

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE
Botrytis cinerea PREDOMINANTES EN *Actinidia deliciosa* DE UN HUERTO DE LA
VII REGIÓN

NATALIA MACARENA CAMUS SOTO

SANTIAGO - CHILE

2014

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE
Botrytis cinerea PREDOMINANTES EN *Actinidia deliciosa* DE UN HUERTO DE LA
VII REGIÓN

GENOTYPIC AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Botrytis cinerea*
PREDOMINATE POPULATIONS IN *Actinidia deliciosa* IN AN ORCHARD OF
REGION VII

NATALIA MACARENA CAMUS SOTO

SANTIAGO - CHILE

2014

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE *Botrytis cinerea* PREDOMINANTES EN *Actinidia deliciosa* DE UN HUERTO DE LA VII REGIÓN

Memoria para optar al título profesional de
Ingeniera Agrónoma

NATALIA MACARENA CAMUS SOTO

	Calificaciones
PROFESOR GUÍA Sra. Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, Mg. Cs.	7,0
PROFESORES EVALUADORES Sr. Jaime Auger S. Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph. D.	7,0
Sr. Víctor Escalona C. Ingeniero Agrónomo, Dr.	7,0
COLABORADOR Srta. Cecilia Ramos B. Ingeniero Agrónomo, Mg. Cs.	

Santiago - Chile

2014

“Después de escalar una gran colina, uno se encuentra sólo con que hay muchas más colinas que escalar”

Nelson Mandela.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta etapa, es el momento de agradecer a todos aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a llevar a cabo este hermoso sueño hecho realidad.

En primer lugar, doy gracias a Dios y a mis padres, Teresa y Abel, que en el día a día me han demostrado que no existen imposibles, que todo se puede a través de la fe, amor y esfuerzo perseverante, gracias por creer siempre en mí.

A ti mi amor, Patricio, compañero de aventuras y sueños, que con tu infinita paciencia y amor hacia mí, te hacen una persona fundamental en mi vida y partícipe de este gran logro.

A mi hermanito, a mis sobrinos Yoice y Rodriguito, tíos y primos, a mi gran familia, muchas gracias por la confianza depositada en mí, sólo les puedo decir ... querer es poder.

A mi profesora guía, Sra. Marcela Esterio, reina madre, por su compromiso y apoyo constante entregándome todas las herramientas necesarias que han permitido desarrollarme tanto profesional como personalmente.

A mi profesor evaluador, consejero y tío, Sr. Jaime Auger, quien siempre estuvo dispuesto a guiar y enseñarme cada vez que lo requería.

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno, pero en especial a todos aquellos que supieron escuchar y apoyarme en los momentos que mas difíciles y sé que siempre estarán junto a mí.

A Cecilia, por su infinito, desinteresado y valioso aporte a este trabajo; a mis siempre compañeros del laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular de la Universidad de Chile y también a mis compañeros del CER con quienes he compartido esta última etapa de la vida universitaria.

A todas aquellas personas que siempre han estado conmigo ... a todos, realmente infinitas gracias.

ÍNDICE

ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis.....	6
Objetivo General	6
Objetivos específicos	6
MATERIALES Y MÉTODO	7
Materiales.....	7
Lugar de estudio.....	7
Medios de cultivo.....	7
Reactivos y materiales.....	7
Metodología	8
Colecta de muestras según estadios fenológicos.....	8
Recuperación de aislados de <i>B. cinerea</i>	8
Extracción de ADN	11
Obtención de biomasa.....	11
Verificación del ADN extraído	11
Caracterización genética de los aislados de <i>B. cinerea</i>	11
Caracterización fenotípica de los aislados de <i>B. cinerea</i>	13
Evaluación de la capacidad de virulencia de los aislados de <i>B. cinerea</i> previamente genotipificados.	14
Diseño experimental y análisis estadístico.....	16

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Caracterización genotípica de las poblaciones de <i>B. cinerea</i> predominantes en kiwi	17
Determinación genotípica de los aislados de <i>B. cinerea</i> recuperados desde kiwi	18
Caracterización fenotípica de los aislados de <i>B. cinerea</i> recuperados desde kiwi..	21
Caracterización Morfológica (aspecto miceliar/esclerocial).....	21
Tasa de crecimiento miceliar	22
Niveles de virulencia in vivo	23
Evaluación de virulencia efectuada sobre bayas de uva de mesa	23
Evaluación de virulencia efectuada sobre frutos de kiwi.....	25
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
APÉNDICES.....	34

RESUMEN

Se estudió la dinámica poblacional de *Botrytis cinerea* (*Bc*) en el cultivo del kiwi en Chile, caracterizando genética y fenotípicamente un número representativo de aislados recuperados desde flores y frutos sintomáticos colectados en pre y poscosecha en un huerto del Valle Central. En total se seleccionaron completamente al azar 276 aislados monospóricos, determinándose la correspondencia genotípica mediante PCR-dúplex y el uso de partidores específicos (amplificación de secuencias transponibles *Boty* y *Flipper*). Posteriormente, 10 aislados de cada genotipo identificado se caracterizaron fenotípicamente con respecto a: 1) aspecto morfológico (miceliar/esclerocial), 2) capacidad formadora de esclerocios, 3) nivel de esporulación a 20°C (Agar Malta) y 4) crecimiento miceliar a 15, 20 y 25°C (agar malta); evaluándose además la virulencia de éstos mismos aislados en: a) bayas de vid cv. Thompson Seedless de 16,5° Brix de madurez, inoculadas con y sin herida y mantenidas en incubación a 20°C por 96 horas (n° de bayas = 150/genotipo; 25 por repetición y condición) y b) en frutos de kiwi cv. Hayward (7-8° Brix) inoculados solo con heridas (n° de frutos = 100/genotipo; 25 por repetición), incubados a 20°C y 0°C por 17 y 60 días, respectivamente.

Los resultados obtenidos señalan a *vacuma* como el genotipo predominante en floración (36%) y poscosecha (69.2%); *transposa* se presenta en menor proporción durante floración (20%), aumenta en cosecha (84%), y en poscosecha solo corresponde a un 7,7%. Los aislados tipo *flipper*, se presentaron en una baja a moderada frecuencia en todos los estadios fenológicos o periodos analizados, con excepción de fruto recién formado (24%); finalmente los aislados tipo *boty* solo se recuperaron en una alta proporción durante floración (32%), no detectándose en poscosecha. Estos resultados señalan que la composición de la población de *Bc* en kiwi difiere notoriamente de la descrita en uva de mesa de Chile, en la cual *transposa* predomina en todos los estadios fenológicos, y *vacuma* sólo se presenta en una muy baja proporción y casi exclusivamente en floración.

Fenotípicamente, los aislados se comportaron de manera similar independientemente de la correspondencia genotípica ($p \geq 0,05$). En general, al evaluar la virulencia en bayas de vid a 20°C, los mayores diámetros de lesión en la condición con herida, fueron presentados por los aislados *flipper* ($p < 0,05$), pero sin diferencias con los demás genotipos en la modalidad sin herida ($p > 0,05$). En kiwis incubados a 20°C, aunque no se detectaron diferencias significativas entre aislados *Bc* de los distintos genotipos, *vacuma* fue el más virulento; en cambio a 0°C, los aislados *vacuma* y *boty* fueron más agresivos diferenciándose significativamente de los aislados *transposa* y *flipper* ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos permiten concluir la existencia de una posible asociación entre la composición genotípica de las poblaciones de *Bc* presentes en kiwi y el nivel de daño por pudriciones del patógeno en poscosecha.

Palabras clave: Kiwi, pudrición gris, PCR, genotipos, *vacuma*, *transposa*, *flipper*, *boty*.

ABSTRACT

The population dynamics of *Botrytis cinerea* (*Bc*) on a kiwifruit crop in Chile was studied by genetic and phenotypic characterization of a representative number of isolates from symptomatic flowers and fruits collected at pre- and postharvest in an orchard located in the Central Valley. In total, 279 randomly selected monosporic isolates were used, with the genotypic correspondence being determined by the duplex PCR reaction and the use of specific primers (amplification of transposable sequences *Boty* and *Flipper*). Later, 10 isolates of each identified genotype were phenotypically characterized with respect to: 1) morphological aspect (mycelial/sclerotical); 2) sclerotium-forming ability; 3) sporulation level at 20°C (malt agar); and 4) mycelial growth at 15, 20 and 25°C (malt agar). In addition, the virulence of the same isolates was evaluated in: a) 'Thompson Seedless' grape berries having 16,5°Brix of maturity, inoculated with and without wound and kept under incubation at 20°C for 96 hours (N° of berries = 150/genotype; 25 per replication and condition); and b) 'Hayward' kiwifruits (7-8°Brix) inoculated just with wounds (N° of fruits = 100/genotype; 25 per replication), incubated at 20 and 0°C for 17 and 60 days, respectively.

The results obtained show *vacuma* as the predominant genotype (69.2%); *transposa* occurred in a smaller proportion during bloom (20%), it increased at harvest time (84%), and at postharvest it only reached 7.7%. *Flipper*-type isolates occurred in a low-to-moderate frequency at all the phenological stages or periods analyzed, excepting newly-formed fruit (24%), while *boty*-type isolates were recovered in high proportion only during bloom (32%), not being detected at postharvest. These results indicate that *B. cinerea* population make-up differs markedly from that described in table grapes in Chile where *transposa* prevails at all the phenological stages, and *vacuma* occurs just in a very low proportion and almost exclusively at bloom.

Phenotypically, the isolates behaved similarly irrespective of the genotypic correspondence ($p > 0.05$). When evaluating the virulence, the greatest lesion diameters in wounded grape berries were shown by *flipper* isolates ($p < 0.05$), but with no differences with the other genotypes in the unwounded group ($p > 0.05$). In kiwifruit incubated at 20°C, although no significant differences were detected among *Bc* isolates of the different genotypes, *vacuma* was always the most virulent; conversely, at 0°C *vacuma* and *boty* isolate were more aggressive and differentiated significantly from the *transposa* and *flipper* isolates ($p < 0.05$).

The results obtained suggest the existence of a possible association between the genotypic composition of *Bc* populations occurring in kiwifruit and the level of damage from rots caused by the pathogen at postharvest.

Key words: kiwifruit, grey mould, PCR, genotypes, *vacuma*, *transposa*, *flipper*, *boty*.

INTRODUCCIÓN

El género *Actinidia* se caracteriza por poseer más de 60 especies (Ferguson, 1984), siendo el cultivar *Hayward* de la especie *Actinidia deliciosa* la más cultivada a nivel mundial. En Chile, existen 11.086 hectáreas plantadas con esta especie (ODEPA, 2013), y aproximadamente 137.000 hectáreas a nivel mundial, El 43,5% del total de hectáreas plantadas se encuentran en China, Centro de origen del cultivo (González y Villegas, 2008).

Durante los últimos años, Chile se consolidó como el tercer exportador a nivel mundial de kiwi, con alrededor de 155.000 toneladas exportadas, precedido sólo por Italia y Nueva Zelanda. Los principales destinos del producto nacional son los mercados de Holanda, Italia, España y Estados Unidos (ODEPA, 2012).

La demanda de consumo de kiwi ha aumentado significativamente, sin embargo, la industria del kiwi chileno está atravesando por un periodo complejo, debido a problemas de calidad y condición que manifiesta una proporción de la fruta exportada en destino, lo que genera un alto grado de incertidumbre al momento del arribo a los mercados (Farías, 2009). El problema de calidad del kiwi chileno se relaciona principalmente con falta de madurez, exceso de acidez, ablandamiento y deshidratación al llegar a los mercados (COPEFRUT, 2010). Estos problemas se ven acrecentados como consecuencia del almacenamiento prolongado que ayuda a regular la comercialización de las producciones de kiwis, causando considerables pérdidas debido a problemas por pudrición gris causados principalmente por *Botrytis cinerea* (*Bc*), (Michailides y Morgan, 1996). En Chile, *Bc* es la principal causa de deterioro por pudriciones en poscosecha (90%). La presencia de *Bc*. provoca severos daños, debido a que los frutos se mantienen en almacenamiento durante largos períodos, principalmente en atmósfera controlada, sistema de almacenamiento que permite extender la vida de poscosecha de unas pocas semanas a varios meses (Pinilla *et al.*, 1994).

Botrytis cinerea (Pers.: Fr.), anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) es un patógeno que afecta a diversas especies de importancia agrícola (Baraldi *et al.*, 2002). Es un hongo parásito facultativo que se caracteriza por colonizar heridas y tejidos muertos senescentes de flores, hojas y tallos. La enfermedad causada por *Bc*, es conocida como moho gris o pudrición gris. Las pudriciones causadas por *Bc* en kiwi, ocurren durante el desarrollo y crecimiento de los frutos, y se visualizan preferentemente durante la poscosecha. El hongo invade el fruto a través de la herida peduncular (cicatriz) y continúa creciendo durante el almacenamiento refrigerado de la fruta. Los primeros síntomas de pudrición en la base del pedúnculo se visualizan generalmente luego de 4 a 6 semanas de almacenamiento refrigerado. Además, a partir de pudriciones pedunculares se desarrollan pudriciones secundarias en los frutos adyacentes (Michailides y Elmer, 2000; Brook, 1992). La pulpa del fruto y la zona invadida por el hongo pierde consistencia, y en casos extremos se puede degradar a estado casi líquida (Sommer *et al.*, 1983).

