

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis cinerea* Pers. DE
DISTINTO NIVEL DE SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS CON EL GEN DE LA
PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (*sgfp*).

HUMBERTO SIMÓN NAVARRETE JELDRES

SANTIAGO – CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis cinerea* Pers. DE
DISTINTO NIVEL DE SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS CON EL GEN DE LA
PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (*sgfp*).

GENETIC TRANSFORMATION OF *Botrytis cinerea* Pers. ISOLATES WITH
DIFFERENT SENSITIVITY LEVEL TO FUNGICIDES WITH GREEN FLUORESCENT
PROTEIN GENE (*sgfp*).

HUMBERTO SIMÓN NAVARRETE JELDRES

SANTIAGO – CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis cinerea* Pers. DE
DISTINTO NIVEL DE SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS CON EL GEN DE LA
PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (*sgfp*).

Memoria para optar al título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

HUMBERTO SIMÓN NAVARRETE JELDRES

PROFESORES GUÍAS:	Calificaciones
Sr. Jaime Auger Saavedra Ingeniero Agrónomo, M. S. Ph. D.	7,0
Sra. Marcela Esterio Grez Ingeniera Agrónoma, Mg. Sc.	7,0
PROFESORES EVALUADORES:	
Sr. Jaime Montealegre A. Ingeniero Agrónomo.	7,0
Sr. Osvaldo Salazar Guerrero Ingeniero Agrónomo, M. S. Ph. D.	6,4

Santiago – Chile

2013

*“Aquellos que dicen que algo no puede hacerse,
suelen ser interrumpidos por otros que lo están haciendo”*

Joel A. Barker.

AGRADECIMIENTOS

Este es el momento para poder expresar mis más profundos y sinceros agradecimientos a todos aquellos quienes me inspiraron y apoyaron durante todo el desarrollo de mi memoria.

En primer lugar quisiera agradecer a mi familia por entregarme todo el apoyo, los sólidos consejos y las amplias enseñanzas que han forjado de a poco los cimientos de quien ahora soy. Mi madre sé que está conmigo, con mi hermana, con mis sobrinas y con mi padre siendo igualmente partícipe de este logro.

A ti, mi pareja Camila, por tu gran afecto, tu honestidad que te hacen una persona fundamental en mi vida. Tu insistencia y apoyo fueron el motor para terminar mi carrera.

A mi segunda familia, mi tío Humberto quien ha abierto su hogar solidaria y desinteresadamente para poder estudiar durante mi vida universitaria. Le agradezco todos los buenos consejos que su experiencia y su asertividad le han entregado.

A mi tía Ana, Eduardo, Sebastián y María, por hacerme parte de su familia, integrándome y haciendo mucho más fácil el hecho de estar lejos de mi hogar.

A mis profesores guía, Sra. Marcela Esterio y el Sr. Jaime Auger por su compromiso y apoyo para mejorar cada día tanto profesional, académica como personalmente.

A la profesora Loreto Cánaves por haber confiado en mí, permitiéndome desarrollar una de las áreas que más disfruto: la enseñanza. Gracias por todo el apoyo académico, laboral y personal durante toda mi vida universitaria.

A mis amigos consejeros bioquímicos Sr. Alan Zamorano, Miguel López y en especial a Ximena González por su gran ayuda teórica y práctica para el desarrollo de esta memoria.

A mis amigos de la vida universitaria, Pablo, Roberto, Ricardo, Fernando por los buenos momentos y cooperación mutua para avanzar juntos en esta carrera.

A mis amigos del laboratorio Charleen, Mauricio, Andrea, Elizabeth, Verónica y en especial a María José, Cecilia e Isabel por sus consejos, su positivismo y apoyo durante todo el tiempo de desarrollo de este trabajo.

