC-00022_FP-150024	<i>Botrytis cinerea</i>	100 %
3	AEC-00022_FP-150024	<i>Botrytis cinerea</i>	100 %
4	AEC-00022_FP-150024	<i>Botrytis cinerea</i>	100 %
5	AEC-00022_FP-150024	<i>Botrytis cinerea</i>	100 %

Fuente: (La autora, 2023)