Por su extremada agresividad y por las pérdidas económicas que causa, *Bc.* es un patógeno para el cual se debe elaborar un programa específico de manejo, disponiendo para ello de algunos botryticidas registrados, además de medidas preventivas como el monitoreo constante de las poblaciones del hongo a nivel predial, para su detección temprana (Esterio *et al.*, 2009). Por esto, desde el punto de vista de la planta y del patógeno, es fundamental para desarrollar estrategias racionales de control, disponer del conocimiento de la estructura genética de la población predominante a nivel local. Según estudios realizados por Wurms *et al.* (1999), dependiendo del cultivar de kiwi, el nivel de susceptibilidad a *Bc* variaría según la especie, presentando mayor tolerancia la especie *Actinidia chinensis* Planch cultivar Hort 16A que *A. Deliciosa* cv. *Hayward*, asociándose generalmente la susceptibilidad a la presencia de quitinasas y fenoles en la planta (Wurms, 2004). Estudios genéticos realizados por Baraldi *et al.* (2002), han demostrado que *Bc.* es altamente heterogéneo, sugiriendo la ocurrencia de un cierto grado de recombinación genética, a través de reproducción sexual o por el ciclo parasexual. Gran parte de esta diversidad genética en frutos de kiwi puede ser consecuencia de una mezcla de poblaciones de aislados del hongo de distinta procedencia, ocurrida durante la manipulación de la fruta y el almacenamiento (Baraldi *et al.*, 2002).

De acuerdo a la composición genética, las poblaciones de *B. cinerea* estarían conformadas por al menos dos especies crípticas denominadas *vacuma* y *transposa*, ambas diferenciadas en base a la presencia o no de dos tipos de transposones (Boty y Flipper), encontrándose ambos tipos genéticos de forma simpátrica en la vid y en otros hospederos (Giraud *et al.*, 1997). *Boty* es un retrotransposón tipo gypsy de 6000 pb (Diolez *et al.*, 1995) y *Flipper* corresponde a un elemento de clase II de 1842 pb (Levis *et al.*, (1997). El genotipo *transposa* presentaría las dos secuencias transponibles, y *vacuma* la ausencia de ambas secuencias (Giraud *et al.*, 1997). Posteriormente, Muñoz *et al.* (2002) detectó la existencia de un tercer tipo de aislado denominado “*boty*”, que presentaba solo el transposón Boty, el cual estaría genéticamente más relacionado con el genotipo *vacuma* (Martinez *et al.*, 2003). Si bien, las sub-poblaciones, *transposa* y *vacuma*, son aún reconocidas, estudios recientes indican que *B. cinerea* está compuesta por un complejo de dos especies filogenéticas (Walker *et al.*, 2011; Fournier *et al.*, 2005), denominadas como *Botrytis cinerea* (correspondiente al Grupo II) y *Botrytis pseudocinerea* (correspondiente al Grupo I), constituyendo así un complejo de dos especies crípticas simpátricas presentes en varios hospederos, incluyendo vides (Walker *et al.*, 2011).

Debido a la diversidad genética detectada en poblaciones de *Bc* en Chile (Muñoz *et al.*, 2002) y los altos niveles de variación intraespecífica que ocurre en los mecanismos de patogénesis (Rowe y Kliebenstein, 2007), se genera una variación fenotípica que está ligada al hospedero (Elad *et al.*, 2007). Además, otros estudios realizados señalan que la predominancia de los diferentes genotipos de *Bc* difieren según el estadio fenológico y que existiría cierto grado de especificidad entre las poblaciones de *B. cinerea* y los distintos hospederos e incluso a nivel varietal (Auger *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2002; Giraud *et al.*, 1999; Thompson y Latorre, 1999). En uva de mesa, el genotipo *transposa* es el predominante precosecha, poscosecha y latencia del cultivo (Esterio *et al.*, 2011). También se ha determinado la existencia de niveles de virulencia diferencial según genotipos, detectándose en uva de mesa un mayor grado de virulencia de los aislados *vacuma* y *boty*

(Esterio *et al.*, 2004), mientras que en Francia en hojas de cv. Cabernet sauvignon los aislados del genotipo *vacuma* presentan una menor nivel de virulencia que *transposa* (Giraud *et al.*, 1999).

Por otro lado en un estudio realizado en Chile, por Muñoz *et al.* (2002) indica que los aislados *transposa*, *boty* y *vacuma* recuperados desde frutos de kiwi, son significativamente diferentes de los recuperados desde otros hospederos (vid, arándano y tomate), detectándose al igual que en la vid un predominio de *transposa* sobre *boty* y *vacuma* (42, 29 y 29%, respectivamente). Sin embargo debido al bajo número de aislados analizados (n=14), la predominancia detectada de *transposa* en kiwi puede no ser representativa, además tampoco se pudo analizar si el predominio del genotipo *transposa* estaba o no asociado a un determinado estadio fenológico del cultivo del kiwi. En otro estudio realizado en kiwi (Stylianos *et al.*, 2012) se detectó la existencia de una mayor frecuencia de aislados *vacuma* en fruta mantenida en frío y al inocularlos en brotes durante el periodo de plena floración éstos presentaron una mayor agresividad, lo que sugeriría que las infecciones latentes ocurridas temprano durante la temporada de desarrollo del kiwi son causadas principalmente por aislados de este genotipo. Sin embargo, Michailides y Elmer (2000), señalan que la infección puede producirse durante la cosecha o posterior a ésta, en algunas de las etapas que transcurren hasta que los frutos son embalados. Además, los pocos estudios realizados indican que la infección máxima ocurriría durante el momento de la cosecha, cuando las esporas u otras estructuras de *Bc*, presentes en sépalos o en el pedúnculo penetran directamente en la herida que se produce al separar el fruto de la planta, avanzando lentamente a medida que se producen cambios en la fisiología del fruto con el incremento de la madurez de los mismos (Michailides y Morgan, 1996; Pinilla *et al.*, 1994).

La epidemiología de la enfermedad en el mundo y en Chile, aún no ha sido suficientemente estudiada y se cree que gran parte de la diversidad genética de *B. cinerea* en kiwi se debe a una frecuente mezcla durante la manipulación de la fruta y del almacenamiento de varios aislados procedentes de diferentes campos dentro de un mismo lugar (Michailides y Elmer, 2000).

Hipótesis:

La proporción de los diferentes genotipos en las poblaciones de *Botrytis cinerea* en *Actinidia deliciosa* varía según el estadio fenológico.

Objetivo General:

Caracterizar genotípica y fenotípicamente las poblaciones predominantes de *Botrytis cinerea* en un huerto de kiwi de la VII región.

Objetivos específicos

Caracterizar la composición genotípica de las poblaciones de *Botrytis cinerea* recuperadas desde kiwi durante el desarrollo del cultivo, en un huerto de la VII Región.

Caracterizar fenotípicamente un número representativo de aislados de *Botrytis cinerea* (n=10), de los genotipos recuperados desde flores y frutos de kiwi con respecto a su morfología: aspecto miceliar, capacidad formadora de esclerocios, crecimiento miceliar y nivel de esporulación, y nivel de virulencia sobre frutos de kiwi.

MATERIALES Y MÉTODO

Materiales

Lugar de estudio

Los aislados de *Botrytis cinerea* se recuperaron desde un huerto de kiwi de la variedad *Hayward* ubicado en Camino Rauco s/n Comuna Rauco, Curicó, perteneciente a la Sociedad Agrícola Santa Laura Ltda. El cuartel utilizado en las colectas de muestras se caracterizó por no haber sido sometido previamente a control de fungicida alguno para *Botrytis*.

Los análisis convencionales y moleculares necesarios para la recuperación de aislados y tipificación genotípica de *B. cinerea* se realizaron en los laboratorios de Fitopatología Frutal y Molecular del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

El almacenamiento de los frutos de kiwi durante poscosecha se realizó en la empresa Agrícola Oro Verde S.A., ubicada en Fundo San Antonio del Peral, Camino Alhué, Comuna Las Cabras.

Los frutos de kiwi utilizados para los ensayos de virulencia fueron obtenidos desde el Fundo La Macarena ubicado en la comuna de San Fernando de la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, y almacenados en frío en las dependencias de la Compañía Comercial Greenvic S.A., ubicada en la comuna de Buin, Región Metropolitana.

Medios de cultivo

Los medios de cultivos que se utilizaron para los análisis del estudio fueron:

- Agar-Papa-Dextrosa (APD): siembra de flores, sépalos, pedúnculo y sector distal.
- Agar-Malta-Levadura (AML): reactivación e incremento de aislados.
- Agar-Malta (AM): para la obtención de aislados monospóricos.
- Medio líquido a base de glucosa (10 g glucosa 1L⁻¹): obtención de biomasa de los aislados para la extracción de ADN.

Reactivos y Materiales

Los reactivos y materiales que se utilizaron durante el transcurso de esta investigación correspondieron a los que normalmente se emplean en los procesos de recuperación, aislamiento y cultivo de aislados, obtención de biomasa y extracción de ADN,

amplificación de transposones mediante PCR y visualización de los resultados de electroforesis en gel de agarosa.

Partidores: Los partidores utilizados en la reacción de PCR-dúplex fueron LTR98 y LTR728 para la amplificación del transposón *Boty*, y para la amplificación del transposón *Flipper* se utilizaron los partidores F14 y F304 (Cuadro 2), utilizándose 0,4 µL de cada partidor, según Muñoz *et al.* (2002).

Metodología

Colecta de muestras según estadios fenológicos

De acuerdo al estadio fenológico (Cuadro 1), se procedió a coleccionar un total de 100 muestras (flores o frutos) desde el mismo cuartel sin aplicaciones de fungicidas. Los estadios fenológicos que se evaluaron fueron: floración, precosecha y poscosecha (Figura 1). En precosecha se realizaron 2 fechas de colecta de muestras, realizándose el primer muestreo en fruto recién formado y el segundo en frutos con madurez de cosecha, y finalmente, en poscosecha, los periodos de almacenamiento, correspondieron a 30, 60, 90 y 120 días, considerándose 4 repeticiones por periodo de tiempo almacenado. Por cada repetición se consideraron 15 frutos de calibre igual a 30, almacenados a 0°C por 30, 60 y 90 días en atmósfera regular y luego hasta 120 días en régimen de atmósfera controlada (5% CO₂ y 2% O₂).

Recuperación de aislados de *B. cinerea*

Los aislados utilizados en este estudio se recuperaron a partir de flores, sépalos, parte peduncular y/o sector distal de frutos colocados en placas de Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) y de frutos mantenidos a 0°C en poscosecha (Figura 1). La recuperación de aislados a partir de sépalos y pedúnculo se realizó según el protocolo utilizado por Michailides y Elmer (2000) y la evaluación de *Botrytis* consistió en coleccionar 100 flores y/o frutos de kiwi, disponiéndose inicialmente sobre el medio las flores Figura 1 (a) y en precosecha los sépalos y parte distal de los mismos.

En precosecha se dispusieron cinco sépalos perimetralmente y el pedúnculo en el centro de cada placa de Petri con PDA más ácido láctico al 2% (Figura 1 h) según el protocolo utilizado por Michailides y Elmer (2000) y otra placa distinta con el sector distal del mismo fruto (Figura 1 - g y h), en igual condición. Las placas fueron mantenidas a una temperatura constante de 20°C. Las evaluaciones de las flores se realizaron al 6° y 10° y en el caso de sépalos y sector distal, al 3° y 10° día pos-siembra. Posteriormente, se procedió a recuperar un máximo de 50 aislados de *B. cinerea* en floración y en precosecha. En fruto recién formado como en frutos cercanos a cosecha se recuperaron un total de 100 aislados por periodo, es decir, 50 aislados para sector distal y 50 aislados para sépalos-pedúnculo.

Para determinar el nivel de pudrición en poscosecha, se procedió a embalar 15 frutos de kiwi en cajas de 3,2 kg cada una, con 4 repeticiones por periodo de almacenamiento. Las

cajas se mantuvieron en atmósfera regular durante 30, 60 y 90 días y a 120 días se mantuvo en cámara con atmósfera controlada debido al mayor tiempo de almacenaje, en ambos casos se utilizaron catalizadores de etileno que permiten conservar la fruta por más tiempo. La recuperación de los aislados, se realizó inmediatamente a salida de frío (día 0) y luego de 7, 14 y 21 días de permanecer a temperatura ambiente, obteniéndose en total 26 aislados en este periodo.

Cuadro 1. Época de muestreo según estadio fenológico del kiwi.