Finalmente me gustaría agradecer a todos quienes aportaron con buenas energías, familiares y conocidos, sinceramente, muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis:	6
Objetivo General:	6
Objetivos específicos	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Lugar del estudio.....	7
Material biológico: <i>Botrytis cinerea</i> , Origen y características de los aislados seleccionados.....	7
Obtención de cultivos monoconidiales: Material fúngico inicial.	8
<i>Rhizobium radiobacter</i> , características de la cepa GV3101.	9
Protocolo para la transformación genética de <i>B. cinerea</i> mediado por <i>R.</i> <i>radiobacter</i>	11
Confirmación de la transformación genética de los aislados de <i>B. cinerea</i> con los genes <i>sgfp</i> y <i>hph</i>	12
Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Higromicina para la selección de los aislados transformados de <i>B. cinerea</i>	12
Test de estabilidad mitótica.....	12

Visualización de los hongos mutantes mediante microscopía de epifluorescencia y confocal para verificar la expresión de la proteína.	12
Caracterización genética de los aislados WT y mutantes.	12
Caracterización morfológica de los aislados.....	14
Virulencia en bayas de vid cv. Thompson Seedless.	15
Pruebas de sensibilidad a fungicidas.....	16
RESULTADOS.....	18
Optimización del protocolo de transformación de <i>B. cinerea</i> mediado por <i>R. radiobacter</i>	18
Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Higromicina para la selección de los aislados transformados de <i>B. cinerea</i>	20
Test de estabilidad mitótica.....	20
Visualización de los hongos mutantes mediante microscopía de epifluorescencia y confocal para verificar la expresión de la proteína.	21
Visualización del producto de PCR para la detección del gen de la proteína fluorescente verde (<i>sgfp</i>) en los aislados transformados.....	22
Visualización del producto de PCR para la detección de los transposones boty y flipper.....	24
Caracterización morfológica de los aislados WT y mutantes.	26
Grado de virulencia de los aislados mediante pruebas in vivo realizadas en bayas de vid cv. Thompson Seedless.	30
Pruebas de sensibilidad a fungicidas.....	41
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

Botrytis cinerea Pers., hongo fitopatógeno de más de doscientas especies vegetales, es el causante de la “Pudrición Gris” que es la enfermedad más importante que afecta a la uva de mesa en Chile. El control de esta enfermedad, se basa principalmente en el uso de fungicidas botryticidas. Sin embargo, año a año, se incrementan las poblaciones resistentes a estos productos logrando infectar las estructuras florales, para luego permanecer en estado latente hasta la madurez de la baya, desarrollando, finalmente, pudriciones durante el periodo de pre y poscosecha.

Con objeto de llevar a cabo estudios epidemiológicos en uva de mesa, se marcaron nueve aislados de *Botrytis cinerea* (*Wild-type-WT*), de los cuales tres eran resistentes a fenhexamid (HydR3+, CE₅₀ 9,64 µg/ml) y dos sensibles (HydS, CE₅₀ 0,09 µg/ml), siendo uno de estos últimos del tipo multidroga MDR1; y otros dos eran resistentes a iprodione (Ip+, CE₅₀ 5,48 µg/ml) y dos sensibles a esta molécula (Ip-, CE₅₀ 0,71 µg/ml). Mediante la estandarización del protocolo para la transformación genética con la bacteria *Rhizobium radiobacter* (= *Agrobacterium tumefaciens*) cepa GV3101 con el vector pCAMgfp se logró la transformación de todos los aislados analizados. Los aislados transformados (mutantes) expresaron el gen de la proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein, GFP-*sgfp*) y el de resistencia a higromicina (*hph*) incluso tras pruebas de estabilidad mitótica. Una vez transformados se evaluó el comportamiento morfofisiológico de los aislados mutantes. Para ello, se analizaron los aspectos de conidiogénesis, desarrollo miceliar, formación de esclerocios, nivel de agresividad/virulencia, expresión de la fluorescencia y mantención de las características de resistencia y/o sensibilidad a las moléculas fungicidas evaluadas. El análisis microscópico de la fluorescencia reveló la expresión constitutiva de la proteína y mediante PCR, con partidores específicos, se determinó la presencia del gen *sgfp* en todos los aislados analizados. Se mantuvo la correspondencia genotípica en todos los aislados y hubo escasas variaciones en los aspectos morfológicos y fenotípicos de los mutantes respecto sus WT. Finalmente, ocho aislados mantuvieron las mismas características morfofisiológicas que sus WT por lo que podrían ser empleados en estudios de interacción hongo-hospedero así como epidemiológicos, fundamentalmente en relación al estado de latencia.