ESTADO FENOLÓGICO		MUESTREO / EVALUACIÓN	NÚMERO DE MUESTRAS COLECTADAS	NÚMERO DE AISLADOS RESCATADOS
Floración	-	X (4ª semana Noviembre)	100 flores	50
Precosecha	Fruto recién formado	X (2ª semana Enero)	100 frutos	50 (sector distal) 50 (sector peduncular)
	Fruto con madurez de cosecha	X (2ª semana Abril)	100 frutos	50 (sector distal) 50 (sector peduncular)
Cosecha	3ª semana Abril			
Poscosecha	30 días de atmósfera regular	X (Mayo)	60 frutos	TOTAL 240 frutos
	60 días de atmósfera regular	X (Junio)	60 frutos	
	90 días de atmósfera regular	X (Julio)	60 frutos	
	120 días de atmósfera controlada	X (Agosto)	60 frutos	
				26

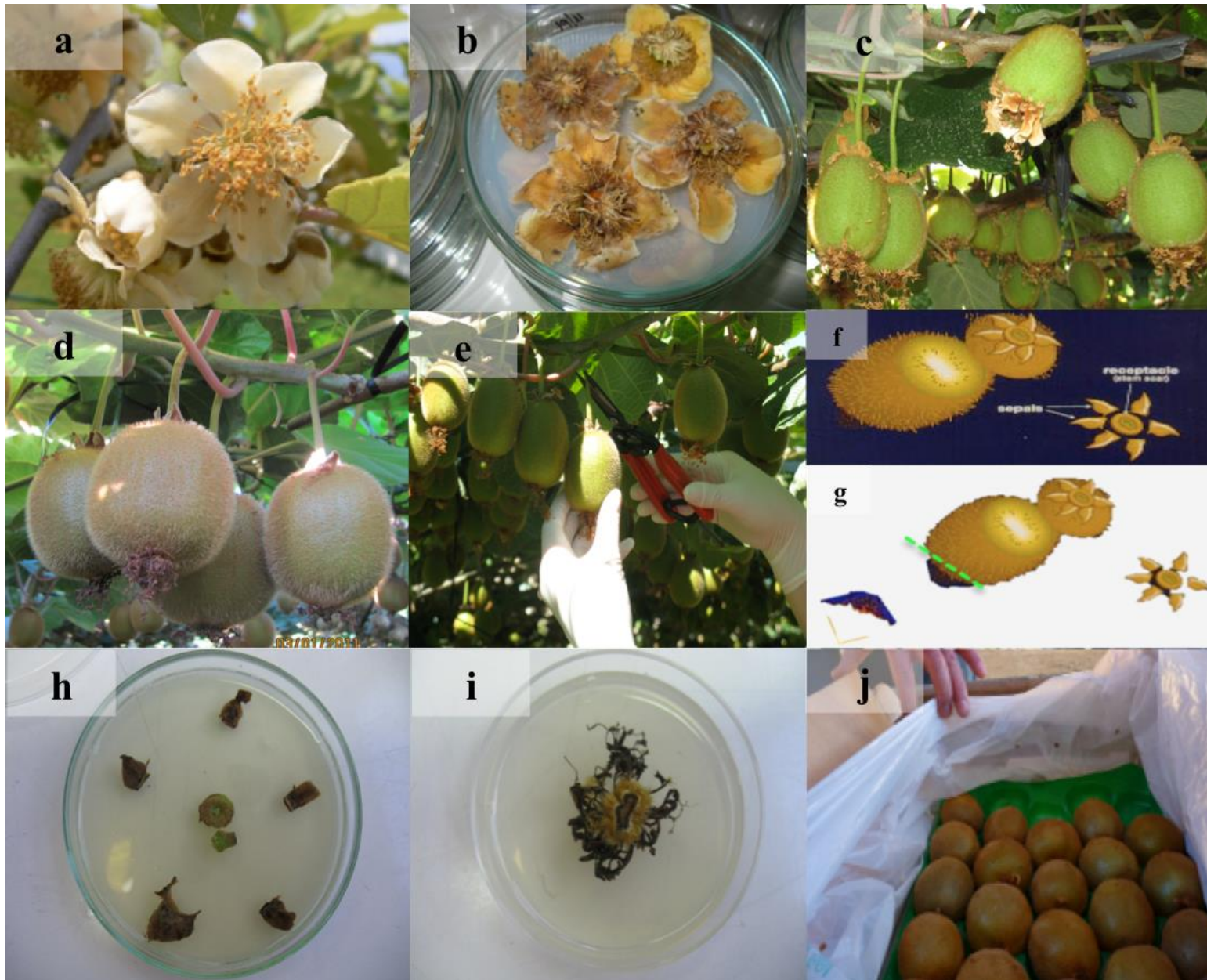


Figura 1. Los aislados se recuperaron durante el periodo de floración (a) las flores se dispusieron en placas (b), en fruto recién formado (c), fruto cercano a cosecha (d). En frutos (e) se cortó la sección peduncular (f) según Michailides y Elmer, 2000 y que fue modificado en este ensayo sacando además el sector distal (g) y ambas secciones se disponen en placas Petri (h y i) y durante cosecha (j) los frutos fueron embalados y mantenidos por diferentes periodos a 0°C.

El total de aislados recuperados, durante los distintos periodos evaluados, fueron incrementados en medio AML con el fin de obtener mayor esporulación y posteriormente llevados a cultivos monospóricos, los cuales fueron respaldados y mantenidos a 4°C en tubos eppendorf de 2 ml con glicerol al 20%.

Extracción de ADN

Obtención de biomasa

Con este propósito se cultivó micelio de los aislados recuperados de *Bc* en un medio líquido a base de glucosa, obteniéndose una capa superficial de crecimiento miceliar, luego de 4 a 9 días de incubación a una temperatura constante de 20°C. Esta biomasa se lavó con agua destilada y estéril y posteriormente fue secada con papel absorbente estéril y mantenida en un tubo eppendorf de 1,5 mL, sellado con una cubierta de parafilm, el cual es perforado previamente a la liofilización con un asa estéril. El material preparado se congeló durante 24 horas a una temperatura de - 80°C, para finalmente ser liofilizado.

La obtención de ADN se realizó utilizando el protocolo de obtención de ADN genómico de hongos filamentosos descrito inicialmente por Bainbridge *et al.* (1990) y posteriormente modificado por Muñoz *et al.* (2002).

Verificación del ADN extraído

Para verificar la integridad del ADN del hongo se realizó un PCR específico, en donde se utilizó para la amplificación del gen constitutivo actina mediante los partidores (5'-ATCCAAACCGCCAGTCAATC-3' y 3' AAGCTTCTGGAGCACGGAAA-5'; *Botrytis fuckeliana* actA gene for actin; GenBank reference number: AJ000335.1), la cual al tener una transcripción y traducción constante en la célula, permite utilizarla como referencia (Ng y Abelson, 1980) y luego una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, utilizando Syber Green (10 µL por cada 100 mL de buffer TE). Para cada aislado se preparó una mezcla compuesta por 1 µL de ADN del hongo, 10 µL de Go taq, Actina reverse 0,5 µL, Actina forward 0,5 µL y 8 µL de agua ultra pura.

Caracterización genética de los aislados de *B. cinerea*

Determinación de los elementos transponibles Boty y Flipper: Se realizó mediante la técnica de PCR-dúplex utilizando la biomasa liofilizada anteriormente descrita, determinándose la presencia o ausencia de los transposones Boty y Flipper, en donde se utilizaron los partidores que se describen en el Cuadro 2 (Muñoz *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Secuencia nucleotídica de los partidores que se utilizaron en las reacciones de PCR-dúplex para la detección de genotipos de *Botrytis cinerea*.

Partidor	Secuencia Nucleotídica (5' – 3')
F 14*	GCACAAAACCTACAGAAGA
F 304*	ATTCGTTTCTTGACTGTA
LTR 98**	AGCCTGTAGAATCACCAACG
LTR 728**	CGGTATTTCTGGTTGGCA

(*: Levis *et al.*, 1997 ; **: Diolez *et al.*, 1995).

Los partidores LTR98 y LTR728 amplifican un total de 648 pb, mientras que los partidores F14 y F304 amplifican un producto de 1250 pb.

La mezcla de PCR-dúplex utilizada correspondió a la descrita por Muñoz *et al.* (2002), modificada por el mismo autor posteriormente (un volumen final de 20 µL por muestra, la que incluyó: 2 µL de Buffer PCR 10X; 0,5 µL de 10 mM dNTPs; 0,4 µL de 5 µM de los partidores F14, F304, LTR 98 y LTR 728; 1,2 µL de 50 mM MgCl₂; 1 µL de 5 ng de ADN; 0,2 µL de 5 U/µL *Taq* ADN polimerasa, completándose el volumen restante de cada muestra con agua ultra pura grado biología molecular).

Una vez preparadas las respectivas mezclas de reacciones de PCR de los 276 aislados de *B. cinerea* analizados, éstas fueron dispuestas en un termociclador, bajo el programa de amplificación indicado en Cuadro 3 (Muñoz *et al.*, 2002). Por cada muestra se realizó una reacción de PCR-dúplex la que permitió detectar en un solo paso ambos elementos transponibles.

Cuadro 3. Programa de termociclador utilizado para detectar los elementos transponibles *Boty* y *Flipper* (Muñoz *et al.*, 2002).

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

La verificación de las reacciones de amplificación de los transposones *Boty* y *Flipper* se efectuó en geles de agarosa al 1,5%, utilizándose como carga 20 µL de cada mezcla de reacción amplificada más 4 µL de buffer de carga 6X, considerándose un marcador de peso molecular “ADN ladder” de 100 pb. La electroforesis se realizó por un período de 45 min a 80 volts y 400 mA. Posteriormente los geles fueron dispuestos en un transiluminador de onda corta Vilber Lourmat, para luego ser fotografiados mediante un equipo digital Canon

PowerShot A650 IS, con filtro para luz UV. Finalmente, se procede a la identificación de los genotipos de *B. cinerea* dependiendo de la presencia o ausencia de los elementos transponibles en *vacuma* (Boty⁻/Flipper⁻), *transposa* (Boty⁺/Flipper⁺), *boty* y *flipper*. Cuando se identificaron aislados *vacuma* se realizaron dos reacciones de PCR dúplex, con el objetivo de confirmar los resultados.

Caracterización fenotípica de los aislados de *B. cinerea*

La caracterización fenotípica se realizó sobre un número representativo de aislados que fueron recuperados previamente desde flores y/o frutos de kiwi (n=10) y que correspondieron a las 4 subpoblaciones de *B. cinerea* detectadas *in vitro* (aislados tipo *transposa*, *boty*, *flipper* y *vacuma*). Los parámetros evaluados fueron: aspecto miceliar /esclerocial, capacidad formadora de esclerocios, nivel de esporulación y crecimiento miceliar. Con este propósito, discos con micelio activo de los distintos aislados fungosos fueron dispuestos en placas de Petri que contenían AM y mantenidos en oscuridad continua por un periodo máximo de 20 días a 20°C, según la metodología descrita por Esterio (2005), considerando los criterios de Martínez *et al.* (2003).

El aspecto miceliar, esporulación y capacidad formadora de esclerocios fueron evaluados a 20°C en tres oportunidades (10, 15 y 20 días post-siembra). En la determinación del nivel de esporulación y capacidad formadora de esclerocios se utilizaron las escalas arbitrarias utilizadas por Esterio (2005), considerando los criterios de Martínez *et al.* (2003). (Cuadro 4).

Para establecer el porcentaje de esporulación se dividió imaginariamente la placa en cuatro partes iguales (25% cada una) y se extrapola el porcentaje final por placa. El nivel de esporulación (€) que presentaron los aislados de *B. cinerea* en cada una de las repeticiones, se clasificaron en cuatro categorías que fueron arbitrariamente establecidas (0 a 3), en donde, la categoría 0 correspondió a ausencia total de esporulación, que va en aumento hasta llegar a la categoría 3 que corresponde a una esporulación profusa (mayor al 50% de la superficie de la placa de Petri) (Cuadro 4).

Para evaluar el crecimiento miceliar, las placas fueron sometidas a 3 temperaturas de incubación: 15, 20 y 25°C, considerando 20°C como temperatura óptima para el desarrollo del hongo. Las evaluaciones se efectuaron diariamente y hasta el 5° día post siembra en los aislados mantenidos a 20 y 25 °C y hasta al séptimo día en los aislados incubados a 15 °C, (Martínez *et al.*, 2003). Se consideraron 3 repeticiones por cada aislado de *B. cinerea* y cada repetición correspondió a una placa de Petri. Según el comportamiento presentado en estas evaluaciones los aislados fueron clasificados como miceliares (M) o esclerociales (S) de acuerdo a las categorías o clases morfológicas de la clasificación morfológica utilizada (Cuadro 4).

La evaluación de la capacidad formadora de esclerocios (Cfe) de los aislados previamente genotificados, se realizó utilizando también una escala arbitraria compuesta por 4 niveles (0 a 3), en donde el nivel 0 correspondió a ausencia total de esclerocios en el cultivo y el nivel 3 al valor más alto de producción de esclerocios detectado en este estudio (Cuadro 4).

Cuadro 4. Escalas de evaluación para caracterizar morfológicamente los aislados de *B. cinerea*, según: aspecto miceliar, aspecto esclerocial, capacidad formadora de esclerocios y nivel de esporulación, considerando los criterios de Martínez *et al.* (2003).

Parámetros a Analizar		Escala de Evaluación (Niveles)			
Clasificación Morfológica	Miceliar (M)	M-I	M-II	M-III	M-IV
		Micelio corto	Micelio suelto	Crecimiento en masa	Micelio grueso y lanudo
	Esclerocial (S)	S-I	S-II	S-III	S-IV
		Esclerocios formados en borde de la placa de Petri	Esclerocios grandes dispuestos radialmente en placa de Petri	Esclerocios grandes distribuidos irregularmente en placa de Petri	Esclerocios numerosos y pequeños des-uniformemente distribuidos
Nivel de esporulación (€)*	€-0	€-1	€-2	€-3	
	Ausencia de esporulación (0%)	Esporulación (1-10%)	Esporulación débil (10% < 50%)	Esporulación profunda abundante (> 50%)	
Capacidad formadora de esclerocios (Cfe)*	Cfe-0	Cfe-1	Cfe-2	Cfe-3	
	Ausencia de esclerocios	Escasa producción de esclerocios (1 a 15/placa de Petri)	Moderada producción de esclerocios (15 a 30/paca de Petri)	Alta producción de esclerocios (N°>30/placa de Petri)	

* Niveles arbitrariamente establecidos por Esterio (2005), considerando los criterios de Martínez *et al.* (2003).

Evaluación de la capacidad de virulencia de los aislados de *B. cinerea* previamente genotipificado.

El nivel de virulencia de los aislados fungosos de las cuatro subpoblaciones detectadas (genotipos), se determinó sobre bayas de uva cv. Thompson Seedless y frutos de kiwi cv. Hayward. En ambos ensayos se consideraron 40 aislados seleccionados completamente al azar (10 de cada genotipo) del total de aislados recuperados (n=276).

En uva de mesa, comprendió la inoculación de 1200 bayas con y sin herida previamente esterilizadas con NaOCl al 10% de la solución comercial, secadas y dispuestas en cámaras húmedas estériles. Por cada tipo de aislados (4 genotipos) se consideraron 3 repeticiones y 5 sub-muestras por cada repetición, a temperatura constante de 20°C (Apéndice VIII). El inóculo correspondió a 10 µL de una suspensión conidial, equivalente a 2×10^5 conidias·mL⁻¹ determinada mediante un hemacitómetro, que fue depositada sobre una zona delimitada de la baya. La herida de cada se realizó con una aguja estéril. Como control negativo se consideró la inoculación de agua destilada estéril. Posterior a la inoculación, las bayas fueron mantenidas en incubación a 20°C y oscuridad continua. Las evaluaciones del avance del diámetro de la lesión en la zona inoculada, se realizaron cada 24 horas y por un periodo máximo de 96 horas.

En frutos de kiwi, la determinación de virulencia se efectuó en fruta cosechada con madurez de cosecha (5,5° Brix) y pedúnculo adherido, considerándose 4 repeticiones por tipo de aislado (4 genotipos) y 5 submuestras por repetición. Previo a la inoculación, los frutos fueron esterilizados superficialmente siguiendo el mismo procedimiento descrito en las bayas de uva de mesa, y, luego secados y dispuestos en cámaras húmedas según la metodología utilizada por Stylianos, *et al.* (2012). Es importante también señalar que posterior a la desinfección superficial y previo a la inoculación se procedió a remover con bisturíes esterilizados el pedúnculo de los frutos dejando la zona de abscisión peduncular expuesta al inóculo.

En el caso de los frutos de kiwi, el inóculo correspondió a una alícuota de 50 μL de una suspensión conidial equivalente a 2×10^5 conidias $\cdot \text{mL}^{-1}$ determinada mediante un hemacitómetro, depositando 10 μL en la zona peduncular del fruto de kiwi.

Posterior a la inoculación, la fruta fue mantenida en incubación a 20 y 0°C (Apéndice IX); la evaluación de los frutos mantenidos a 20°C, se efectuó luego de 17 días de incubación, tiempo a partir del cual los frutos comenzaron a perder firmeza. En la fruta mantenida en atmósfera regular a 0°C (Frigorífico Central Frutícola empresa Greenvic S.A.), la evaluación se efectuó 60 días pos-inoculación.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para el análisis estadístico de caracterización molecular de los aislados de *B. cinerea*, se compararon las frecuencias de cada tipo genético con respecto a los estadios, mediante la prueba de Chi – cuadrado (X^2) y en el caso de existencia de dependencia de los factores se determinó el coeficiente de contingencia, utilizando el programa estadístico MINITAB versión 12.0.

Los resultados de la caracterización fenotípica de los aislados fungosos genotipificados se analizaron mediante la Prueba de Chi-cuadrado (X^2) para determinar si hubo grado de asociatividad entre genotipos y pertenencia a una determinada clase morfológica (miceliar o esclerocial), niveles de esporulación y la capacidad formadora de esclerocios que presentaron los aislados seleccionados.

En relación a los niveles de esporulación y de capacidad formadora de esclerocios presentados por los aislados seleccionados desde cada genotipo, los resultados fueron analizados mediante un ANDEVA One –Way y Prueba de Comparación Múltiple de SNK.

En crecimiento miceliar, los datos fueron sometidos a un ANDEVA factorial 4x2 (4 genotipos, 2 temperaturas de incubación).

Para determinar la virulencia de cada aislado se midió el diámetro del crecimiento promedio de la lesión (mm) y los valores obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y luego a una prueba de Comparación múltiple de SNK, en el caso de detectarse diferencias (p-valor <0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los distintos estadios fenológicos o fechas de colecta de material consideradas se recuperaron 276 aislados de *Botrytis cinerea*, que fueron la base del presente estudio, tanto para las pruebas de caracterización genotípica como fenotípica

Caracterización genotípica de las poblaciones de *B. cinerea* predominantes en kiwi

Mediante la amplificación del gen actina (Housekeeping) en la mezcla de PCR original se obtuvo fragmentos de ADN amplificados por PCR correspondientes a bandas de 100 pb (Figura 2). Como se observa en la Figura 2, la muestra del carril 11, no amplificó el producto esperado, lo cual pudo deberse a contaminantes adquiridos durante el proceso de extracción o a la baja integridad del ADN obtenido. Todas las muestras que presentaron este comportamiento fueron descartadas y no consideradas en la caracterización genotípica.



Figura 2. Productos de PCR para la amplificación de gen actina detectados mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%). (-) = Control negativo (H₂O), L= DNA Ladder 100 pb; carril 1 al 37= Cada carril corresponde a un aislado de Bc distinto; carril 11 = no hubo amplificación por lo que este aislado fue descartado.

Determinación genotípica de los aislados de *B. cinerea* recuperados desde kiwi

Mediante la técnica molecular de PCR-dúplex, y el uso de partidores específicos que permiten detectar la presencia de las secuencias transponibles *Boty* y *Flipper* (Figura 3), se determinó que en la población de aislados analizados existían ciertas diferencias respecto de la predominancia de algunos de los tipos genéticos de *Botrytis cinerea* (*transposa*, *vacuma boty* o *flipper*). En floración como en poscosecha, el genotipo predominante fue *vacuma*, con un 36 y 69,2% de predominancia, respectivamente (Figura 4 y Apéndice I).

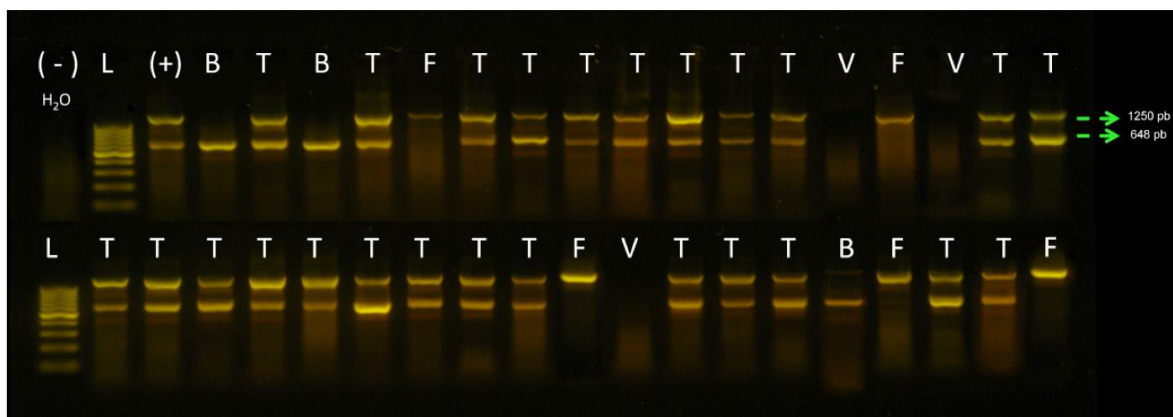


Figura 3. Productos de amplificación por PCR dúplex analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. L= DNA Ladder 100 pb; B= *B. cinerea* tipo *boty*; F= *B. cinerea* tipo *flipper*; T= *B. cinerea* tipo *transposa*; V= *B. cinerea* tipo *vacuma*.

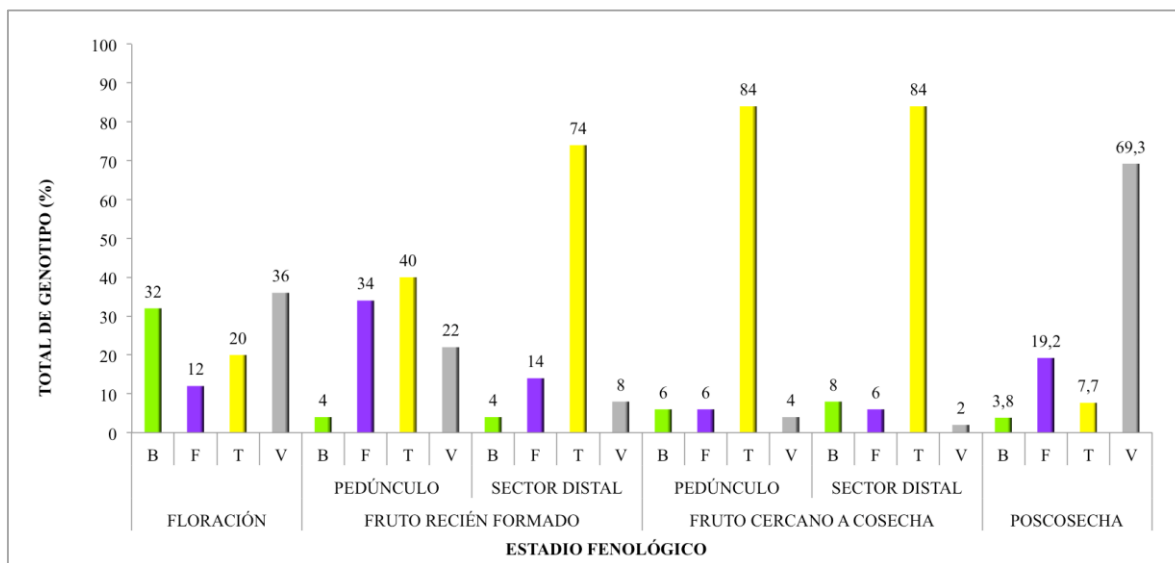


Figura 4. Distribución porcentual de los distintos genotipos de *B. cinerea* recuperados desde *A. Deliciosa* según sección del fruto colectado durante precosecha. B= *B. cinerea* tipo *boty*; F= *B. cinerea* tipo *flipper*; T= *B. cinerea* tipo *transposa*; V= *B. cinerea* tipo *vacuma*.

Como se puede observar en las Figura 4 y 5, la frecuencia del genotipo *vacuma* predominó tanto en floración (36%) como en poscosecha (69,2%). El genotipo *transposa* en cambio, se presentó en menor proporción durante el periodo de floración (20%), se incrementó en fruto cercano a cosecha (84%), pero disminuyó notoriamente en poscosecha (7,7%). El genotipo *flipper* se presentó en una baja a moderada proporción en todos los estadios fenológicos, pero con una mayor frecuencia en fruto recién formado (24%) y los aislados tipo *boty* se recuperaron en una alta proporción sólo en floración (32%), tendiendo a desaparecer en poscosecha.

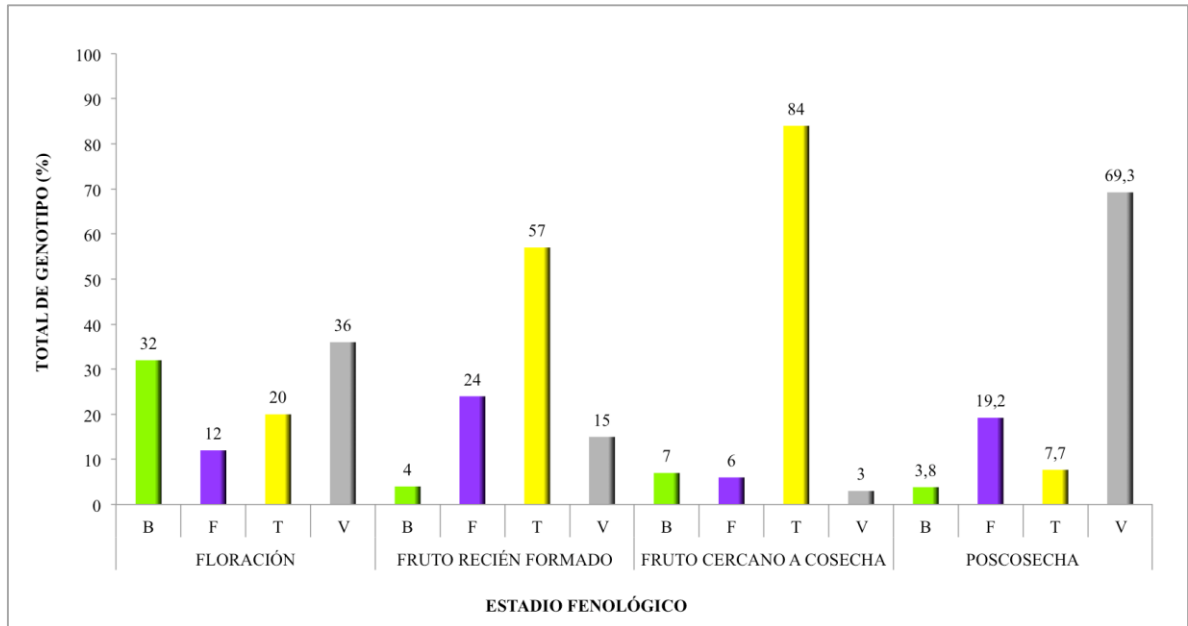


Figura 5. Distribución y genotipificación de aislados *B. cinerea* obtenidos desde *A. Deliciosa* según estadio fenológico. **B**= *B. cinerea* tipo *boty*; **F**= *B. cinerea* tipo *flipper*; **T**= *B. cinerea* tipo *transposa*; **V**= *B. cinerea* tipo *vacuma*.