Palabras clave: *Transformación, GFP, iprodione, fenhexamid, Botrytis, Agrobacterium, Rhizobium.*

ABSTRACT

Botrytis cinerea Pers., plant pathogen fungus over two hundred plant species, is the causal agent of the "gray mold", which is the most important disease that affects the table grapes in Chile. The control of this disease on grapevine, is mainly based on the use of fungicides botryticidas. Nevertheless, year after year, the resistant populations increase to this products, this will achieve the infection of floral structures, in order to remain in latent status until grape berry ripening, finally developing rots during pre and postharvest.

To accomplish epidemiological studies in grapevines, were marked nine isolates of *Botrytis cinerea* (Wild type-WT), three of them were fenhexamid resistant (HydR3+, EC₅₀ 9,64 µg/ml), two sensitive (HydS, EC₅₀ 0,09 µg/ml), being one of those who was multidrug type MDR1; others two were resistant to iprodione (Ip+, EC₅₀ 5,48 µg/ml) and two sensitive (Ip- EC₅₀ 0,71 µg/ml). By standardizing of the protocol for genetic transformation with the bacterium *Rhizobium radiobacter* (= *Agrobacterium tumefaciens*) strain GV3101 with vector pCAMgfp the transformation of all isolates tested were achieved. The transformed isolates (mutants) expressed the gene for green fluorescent protein (Green Fluorescent Protein, GFP-sgfp) and hygromycin resistance (hph) even after mitotic stability test. Once transformed the morphophysiological behavior of mutant isolates were evaluated. For this, the aspects of conidiogenesis, mycelial growth, the formation of sclerotia, aggressiveness level/virulence, expression and maintenance characteristics of the fluorescence, of resistance and/or sensitivity to molecules fungicides tested were evaluated. Microscopic analysis of fluorescence revealed the constitutive expression of the protein and by PCR with specific primers, the presence of the *sgfp* gene in all isolates tested were determined. Genotypic correspondence in all isolates were maintained and there were few variations in morphological and phenotypic aspects of the mutants compared with their WT. Finally, eight isolates maintained the same morphophysiological characteristics, that their WT, consequently they could be used in studies of fungus-host interaction as well as epidemiological, mainly in relation to latency.

Key words: *Transformation, GFP, iprodione, fenhexamid, Botrytis, Agrobacterium, Rhizobium.*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por el género *Botrytis* son consideradas las más comunes y ampliamente distribuidas en el mundo (Agrios, 2001). Dentro del género, *Botrytis cinerea* Pers., es la especie de mayor importancia ya que es capaz de afectar a más de doscientas especies vegetales entre cultivos frutícolas, hortícolas y ornamentales (Jarvis, 1977; Elad *et al.*, 2007; Staats, 2007 y Williamson *et al.*, 2007).

Según Droby y Lichter (2007), la pudrición causada por *Botrytis cinerea*, también denominada “pudrición gris”, se desarrolla sobre diferentes órganos o estructuras vegetales que comúnmente suelen ser las partes aéreas de la planta, tales como flores, frutos, brotes, yemas y hojas; infectando y produciendo síntomas en campo, o bien, causando pérdidas en poscosecha, durante el almacenamiento en frío y transporte donde puede permanecer el patógeno activo debido a su capacidad de sobrevivir a 0°C (Brooks and Cooley, 1917), por lo cual bajo esas condiciones especies como el kiwi (Michailides, 1996), frambuesa y la uva de mesa, (Williamson *et al.*, 2007) son seriamente dañadas.

Otro importante sector productivo afectado, son los cultivos de plantas en invernaderos y bajo túneles plásticos (Elad *et al.*, 2007; Staats, 2007), en donde se favorece la infección de botrytis por la presencia de alta humedad y los largos períodos bajo esa condición en que permanecen los cultivos. La frutilla y el tomate, son ejemplos representativos de esta situación (West *et al.*, 2000; González *et al.*, 2009).