Si se considera la totalidad de los aislados analizados, independientemente del origen y estadio fenológico desde los cuales fueron colectados, al igual que en uva de mesa (Esterio *et al.*, 2011), en kiwi el genotipo *transposa* sería el predominante (57,2%) (Figura 6), coincidiendo con Muñoz *et al.*, (2002) aunque sólo se analizaron 14 aislados de *B. cinerea* provenientes de kiwi. Sin embargo, al segregar los resultados de correspondencia genotípica según estadio fenológico y origen (tejido) desde el cual fueron recuperados, el genotipo predominante en kiwi, durante los periodos de floración y poscosecha, correspondería a *vacuma* y no a *transposa* (Figura 4), resultados que son avalados por el estudio realizado por Stylianos, *et al.* (2012), en donde los aislados *vacuma* tienen una moderada a alta colonización del sector peduncular del fruto diferenciándose estadísticamente de los aislados *transposa*, lo que indicaría la persistencia y predominancia de los aislados *vacuma* durante floración y poscosecha. Esto último se contrapone con lo detectado en uva de mesa, en donde *transposa* es el predominante en todos los estadios fenológicos y *vacuma* solo se presenta en una muy baja proporción y casi exclusivamente en floración (Esterio *et al.*, 2011).

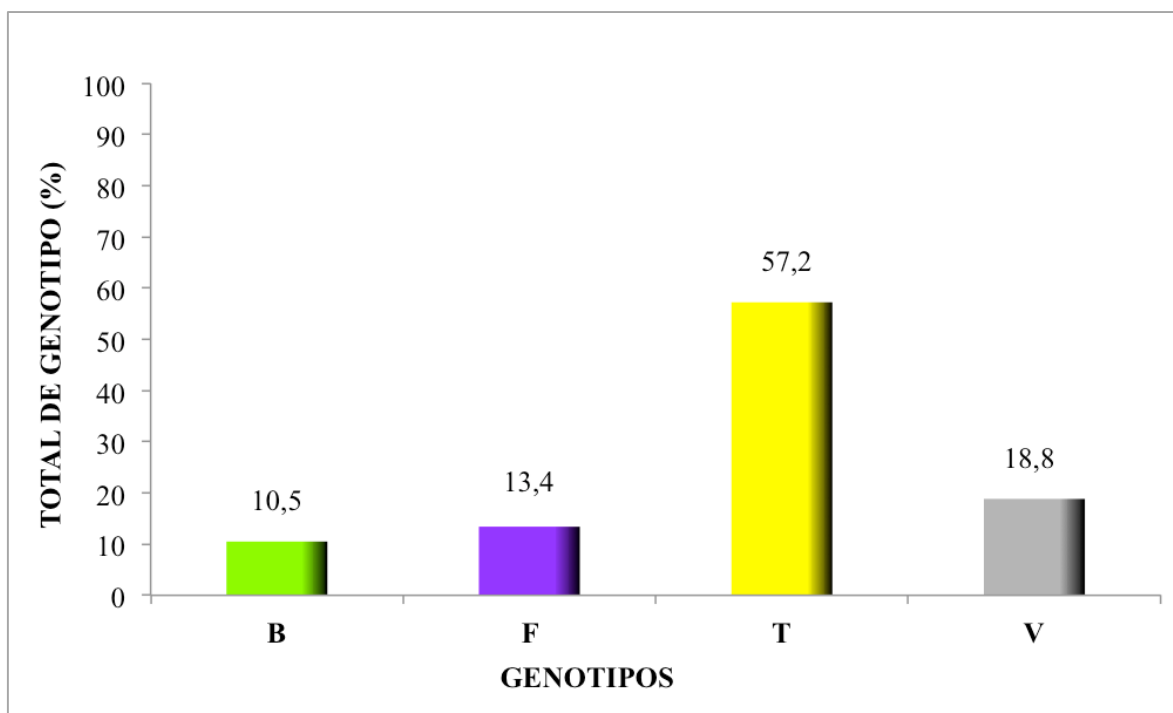


Figura 6. Predominancia de los genotipos durante la temporada 2010/2011 en kiwi.

Otro aspecto importante de señalar es que en kiwi el genotipo *flipper* se presentó en una mayor proporción (13,4%) que en uva de mesa, en donde según el primer reporte de este tipo de aislado no superó al 3,9% de la población analizada en un parral de la localidad de Buin, siendo incluso inferior al 1% en un parral de Nancagua (Esterio *et al.*, 2007) e incluso en varios estudios este genotipo ha estado totalmente ausente (Kretchmer y Hahn, 2008; Ma y Michailides, 2005 y Muñoz *et al.*, 2002). Esta mayor proporción de la presencia del genotipo *flipper* detectada en este estudio, también se ha reportado, en estudios realizados en frutillas (Milicevic *et al.*, 2006), uva (Váczy *et al.*, 2008) y recientemente también en kiwi por Stylianos *et al.* (2012).

Los resultados obtenidos en la Prueba de Chi-cuadrado entre los aislados *Bc* pertenecientes a los distintos genotipos y la sección del fruto de la cual fueron colectados (sector peduncular o distal) fueron ($X^2 = 9,029$, p-valor (P) = 0,029 y coeficiente de contingencia (C) = 0,2, e indicaron que no hubo una asociación entre genotipos y sección colectada del fruto en precosecha (Figura 4).

Sin embargo, al correlacionar el genotipo con el estadio fenológico, los valores de Chi-cuadrado ($X^2 = 132,32$), p-valor = 0.000 (p-valor <0.001) y coeficiente de contingencia (C= 0,56), se pudo observar la existencia de un 65 % de asociación entre la pertenencia a un determinado genotipo y el estadio fenológico desde el cual fueron recuperados. Este resultado estaría indicando que las infecciones presentes durante el periodo de floración y poscosecha estarían directamente correlacionadas o asociadas (Figura 5, Apéndice I).

De acuerdo a estos últimos antecedentes sería posible inferir la existencia de una alta y directa correlación entre el tipo de aislado *Bc* presente en floración y poscosecha, y señalaría que los aislados del genotipo *vacuma* presentes en floración se mantendrían latentes en los frutos de kiwi, reactivándose con la madurez en poscosecha. Resultados similares fueron obtenidos por Stylianos *et al.* (2012) estableciendo que los aislados *vacuma* tienen una mayor capacidad de causar infecciones latentes durante el almacenamiento en frío de la frutos de kiwi. Sin embargo, de acuerdo a la dinámica poblacional de los genotipos de *B. cinerea* determinados en este estudio, en Chile al momento de cosecha predominaría exclusivamente el genotipo *transposa*, difiriendo de los resultados obtenidos por Stylianos, *et al.* (2012) en Grecia. Estos autores señalaron que tanto los aislados *vacuma* y *transposa* tuvieron la misma incidencia durante el periodo de cosecha del kiwi.

Caracterización fenotípica de los aislados de *B. cinerea* recuperados desde kiwi

Caracterización Morfológica (aspecto miceliar/esclerocial): capacidad formadora de esclerocios, nivel de esporulación y tasa de crecimiento miceliar. Los resultados obtenidos en esta caracterización se presentan en detalle en los Apéndices II-VIII.

En la caracterización morfológica, al analizar el comportamiento de los aislados pertenecientes a las 4 subpoblaciones genotípicas detectadas (*transposa*, *boty*, *vacuma* y *flipper*) siguiendo los criterios de clasificación descritos por Martínez *et al.*, (2003). Se determinó que no existía asociación entre pertenencia a un determinado genotipo y categoría miceliar o esclerocial, agrupándose homogéneamente los aislados en las distintas clases de ambas categorías (Miceliar: M- I, II, III y IV; y Esclerocial: S- I, II, III y IV), (Apéndice V).

Al eliminarse las Clase M-III y S-III (Apéndice VII), el comportamiento fue similar. Se detectaron diferencias significativas en la distribución de las clases morfológicas restantes respecto a la condición genotípica de los aislados (p -valor $<0,05$), lo cual indicaría la existencia de un cierto nivel de asociación entre pertenencia a una clase morfológica determinada y correspondencia genotípica, sin embargo el nivel de asociación fue bajo. En aspecto miceliar, el coeficiente de contingencia (C) fue igual a 0,365 (22,4% de asociación), y en la categoría de aspecto esclerocial fue de 0,306 (18,8% de asociación)

Además, tampoco fue posible detectar diferencias con respecto a nivel de esporulación y pertenencia a un determinado genotipo de los aislados de *Bc* obtenidos desde kiwis, presentando en general todos los aislados analizados un nivel de esporulación débil (ϵ -2), ($10\% > \epsilon < 50\%$).

En la capacidad formadora de esclerocios (Cfe), al analizar todas sus clases (Cfe -0, 1, 2 y 3) no se detectó asociación entre estas variables, sin embargo, al omitir la clase correspondiente al nivel 3 (Cfe-3), en el Test de Chi cuadrado se obtuvo un coeficiente de contingencia aproximado a 0,35, lo que indicaría que existe un nivel de asociación pero al igual que en el caso de aspecto miceliar y esclerocial, fue un 21,9%.

En general, la mayoría de los aislados pertenecientes a los distintos genotipos presentó una baja capacidad formadora de esclerocios, destacando los aislados *vacuma* como los de menor capacidad de formar esclerocios (Apéndice VIII). Esta baja o nula capacidad formadora de esclerocios, es muy diferente a lo que ocurre en otros cultivos como frutillas, frambuesas, arándanos y uva (Tanović *et al.*, 2009) en donde los aislados son principalmente esclerocial y escasamente miceliar. No obstante, estos resultados concuerdan con estudios anteriores realizados por Martínez *et al.* (2003), en donde se observó que los aislados de *B. cinerea* que se comportan como miceliares generalmente corresponden a la categoría 0 o como máximo a 1 de la capacidad formadora de esclerocios (Cuadro 4).

Tasa de crecimiento miceliar. El comportamiento de la tasa de crecimiento miceliar (mm) se evaluó diariamente, pero debido a que se observó un crecimiento más sostenido a las tres temperaturas de incubación (15, 20 y 25 °C), en la tercera fecha de evaluación (3er día) se consideró sólo a los resultados obtenidos en esta medición para realizar el ANDEVA simple (Apéndice IV).

Al analizar la tasa de crecimiento miceliar de las 4 subpoblaciones detectadas en kiwi (*boty*, *vacuma*, *transposa* y *flipper*) no se detectaron diferencias significativas entre genotipos (p-valor= 0,517), indicando con esto que no existe interacción entre los genotipos y la tasa de crecimiento miceliar (Apéndice I).

Sin embargo, cuando se compararon las tasas de crecimiento miceliar promedio diarias presentadas por los distintos aislados de *B. cinerea* versus temperatura de incubación de los aislados, se obtuvo un p-valor de 0,000 (p-valor < 0,05), existiendo diferencias de crecimiento miceliar según temperatura de incubación (Apéndice II y III). El mayor crecimiento miceliar se obtuvo a 20°C (53,75 mm), comportamiento esperable, ya que corresponde a la temperatura óptima de crecimiento del patógeno (Jarvis, 1977). En la temperatura evaluada a 25°C aunque con diferencias significativas respecto a 20°C y a 15°C, el crecimiento fue solo levemente inferior (52 mm) a la temperatura óptima. A 15°C, al igual que en estudios efectuados por Esterio (2005), se obtuvo la menor tasa de crecimiento de los aislados de 34,6 mm.

Los resultados son similares a los obtenidos en estudios realizados anteriormente por Esterio (2005) y Mirzaei *et al.* (2009), entre otros, que permiten señalar que la tasa de crecimiento miceliar se ve afectada por la temperatura a la cual es sometido el aislado de *B. cinerea*, independiente del genotipo, siendo 20°C la temperatura óptima de todos los aislados (Jarvis, 1977; Mirzaei *et al.*, 2009).

Niveles de virulencia *in vivo*

- Evaluación de virulencia efectuada sobre bayas de uva de mesa

El ANDEVA simple realizado permitió detectar diferencias significativas entre los genotipos (p -valor $< 0,05$) (Figura 8A). En el ensayo efectuado en bayas considerando la modalidad con herida y mantenidas a 20°C se determinó que la mayor agresividad la presentaron los aislados del genotipo *flipper* (14,5 mm), los que se diferenciaron significativamente de *transposa* y *boty* (Figura 7 a). Le siguieron en orden de agresividad los aislados del genotipo *vacuma* (11,8 mm), pero sin diferencias entre éste y los demás tipos de aislados. Los aislados correspondientes al genotipo *boty* y *transposa* resultaron ser los menos agresivos (10,8 mm y 9,4 mm, de diámetro de las lesión, respectivamente). La mayor agresividad del genotipo *flipper* en las pruebas de virulencia realizadas en bayas de uva de mesa con herida y a la alta frecuencia de este genotipo en el cultivo del kiwi detectado tanto en este estudio, como también por Stylianos *et al.* (2012), se contrapone con la proporción encontrada de este genotipo realizada en otros estudios para cultivos como frambuesas, tomate, uva de mesa y vinífera (Kretchmer y Hahn, 2008; Esterio *et al.*, 2007; Ma y Michailides, 2005; Muñoz *et al.*, 2002).

En el ensayo realizado en bayas de uvas inoculadas sin herida y también mantenidas a 20°C, todos los aislados independientemente de la correspondencia genotípica presentaron una menor agresividad respecto de la obtenida en la condición con herida, presentando un escaso desarrollo de lesiones que fluctúan entre 0,2 y 1 cm, no detectándose diferencias significativas entre genotipos (p -valor $> 0,05$) (Figura 7 b). Esto coincide con los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad realizadas por Stylianos *et al.* (2012) en kiwi, no encontrando diferencias en los niveles de virulencias medidos a través de las tasas de crecimiento miceliar de los aislados *vacuma* y *transposa* mantenidos a 0°C. Según estos resultados se podría inferir que la patogenicidad del genotipo *vacuma* proveniente de kiwi, no tiene una mayor virulencia o agresividad en uva durante la poscosecha.

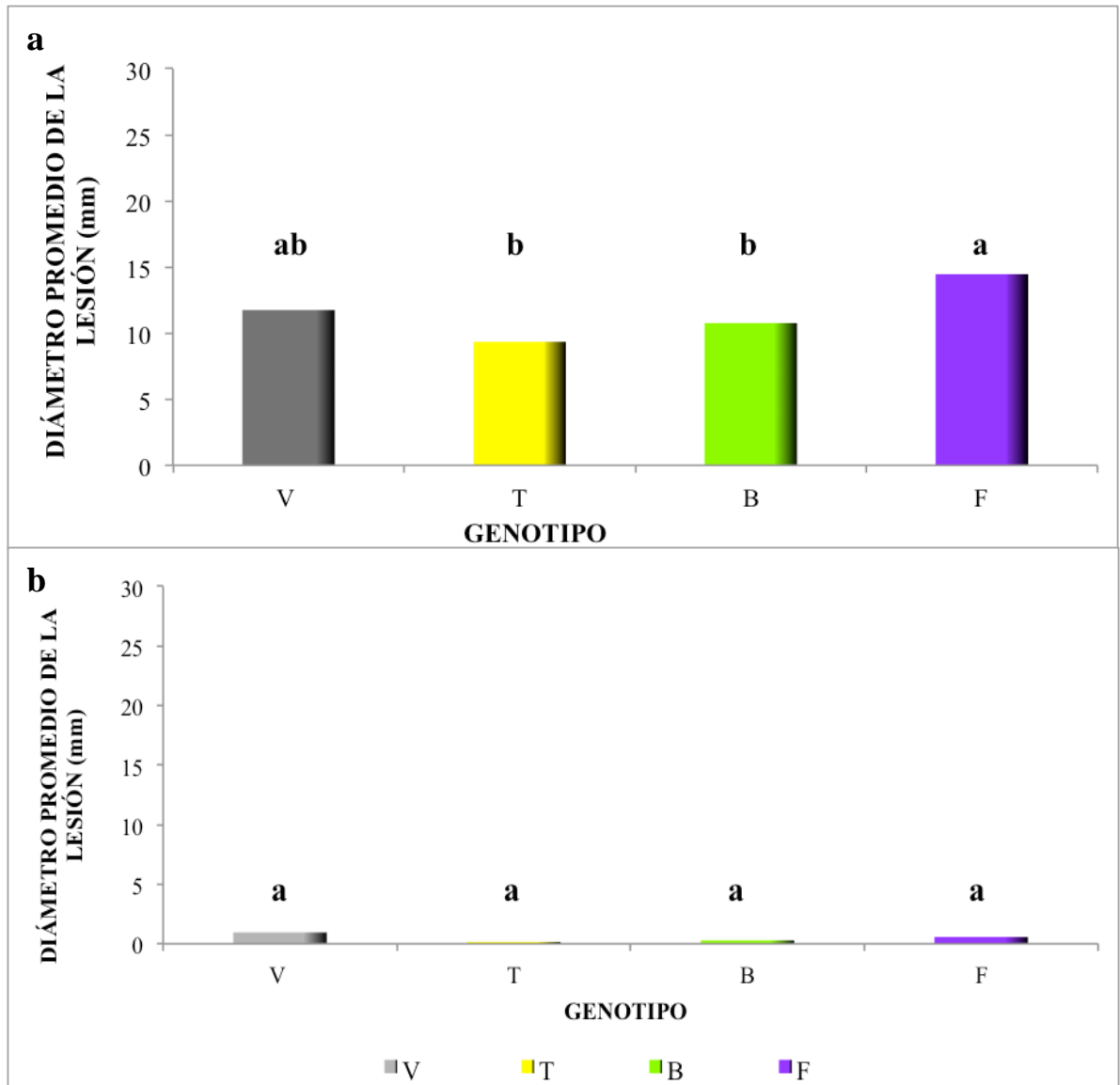


Figura 7. (a) Avance promedio de la lesión, medida en mm, versus los distintos genotipos inoculados en bayas de uva cv. Thompson Seedless, con heridas mantenidas a temperatura ambiente. **(b)** Avance promedio de la lesión, medida en mm, versus los distintos genotipos inoculados en bayas de uva cv. Thompson Seedless, sin heridas mantenidas a temperatura ambiente.

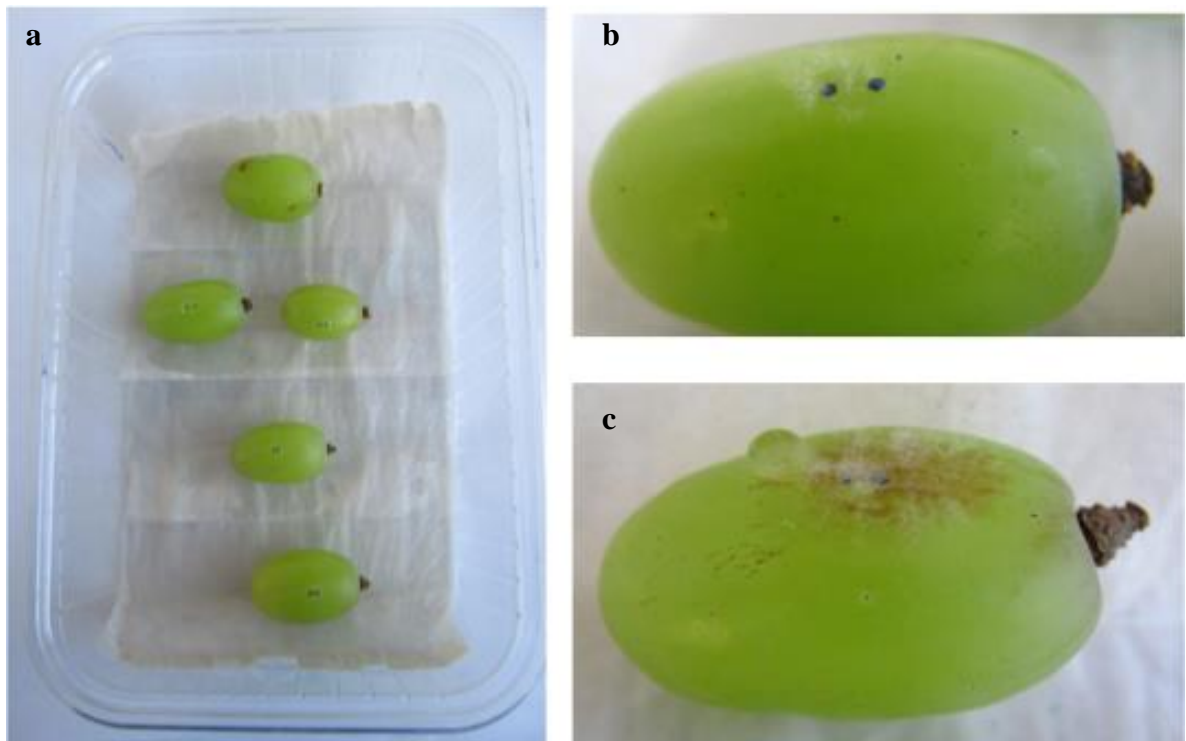


Figura 8. (a) Disposición de las submuestras en cámara húmeda; (b y c) visualización de avance de la lesión a medida que transcurren las horas.

- Evaluación de virulencia efectuada sobre frutos de kiwi

En el ensayo de virulencia realizado en frutos de kiwi inoculados con aislados provenientes del mismo cultivo, a temperatura ambiente de 20°C (Figura 10), (Apéndice IX), se observó una mayor virulencia del genotipo *vacuma*, pero no diferenciándose significativamente de los aislados pertenecientes a los otros tres genotipos, (p-valor > 0,05), (Figura 9 a). En cambio a 0°C (Apéndice X), sí se detectaron diferencias significativas (p-valor < 0,05), siendo los aislados *vacuma* y *boty*, los que predominaron en el estadio de floración del kiwi en Chile (Figura 4). Estos resultados presentaron una virulencia significativamente mayor que los aislados *transposa* y *flipper* (Figura 9 b), contraponiéndose a los resultados obtenidos en este mismo estudio al inocular uva con aislados de *Bc* provenientes de kiwis.

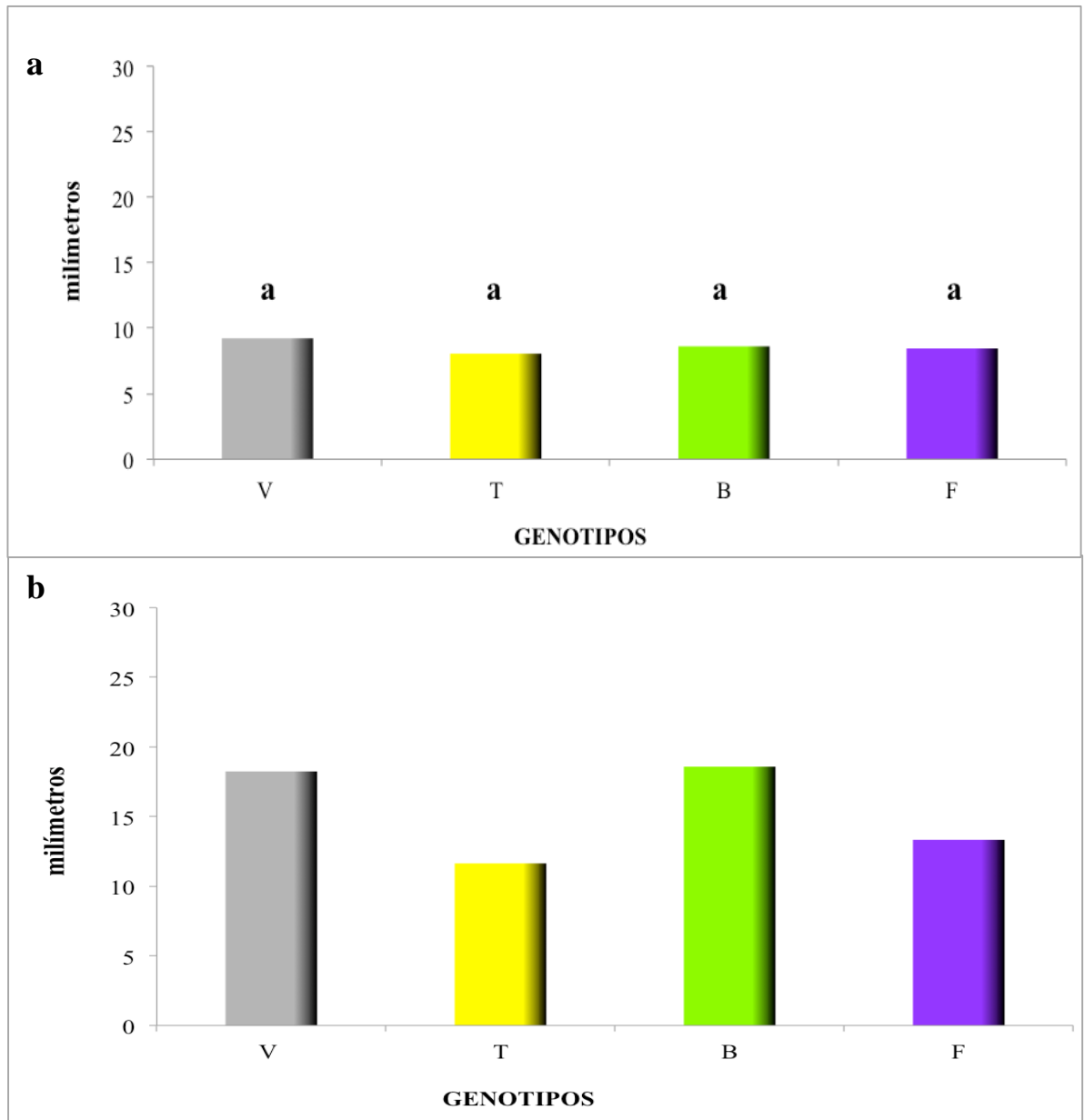


Figura 9. (a) Profundidad promedio de la lesión (mm), en los distintos genotipos inoculados en frutos de kiwi cv. Hayward, previa eliminación del pedúnculo, mantenidos a 20°C. (b) Profundidad promedio de la lesión (mm), en los distintos genotipos inoculados en frutos de kiwi cv. Hayward, previa eliminación del pedúnculo, mantenidos a 0°C de temperatura.