En viveros de árboles forestales, las plántulas de coníferas son particularmente vulnerables a la pudrición gris. En Chile, los géneros *Eucalyptus* y *Pinus* son atacados principalmente en la porción apical (Butin y Peredo, 1986), constituyendo un serio problema durante las primeras etapas del establecimiento (Mercader *et al.*, 2006).

En resumen, debido a la importancia que reviste este patógeno para tantos sectores productivos, *Botrytis* spp., ha sido investigada por un creciente número de especialistas a nivel mundial (Jarvis, 1977; Coley-Smith *et al.*, 1980; Verhoeff *et al.*, 1992, Elad *et al.*, 2007), quienes buscan desarrollar una estrategia de control lo más certera posible en función de los resultados obtenidos en las diversas investigaciones que se llevan a cabo.

Sin embargo, a pesar de los múltiples estudios realizados y del desarrollo de nuevos productos para su control, *Botrytis cinerea* sigue siendo en la actualidad una enfermedad de gran importancia, sobre todo en aquellos cultivos de alto costo e importantes retornos para el sector exportador chileno, como lo es la uva de mesa. En este cultivo, la pudrición gris es el principal problema fitopatológico desde hace décadas (Pastor, 1980; Auger y Esterio, 1997), y aunque todos los órganos de la vid pueden ser afectados por *Botrytis*, el mayor

daño se produce sobre el racimo en floración, período más favorable para el establecimiento del hongo (McClellan y Hewitt, 1973).

Posteriormente, el grado de infección disminuye como consecuencia de la presencia en las bayas de compuestos antifúngicos tales como ácido glicólico, taninos y fitoalexinas, permaneciendo el hongo sobre los restos florales y en la zona del receptáculo floral hasta la pinta o envero, periodo en el cual la concentración de estas sustancias antifúngicas disminuyen y aumenta el nivel de sólidos solubles en la baya produciéndose una reactivación de la infección latente (Pastor, 1980; Pezet y Pont, 1986; Keller *et al.*, 2003).

El problema de la quiescencia o latencia de *Botrytis*, es que dificulta la correcta estimación de la severidad de la enfermedad en campo debido que epidemiológicamente se desconoce de manera directa y en profundidad todo lo que engloba este proceso en la vid. Mas solo se ha podido determinar de manera indirecta que las infecciones latentes durante la floración son una importante fuente de inóculo para infecciones en cosecha o postcosecha (McClellan y Hewitt, 1973; Pastor, 1980; Nair y Allen, 1993; Holz *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2003).

Por otro lado, a este complejo escenario se suma el desarrollo, por parte de *B. cinerea*, de resistencia a casi todos los fungicidas utilizados para su control debido a la alta variabilidad genética que presenta (Latorre, 2002; Esterio *et al.*, 2007; Fillinger *et al.*, 2008; Kretschmer y Hahn, 2008; Kretschmer *et al.*, 2009; Collinge *et al.*, 2010; Esterio *et al.*, 2011; Topolovec-Pintarić, 2011; Weber, 2011), y al alto número de aplicaciones de fungicidas que se requiere para un control exitoso (Esterio *et al.*, 2007; Myresiotis *et al.*, 2007)

Actualmente, la utilización de marcadores celulares como la luciferasa (de Wet *et al.*, 1987; Gooch *et al.*, 2008), β -glucuronidasa (Jefferson *et al.*, 1987) o GFP (Shimomura, 1979; Prasher *et al.*, 1992) han abierto el campo de los estudios en la interacción planta-patógeno, epidemiología, localización celular de proteínas de interés, etc. En este sentido, la proteína verde fluorescente o GFP (*del inglés: Green Fluorescent Protein*), proveniente de la medusa *Aequorea victoria*, se ha logrado expresar heterológamente en variados organismos fúngicos (Spellig *et al.* 1996; Cormack *et al.* 1997; Fernández-Abalos *et al.* 1998; Maor *et al.* 1998; Du *et al.* 1999; Inglis *et al.* 2000; Balint-Kurti *et al.* 2001; Horowitz *et al.* 2002; Lagopodi *et al.* 2002; Chen y Hsiang, 2003; Aboul-soud *et al.* 2004; Kaufman *et al.* 2004; Visser *et al.* 2004; Eckert *et al.* 2005; Li *et al.* 2006; Grunewaldt-Stöcker *et al.* 2007; Hammer *et al.* 2007; Helber y Requena, 2008; Vallad y Subbarao, 2008; Anco *et al.* 2009; de Silva *et al.* 2009; Riedel *et al.* 2009) demostrando que un aislado de *Botrytis cinerea* con la expresión del gen de la GFP podría ser una herramienta muy útil para el monitoreo de la respuesta del hongo a los cambios dinámicos de sus hospederos frutales y a los potenciales tratamientos biológicos, químicos y físicos durante los períodos de crecimiento y almacenaje (Li *et al.*, 2006).