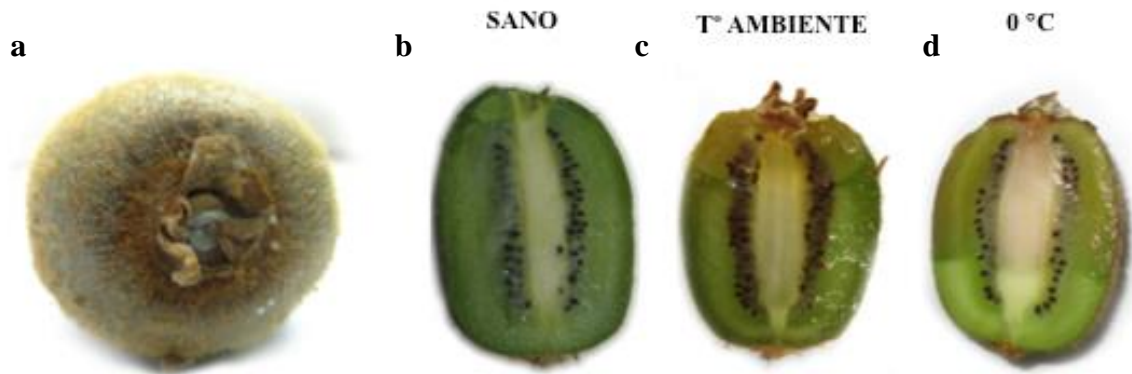


Figura 10. Frutos de kiwi inoculado (a) que se compara un fruto sano (b), con uno inoculado mantenido a temperatura ambiente (c) y otro inoculado mantenido en atmosfera regular a 0°C (d).

Según los resultados ya indicados, la virulencia en aislados de *B. cinerea* proveniente de kiwi presentaría un comportamiento diferencial según genotipo, estableciéndose en éste una directa asociación entre la composición genotípica de las poblaciones de *B. cinerea* y el nivel de daño por pudriciones del patógeno en poscosecha en kiwi. De acuerdo a ello, se puede señalar que la pertenencia a un determinado genotipo del hongo como la predominancia de alguno de éstos en la población en un predio determinado, tendría un efecto directo en el nivel de virulencia del patógeno y por ende, en el nivel de daño asociado a pérdidas por pudriciones causadas por botrytis en poscosecha en el cultivo del kiwi.

En la actualidad, los programas de manejo fitosanitario en kiwi no consideran aplicaciones contra *B. cinerea* a nivel de campo durante floración y sólo algunos productores incorporan aplicaciones en pre y poscosecha. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, para disminuir las pérdidas causadas por este hongo en poscosecha es fundamental realizar aplicaciones dirigidas al periodo de floración y monitoreos constantes de evolución de los genotipos predominantes en el cultivo del kiwi.

En Chile y en el resto del mundo, existen muy pocos antecedentes respecto de la dinámica poblacional de *B. cinerea* en el cultivo del kiwi y estudios del nivel de agresividad de las distintas subpoblaciones (genotipos) detectados de *Botrytis cinerea*. Uno de los pocos estudios realizados por Stylianos *et al.* (2012) muestra que al inocular flores de kiwi con aislados pertenecientes a los genotipos *vacuma* y *transposa* predominó el genotipo *vacuma*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en esta memoria, donde se pudo demostrar que existe una correlación directa entre los periodos de floración y poscosecha, obteniéndose de forma natural la predominancia de los genotipos en campo, a diferencia del estudio realizado por Stylianos *et al.* (2012) en que la fruta fue inoculada *in vitro*.

Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que el conocimiento de la estructura genética de la población de *B. cinerea* en kiwi, es fundamental para desarrollar estrategias de control racionales que incluyan en los programas fitosanitarios, a nivel de campo, aplicaciones de botryticidas durante el periodo de floración, con el objetivo de disminuir las pudriciones de los frutos de kiwi durante la poscosecha.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio, mediante las diferentes metodologías, utilizadas, permiten concluir lo siguiente:

La composición genotípica predominante en las poblaciones de *B. cinerea* presentes en kiwi es diferente en los distintos estadios fenológicos del cultivo, predominando los aislados *vacuma* en floración y poscosecha.

No existen diferencias significativas en aspecto miceliar, capacidad formadora de esclerocios y nivel de esporulación entre los distintos genotipos de *B. cinerea* recuperados desde flores o frutos de kiwi.

La temperatura óptima de crecimiento miceliar de *Botrytis cinerea* fue de 20°C para todos los genotipos.

Sólo se obtuvieron diferencias significativas en kiwis inoculados e incubados a 0°C, siendo los genotipos *vacuma* y *boty* significativamente más virulentos que los genotipos *transposa* y *flipper*.

En uva de mesa inoculada e incubada a 20°C, no se obtuvieron diferencias significativas en bayas inoculadas sin herida, pero sí en bayas inoculadas con heridas, siendo el genotipo *flipper* significativamente más virulento.

BIBLIOGRAFÍA

Auger, J., C. Rodríguez and M. Esterio. 2010. Correlation between the *Botrytis cinerea* population composition and the latent infection in 4 table grape cvs. in Chile. 31 p. In: XVth International *Botrytis* Symposium. Cádiz, Spain. May 31 - June 4, 2010. Cádiz, Spain.

Bainbridge, B., C. Spreadbury, D. Scalise, and J. Cohen. 1990. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 66(1):113 – 118.

Baraldi, E., P. Bertolini, E. Chierici, B. Truffelli and D. Luiselli. 2002. Genetic diversity between *Botrytis cinerea* isolates from unstored and cold stored kiwi fruit. *Journal Phytopathology*. 150(8): 629-635.

Elad Y., B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen. 2007. *Botrytis: Biology Pathology and Control*. Springer. The Netherlands. 412 p.

Brook, P. 1992. *Botrytis* stem-end rot and other storage diseases of kiwifruit. *Acta Horticulturae*. 297(4): 545-550.

Cooperativa Agrícola y Frutícola de Curicó - COPEFRUT. 2010. Comité del kiwi organiza segunda asamblea en Curicó. Disponible en: http://www.copefrut.cl/opensite_det_20100309115301.aspx. Leído el 19 de Agosto de 2010.

Diomez, A., F. Marches, D. Fortini, and Y. Brygoo. 1995. *Boty* a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *B. cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(1): 103-108.

Esterio, M., J. Auger, C. Ramos, G. Cofré, R. Estévez, A. Salinas, G. Muñoz, y R. Saini. 2004. Diversidad genética de poblaciones de *Botrytis cinerea* Pers. sometida a distintas frecuencias de uso de iprodione en tres zonas productoras de uva de mesa en Chile. *Fitopatología*. 39(1):27-28.

Esterio, M. 2005. Caracterización genotípica y fenotípica de la forma esclerocial de *Botrytis cinerea* Pers. en cv. Thompson seedless (*Vitis vinifera* L.) en dos localidades del valle central de Chile. Tesis Mg. Cs. Agr. Pec. Mención Producción Frutícola. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 114 p.

Esterio, M., J. Auger, C. Ramos, M. Araneda, G. Muñoz and M. Rosales. 2007. Molecular characterization of the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from table grapes (*Vitis vinifera* L.) in Chile. 29 p. En: II Reunión de Biología Vegetal. Santiago, Chile. Noviembre 5-6, 2007. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile.

- Esterio, M., J. Auger, C. Ramos, A. Walker, G. Muñoz y S. Fillinger. 2009. *Botrytis* en uva de mesa de exportación: Situación actual de sensibilidad a fungicidas en Chile. ACONEX. 103(1):16-23.
- Esterio, M., G. Muñoz, C. Ramos, G. Cofré, R. Estévez, A. Salinas and J. Auger. 2011. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates present in Thompson Seedless table grapes in Chile. Plant Disease. 95(6):683-690.
- González, R. y O. Villegas. 2008. Análisis comercial del kiwi chileno de exportación. En; II Ciclo de Seminarios Frutícolas de Actualización Técnico Comercial. Santiago, Chile. Octubre 8 y 9, 2008. ASOEX. Santiago, Chile.
- Farías, E. 2009. Expresión de manejos de huertos en la calidad de los kiwis en poscosecha. Revista Frutícola. 2(1): 40-43.
- Ferguson, A. 1984. Kiwifruit: A botanical review. Horticultural Reviews. 6(1):1-64.
- Fournier, E., T. Giraud y Y. Brygoo. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. Mycologia 97(6):1251-1267.
- Giraud, T., D. Fortini, C. Levis, P. Leroux and Y. Brygoo. 1997. RFLP Markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. Molecular Biology and Evolution. 14 (11):1177-1185.
- Giraud, T., D. Fortini, C. Levis, C. Lamarque, P. Leroux, K. Lobuglio and Y. Brygoo. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. Phytopathology. 89 (10):967-973.
- Jarvis W. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity, a guide to the literature. 195 p. Monograph No 15, Canadá Department of Agriculture, Ottawa, Canadá.
- Kretchmer, M. and M. Hahn. 2008. Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. Journal of Plant Diseases and Protection. 115(5):214-219.
- Levis, C., Fortini, D. y Brygoo, Y. 1997. *Flipper*, a mobile *Fot 1*-like transposable element in *Botrytis cinerea*. Molecular General Genetics. 254 (6):674-680.
- Ma, Z., and T. Michailides. 2005. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. Plant Disease. 89 (10):1083-1089.
- Martínez, F., D. Blancard, P. Lecomte, C. Levis, B. Dubos and M. Fermaud. 2003. Phenotypic differences between *vacuma* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology. 109 (5):479-488.

Michailides, T. and D. Morgan. 1996. Using incidence of *Botrytis cinerea* in kiwifruit sepals and receptacles to predict gray mold decay in storage. *Plant Disease*. 80 (3):248-254.
 Michailides, T. and P. Elmer. 2000. *Botrytis* gray mold of kiwifruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. *Plant Disease*. 84 (3): 208-223.

Milicevic, T., S. Topolovec-Pintaric, B. Cvjetkovic, D. Ivic and B. Duralija. 2006. Sympatric populations of *Botrytis cinerea* on strawberries based on the content of transposable elements and their connection with resistance to botryticidas. *Acta Horticulturae*. 708 (9):115-118

Mirzaei, S., E. Mohammadi, M. Shams-Bakhsh, N. Safaie and M. Chaichi. 2009. Genetic and Phenotypic Diversity among *Botrytis cinerea* Isolates in Iran. *Journal of Phytopathology*. 157 (8): 474-482.

Muñoz, G., P. Hinrichsen, Y. Brygoo and T. Giraud. 2002. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research*. 106 (5): 594-601.

Ng, R. and J. Abelson. 1980. Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77 (7): 3912–3916.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – ODEPA. Frutales país: superficie y producción. Período 2002-2013 (en línea). Disponible en: www.odepa.gob.cl/menu/MacroRubros.action;jsessionid=F4EDBAA75359DB33BF7CDD10A06A7A46. Leído el 30 de Julio de 2014.

Pinilla, B., M. Álvarez y M. García. 1994. Pudrición peduncular de post-cosecha causado por *Botrytis cinerea*. *Revista Frutícola*. 15 (2):63-66.

Rowe, H. and D. Kliebenstein. 2007. Elevated genetic variation within virulence-associated *Botrytis cinerea* polygalacturonase loci. *Molecular plant-microbe interactions*. 20 (9): 1126-1137.

Sommer, N., R. Fortlage, and D. Edwards. 1983. Minimizing postharvest diseases of kiwifruit. *California Agriculture*. 37(2):16-18.

Stylianou, S., Veloukas, T., Papavasileiou, A. and Karaoglanidis, G. 2012. Differences in Frequency of Transposable Elements Presence in *Botrytis cinerea* Populations from Several Hosts in Greece. *Plant Disease* 96 (9); 1286-1290.

Tanović, B., G. Delibašić, J. Milivojević and M. Nikolić. 2009. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. *Archives of Biological Sciences*. 61(3): 419-429.

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

Váczy, K., E. Sándor, L. Karaffa, E. Fekete, E. Fekete, M. Árnási, L. Czeglédi, G. Kövics, Druzhinina and C. Kubicek. 2008. Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. *Phytopathology*. 98 (12):1312-1319.

Walker, A-S., A. Gautier, J. Confais, D. Martinho, M. Viaud, P. Le Pêcheur, J. Dupont, y E. Fournier. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101(12):1433-1455.

Wurms, K. 2004. The incidence of *Botrytis cinerea* and expression of putative host defences in green-and golden-fleshed kiwifruit of differing harvest maturity. *New Zealand Plant Protection*. 57(8): 125-129.

Wurms, K., P. Long, K. Sharrock and D. Greenwood. 1999. The potential for resistance to *Botrytis cinerea* by kiwifruit. *Crop Protection*. 18 (7): 427-435.

APÉNDICES

APÉNDICE I. Distribución de los distintos genotipos según estadio fenológico y sector colectado.