Para la transferencia e incorporación al organismo fúngico de dicho gen, lo que se conoce como transformación genética (Mullins, 2001), el empleo de la bacteria gram negativa *Rhizobium radiobacter* (= *Agrobacterium tumefaciens*) (Young *et al.* 2001; Young, Pennycook, y Watson, 2006) ha resultado ser una técnica eficiente y rápida para dicho propósito. Esta bacteria naturalmente transforma plantas dicotiledóneas (Tinland *et al.* 1994; de la Riva *et al.* 1998; Li *et al.* 2000; Zupan *et al.* 2000; Tzfira *et al.* 2004), incorporando parte de su propio material genético, sin embargo, gracias a los estudios de biotecnología se ha podido incorporar genes de interés y sobrepasar los limitantes de tan solo los hospederos de la bacteria, hasta incluso células humanas (Kunik *et al.*, 2001).

Las ventajas fundamentales de este método de transformación, consisten en el elevado número de transformantes estables logrados, la inserción generalmente de una sola copia del gen de interés, y la posibilidad de emplear células intactas como material inicial, tales como conidias, micelio vegetativo o cuerpos fructíferos (Michielse *et al.*, 2005).

Finalmente, el empleo de la proteína verde fluorescente como marcador del organismo completo ha permitido observar directamente muchos procesos antes difíciles de dilucidar, (Calero *et al.*, 2008) por lo que, al transformar aislados de *B. cinerea* con distinta sensibilidad a fungicidas del grupo de dicarboximidias, hidroxianilidas y de resistencia a multidroga se podría disponer de una valiosa herramienta para el estudio de las poblaciones del hongo en los procesos epidemiológicos como la latencia y su relación con la fenología de la vid, así como la verificación de la efectividad de los métodos de control fitosanitario establecidos en uva de mesa.

Hipótesis:

Mediante el uso de la bacteria *Rhizobium radiobacter*, portadora del plásmido pCAMgfp, es posible transformar aislados de *Botrytis cinerea* con distinta sensibilidad a fungicidas y otorgarles la capacidad de fluorescer bajo excitación lumínica.

Objetivo General:

Transformar aislados de *Botrytis cinerea* Pers. con distinta sensibilidad a fungicidas, incorporando el gen de la proteína fluorescente verde *sgfp* y de resistencia a higromicina, mediante el uso de la bacteria *Rhizobium radiobacter*.

Objetivos específicos

Transformar genéticamente, mediante *Rhizobium radiobacter*, nueve aislados de *B. cinerea*, tres de ellos resistentes a fenhexamid, dos resistentes a iprodione y dos aislados sensibles a ambas moléculas, una de las cuales presenta resistencia multidroga.

Determinar el efecto de la inserción azarosa del plásmido en el genoma fúngico, caracterizando 5 aislados transformados para cada una de las cepas iniciales, analizando sus variaciones en aspectos morfológicos, genéticos y fenotípicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del estudio

Tanto los estudios experimentales *in vivo*, *in vitro* como los moleculares se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

La transformación bacteriana de *Rhizobium radiobacter*, cepa GV3101, se realizó en el laboratorio de Biología Vegetal Molecular, Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Para el registro fotográfico de los hongos mutantes se emplearon dos tipos de microscopios, uno confocal Carl Zeiss modelo LSM 710, del Laboratorio de Biología Vegetal Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y otro de epifluorescencia marca Alltion modelo L2000A/B, trinocular con fuente de poder externa y lámpara de mercurio como emisor del laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular de la Universidad de Chile.