ESTADIO FENOLÓGICO	GENOTIPO	NÚMERO DE AISLADOS	% TOTAL DE AISLADOS POR GENOTIPO	
Floración	B	16	32	
	F	6	12	
	T	10	20	
	V	18	36	
Fruto recién formado	B	2	4	
	F	17	34	
	T	20	40	
	V	11	22	
	Sector Distal	B	2	4
		F	7	14
		T	37	74
		V	4	8
Fruto cercano a cosecha	B	3	6	
	F	3	6	
	T	42	84	
	V	2	4	
	Sector Distal	B	4	8
		F	3	6
		T	42	84
		V	1	2
Poscosecha	B	1	4	
	F	5	19	
	T	2	8	
	V	18	69	

APÉNDICE II. Análisis estadístico realizado mediante un ANDEVA simple entre crecimiento versus aislados, en donde no se muestran diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento y los aislados.

ANOVA de un factor: CRECIMIENTO frente AISLADO

Análisis de la varianza para crecimiento

Fuente	DF	SS	MS	F	P
AISLADO	3	219,6	73,2	0,76	0,517
Error	356	34255,6	96,2		
Total	359	34475,1			

Intervalo de confianza simultáneo individual del 95% para la media sobre la base a la desviación estándar agrupada

Nivel	N	Media	D.E.	---+-----+-----+-----+---				
B	90	47,134	9,814	(-----*-----)				
F	90	45,612	10,699	(-----*-----)				
T	90	46,870	9,034	(-----*-----)				
V	90	47,759	9,618	(-----*-----)				
Desviación estándar agrupada =				9,809	44,0	46,0	48,0	50,0

APÉNDICE III. Análisis estadístico realizado mediante un ANDEVA simple entre crecimiento versus aislados a diferentes temperaturas, en donde se muestran diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento y las tres temperaturas a las cuales fueron sometidos.

ANOVA de un factor: CRECIMIENTO frente TEMPERATURA

Análisis de la varianza para crecimiento

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Temperatura	2	26981,5	13490,8	642,71	0,000
Error	357	7493,6	21,0		
Total	359	34475,1			

Intervalo de confianza simultáneo individual del 95% para la media sobre la base a la desviación estándar agrupada

Nivel	N	Media	D.E.	
15	120	34,636	2,559	(-*)
20	120	53,752	6,281	(-*)
25	120	52,143	4,120	(*)

Desviación estándar agrupada = 4,582 36,0 42,0 48,0 54,0

APÉNDICE IV. Como P valor= 0,000 se realizó una prueba de comparaciones múltiples para ver si existen diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento del aislado y la temperatura a la cual fue sometido.

Datos			
Prueba(Snk)			Snk
Alfa (5 o 1 (%))			5
Número de tratamientos			3
Grados Libertad del Error			357
Cuadrado Medio del Error			21
Tratamiento	Promedio	Repeticiones	
T 15 °C	34,636	120	
T 20 °C	53,752	120	
T 25 °C	52,143	120	

Resultados		
Prueba SNK		
Tratamientos	Diferencias Significativas	Transformación
T 15 °C	a	c
T 20 °C	c	a
T 25 °C	b	b

APÉNDICE V. Análisis estadístico realizado mediante prueba de Chi- Cuadrado para analizar aspecto miceliar versus genotipos, en donde se evaluó aspecto miceliar en sus cuatro categorías (M- I, II, III y IV).

Prueba de Chi-Cuadrado (Chi-Sq): V. T. B. F

Conteos esperados se muestran debajo recuentos observados

	V	T	B	F	TOTAL
1	3*	9	4	16	32
	8,00**	8,00	8,00	8,00	
2	15	15	15	8	53
	13,25	13,25	13,25	13,25	
3	0	0	3	0	3
	0,75	0,75	0,75	0,75	
4	12	6	8	6	32
	8,00	8,00	8,00	8,00	
TOTAL	30	30	30	30	120

* = valor esperado

** = valor observado

Chi-Sq = 3,125 + 0,125 + 2,000 + 8,000 + 0,231 + 0,231 + 0,231 + 2,080 + 0,750 + 0,750 + 6,750 + 0,750 + 2,000 + 0,500 + 0,000 + 0,500 = **28,024**

DF = 9

ASPECTO MICELIAR						
NIVELES	CATEGORIAS ASPECTO MICELIAR	GENOTIPO				
		V	T	B	F	
M-I	0	3	9	4	16	
M-II	1	15	15	15	8	
M-III	2	0	0	3	0	
M-IV	3	12	6	8	6	

APÉNDICE VI. Análisis estadístico realizado mediante una prueba de Chi-Cuadrado para analizar aspecto miceliar versus genotipos, en donde se evalúan aspecto miceliar sin considerar la categoría 3 (M-III).

Prueba de Chi-cuadrado: V. T. B. F

Conteos esperados se muestran debajo recuentos observados

	V	T	B	F	TOTAL
1	3*	9	4	16	32
	8,21**	8,21	7,38	8,21	
2	15	15	15	8	53
	13,59	13,59	12,23	13,59	
3	12	6	8	6	32
	8,21	8,21	7,38	8,21	
TOTAL	30	30	27	30	117

* = valor esperado

** = valor observado

Chi-Sq = 3,302 + 0,077 + 1,551 + 7,405 + 0,146 + 0,146 + 0,627 + 2,299 + 1,755 + 0,593 + 0,051 + 0,593 = **18,546**

DF = 6,

P-Valor = 0,005

NIVELES	CATEGORIAS ASPECTO MICELIAR	GENOTIPO			
		V	T	B	F
M-I	0	3	9	4	16
M-II	1	15	15	15	8
M-IV	3	12	6	8	6

$X^2=18,546$ y P valor 0,005 ($P \leq 0.05$) implica que hay interacción entre los parámetros analizados.

$$C = \sqrt{(X^2/X^2+N)}$$

Donde:

χ^2 = Chi cuadrado

N= número de la muestra o tamaño

C= coeficiente de contingencia

$$C = \sqrt{(18,546 / (18,456 + 120))}$$

$$C = 0,3658$$

$$C_{\max} = \sqrt{(h-1/h)}$$

En donde,

C_{\max} = coeficiente de contingencia máximo

h = es el mínimo valor entre las filas y las columnas

$$C_{\max} = \sqrt{(3-1/3)}$$

$$C_{\max} = 1,632$$

APÉNDICE VII. Análisis estadístico realizado mediante una prueba de Chi-Cuadrado para analizar aspecto esclerocial versus genotipos, en donde se evaluó aspecto esclerocial sin categoría 0 y 3 (E- = 0, 1, 2 y 3).

Prueba de Chi- cuadrado (Sq): V. T. B. F

Conteos esperados se muestran debajo recuentos observados

	V	T	B	F	TOTAL
0	27*	21	21	17	86
	21,50**	21,50	21,50	21,50	
1	3	6	9	11	29
	7,25	7,25	7,25	7,25	
3	0	3	0	2	5
	1,25	1,25	1,25	1,25	
TOTAL	30	30	30	30	120

* = valor esperado

** = valor observado

Chi-Sq= 1,407 + 0,012 + 0,012 + 0,942 + 2,491 + 0,216 + 0,422 + 1,940 + 1,250 + 2,450 + 1,250 + 0,450 = **12,841**

DF = 6,

P-Valor = 0,046

NIVELES	CATEGORIAS ASPECTO ESCLEROCIAL	GENOTIPO			
		V	T	B	F
S-I	0	27	21	21	17
S-II	1	3	6	9	11
S-IV	3	0	3	0	2

$X^2=12,841$ y P-valor= 0,046 ($P \leq 0.05$) que hay interacción entre los parámetros analizados.

$$C=\sqrt{(X^2/X^2+N)}$$

Donde:

X^2 = Chi cuadrado

N = número de la muestra o tamaño

C = coeficiente de contingencia

$$C=\sqrt{(12,841/(12,841+120))}$$

$$C=0,3069$$

$$C_{max}=\sqrt{(h-1/h)}$$

En donde,

C_{max} = coeficiente de contingencia máximo

h = es el mínimo valor entre las filas y las columnas

$$C_{max}=\sqrt{(3-1/3)}$$

$$C_{max}=1,632$$

APÉNDICE VIII. Análisis estadístico realizado mediante una prueba de Chi-Cuadrado para analizar la capacidad formadora de esclerocios versus los genotipos, en donde se evaluaron todas las categorías (CFe = 0, 1, 2 y 3), omitiéndose en el análisis solo la categoría 3 debido a que presentaba muchos resultados con ceros.

Prueba de Chi-Cuadrado: V. T. B. F

Conteos esperados se muestran debajo recuentos observados

	V	T	B	F	TOTAL
0	27*	21	21	17	86
	21,50**	21,50	21,50	21,50	
1	3	5	9	12	20
	7,25	7,25	7,25	7,25	
2	0	4	0	1	5
	1,25	1,25	1,25	1,25	
TOTAL	30	30	30	30	120

* = valor esperado

** = valor observado

$$\text{Chi-Sq} = 1,407 + 0,012 + 0,012 + 0,942 + 2,491 + 0,698 + 0,422 + 3,112 + 1,250 + 6,050 + 1,250 + 0,050 = \mathbf{17,696}$$

$$\text{DF} = 6,$$

$$\text{P-Valor} = \mathbf{0,007}$$

NIVELES	CATEGORIAS NIVEL DE ESPORULACION	GENOTIPO			
		V	T	B	F
CFe-0	0	27	21	21	17
CFe-1	1	3	5	9	12
CFe-2	2	0	4	0	1
Cfe-3	3	0	0	0	0

$X^2=17,696$ y P valor= $0,007$ ($P \leq 0.05$) que hay interacción entre los parámetros analizados.

$$C = \sqrt{(X^2/X^2+N)}$$

Donde:

χ^2 = Chi cuadrado

N= número de la muestra o tamaño

C= coeficiente de contingencia

$$C = \sqrt{(17,696/(17,696+120))}$$

$$C = 0,358$$

$$C_{\max} = \sqrt{(h-1/h)}$$

En donde,

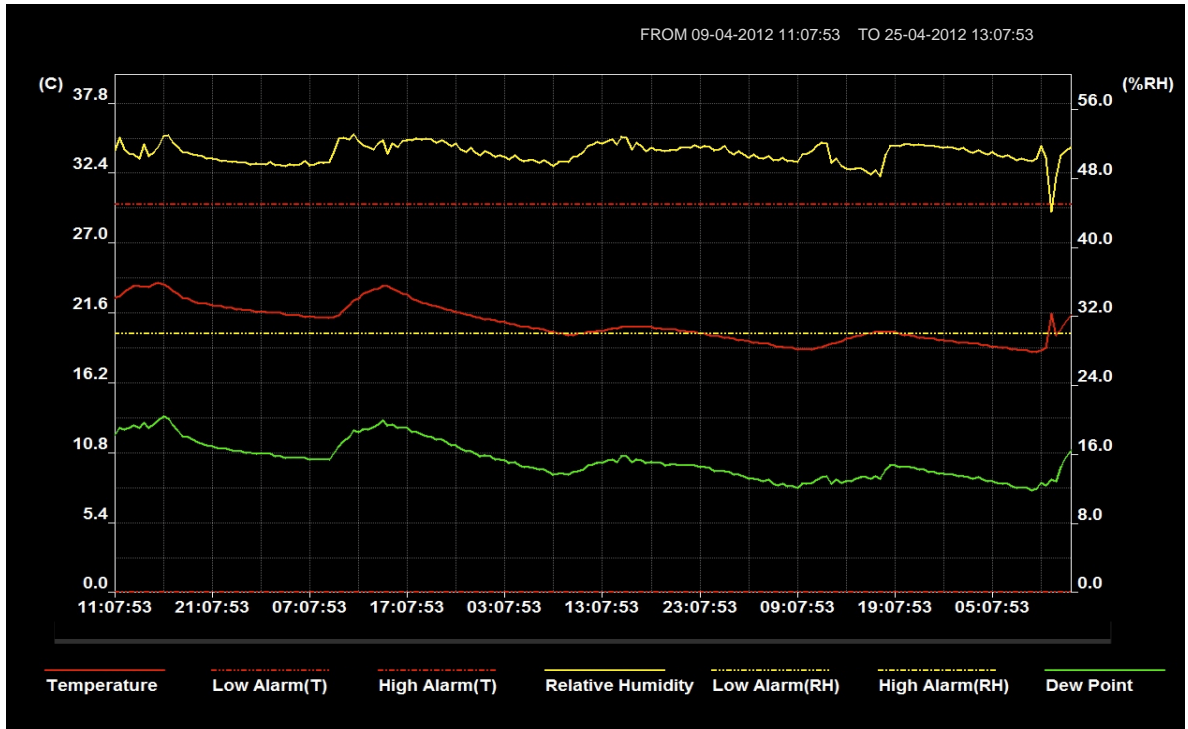
C_{\max} = coeficiente de contingencia máximo

h = es el mínimo valor entre las filas y las columnas

$$C_{\max} = \sqrt{(3-1/3)}$$

$$C_{\max} = 1,632$$

APÉNDICE IX. Gráfico que muestra la fluctuación temperatura y humedad relativa registrada por el hidrotérmetro, en el ensayo de virulencia realizado en frutos de kiwi a temperatura ambiente desde el 09 de abril al 25 de abril del año 2012.



APÉNDICE X. Gráfico que muestra la fluctuación temperatura y humedad relativa registrada por el hidrotérmetro dispuesto en la cámara de frío N° 12, de la empresa Greenvic, en el ensayo de virulencia realizado en frutos de kiwi a 0 ° C desde el 09 de abril al 11 de junio del año 2012.