Material Biológico

***Botrytis cinerea*, Origen y características de los aislados seleccionados.**

Para el proceso de transformación fúngica se seleccionaron nueve aislados de *Botrytis cinerea* pertenecientes al cepario del laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular los que serán considerados del tipo silvestre o WT en el resto del documento presente a modo de diferenciarlos de los hongos obtenidos en la transformación genética. Estos aislados fueron elegidos debido a características fenotípicas referentes a sensibilidad a las principales moléculas fungicidas empleadas para el control del patógeno, tal como se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Nivel de sensibilidad, nomenclatura, fenotipo y procedencia de los aislados de *Botrytis cinerea* empleados en la transformación genética.

Nivel de sensibilidad	Aislado	Fenotipo*	Origen del aislado	Cultivar de vid de mesa
Resistentes a fenhexamid	21FR3+	Hyd R3 ⁺	Región Metropolitana	Crimson Seedless
	ANP2C	Hyd R3 ⁺ ; Ip ⁺	Libertador B. O'Higgins	Thompson Seedless
	A2R3+	Hyd R3 ⁺	Coquimbo	Thompson Seedless
Sensible fenhexamid	47C	HydS	Coquimbo	Thompson Seedless
Sensible a fenhexamid y Resistente a multidrogas	1E	HydS; MDR1	Libertador B. O'Higgins	Thompson Seedless
Resistentes a iprodione	SP8D	Ip ⁺	Región Metropolitana	Thompson Seedless
	33AR	Ip ⁺	Libertador B. O'Higgins	Crimson Seedless
Sensibles a iprodione	67S	Ip ⁻	Libertador B. O'Higgins	Thompson Seedless
	53S	Ip ⁻	Libertador B. O'Higgins	Crimson Seedless

*Hyd R3+: Resistente a fenhexamid; HydS: Sensible a fenhexamid; Ip+: Resistente a iprodione; Ip-: Sensible a iprodione y MDR1: Resistente multidroga tipo 1.

Obtención de cultivos monoconidiales: Material fúngico inicial.

Con tal propósito se reactivaron los aislados seleccionados en medio de cultivo Agar Malta Levadura (AML) (1,5% Agar, 2% Extracto de Malta y 0,2% de Extracto de Levadura), y se dejaron crecer por 5 días a 20±2°C.

De cada uno de estos aislados se realizó una suspensión conidial la cual fue sembrada en una placa de Agar Malta (AM: 1,5% Agar, 2% Extracto de Malta) e incubada por 18 horas a 20±2°C.

Luego del tiempo indicado, se realizó la observación microscópica de las placas incubadas. De ellas se seleccionó una solitaria conidia germinada (cuyo tubo germinativo era mayor a 3 veces su propio tamaño) y se transfirió, finalmente, a una nueva placa Petri con AML, mediante el uso de puntas estériles formadas con pipetas Pasteur (Goh, 1999).

Los nuevos aislados monoconidiales obtenidos fueron respaldados en glicerol al 20% y conservados a -20°C.

***Rhizobium radiobacter*, características de la cepa GV3101.**

Cepa GV3101 pMP90RK (Koncz y Schell, 1986): Empleada habitualmente en la transformación genética de *Arabidopsis thaliana* debido a su rápido crecimiento y alta eficiencia de transformación (Bent, 2006). Es una cepa no tumorigénica. Presenta resistencia al antibiótico Rifampicina, debido a una mutación en el genoma bacteriano, y a Gentamicina debido a una mutación en el plásmido “ayudante”, lo cual permite emplear estas moléculas biocidas para seleccionar y aislar la cepa de otras bacterias ordinarias (Weigel y Glazebrook, 2002).

La cepa GV3101 es sensible a los antibióticos Kanamicina, Cloranfenicol (Wise, Liu y Binns, 2006) y Cefatoxima. Los dos primeros son ideales para seleccionar el vector binario a utilizar, y el tercero, para eliminar la bacteria al finalizar el co-cultivo bacteria-hongo descrito en el protocolo de transformación.

Transformación genética bacteriana: Mediante shock térmico, se le incorporó el vector binario pCAMgfp (Sesma y Osbourn, 2004) el que contiene el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hph*), que le otorga la resistencia a la higromicina B, y el gen de la proteína fluorescente verde *sgfp* (una variante de la *gfp* que contiene una sustitución de serina a treonina en el aminoácido 65, la cual le otorga mayor fluorescencia).

El plásmido pCAMgfp es el resultado del reemplazo del segmento ubicado entre *Xho* I y *Eco* RI, del vector original pCAMBIA1300, acoplada a la región proveniente del plásmido pCT74. El vector le confiere resistencia a kanamicina a la bacteria portadora, por lo que es usado como seleccionador. El gen *sgfp* está bajo el control del promotor ToxA de *Pyrenophora tritici-repentis*, lo cual le permite un alto nivel de expresión constitutiva en hongos filamentosos (Lorang, 2001). El gen de la resistencia a higromicina se encuentra bajo el control del promotor constitutivo TrpC de *Aspergillus nidulans* (Fig.1).

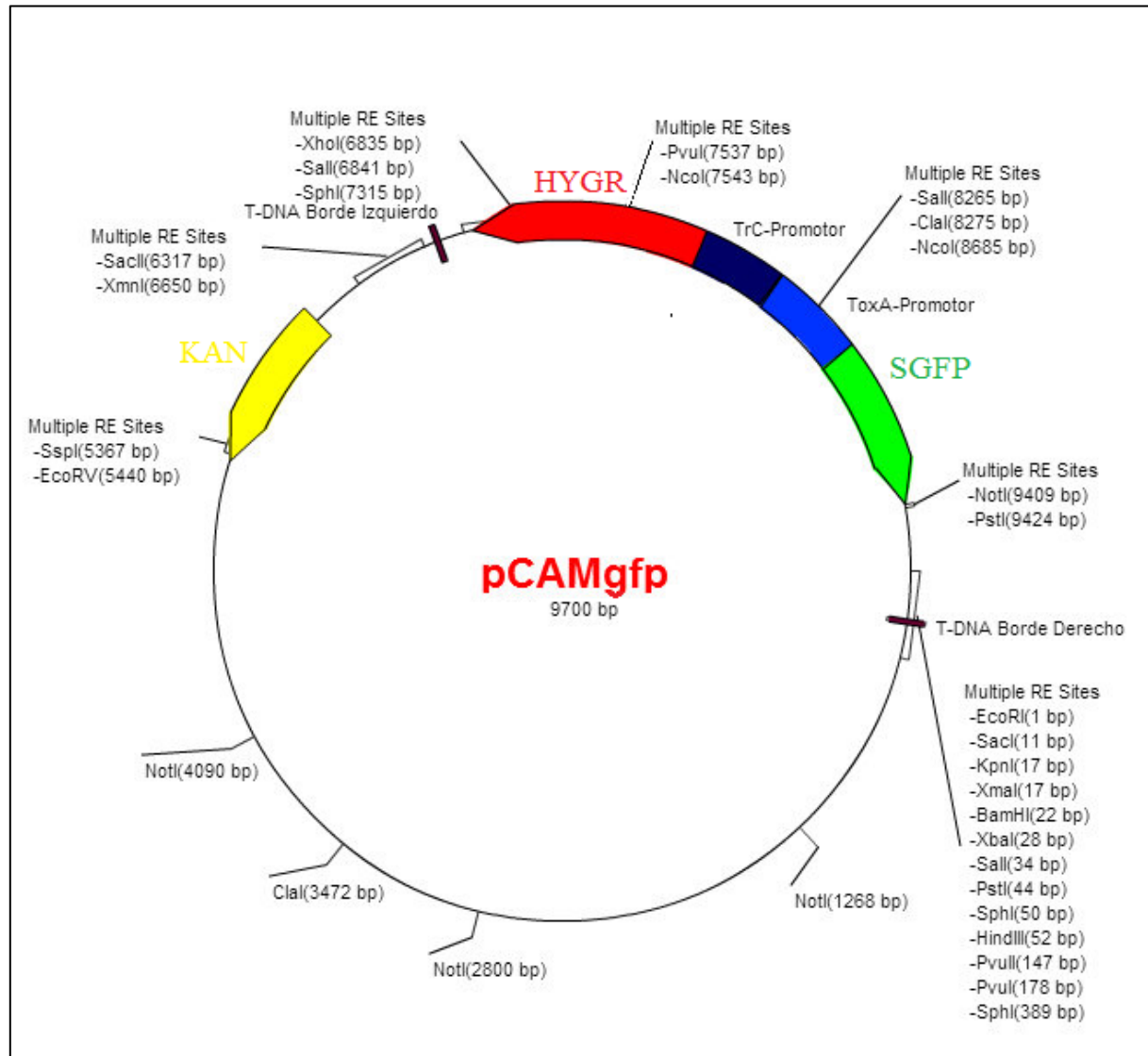


Fig. 1: Mapa de restricción del vector pCAMgfp*.

La flecha de color verde representa el gen *sgfp*, codificante para la proteína verde fluorescente y, por lo tanto, responsable de otorgarle al hongo la capacidad de fluorescer una vez integrado en el genoma y expresado adecuadamente. La flecha color rojo, corresponde al gen *hygR*, que codifica para una quinasa que fosforila la higromicina evitando su acción y con ello otorgando resistencia a quien lo exprese. Este gen permite la selección de los hongos transformados. La flecha de color amarillo representa al gen de *kanR*, que permite seleccionar el vector en la bacteria, debido a que le otorga resistencia al antibiótico kanamicina. Finalmente, los segmentos en azul y celeste, corresponden a los promotores de los genes *hygR* y *sgfp*, respectivamente. *Mapa modificado por el autor mediante el programa EZ PLASMID MAP V1.9.

Protocolo para la transformación genética de *B. cinerea* mediado por *R. radiobacter*.

En busca de un protocolo ajustado a la combinación cepa bacteriana/plasmido y aislado de *B. cinerea*, que permitiera una optimización de la obtención de hongos transformados, se evaluaron los protocolos descritos por De Groot *et al.* (1998); Rolland *et al.* (2003), Michielse *et al.* (2008) y Rajaguru (2008), para la transformación de hongos mediada por *R. radiobacter*. Finalmente, se generó un protocolo diseñado en función de ciertas modificaciones aplicados a los ya existentes.

Principales etapas desarrolladas:

1. Reactivación y preparación del material inicial: Corresponde a la activación del crecimiento fúngico y bacteriano para iniciar el proceso de transformación. Siguiendo el protocolo descrito por Rolland *et al.* (2003) y Michielse *et al.* (2008) se seleccionaron las conidias de *Botrytis cinerea* como material inicial de la transformación.
2. Co-cultivo: En medio de cultivo de inducción (De Groot *et al.* 1998; Rolland *et al.* 2003, Michielse *et al.* 2008 y Rajaguru, 2008) suplementado con Acetosiringona, se permite la interacción entre la bacteria y el hongo. Mediante la expresión de los genes de virulencia de *R. radiobacter* activados por la Acetosiringona se genera la integración del material genético de interés en el genoma fúngico.
3. Selección: Corresponde a la etapa en donde se discriminan los mutantes transformados de los que no lo son, empleando medio de cultivo selectivo sobre el co-cultivo, suplementado con higromicina, para seleccionar los hongos y cefatoxima para eliminar la bacteria (Rajaguru, 2008).

Los aislados fúngicos obtenidos tras el proceso de transformación serán considerados en el resto del texto como mutantes, debido a que se les considera distintos a los aislados iniciales al haberse generado la incorporación de un gen exógeno que pudiese o no afectar su fenotipo y que supone una heredabilidad de tales características. El resto, los originales, sin transformación, serán considerados del tipo silvestre o WT (wild type).

Confirmación de la transformación genética de los aislados de *B. cinerea* con los genes *sgfp* y *hph*.

De un universo de más de 200 aislados transformados, se seleccionaron de manera aleatoria 5 mutantes de cada uno de los nueve aislados iniciales de manera tal de evaluar en éstos la estabilidad de la transformación y los posibles efectos generados por la inserción azarosa en el genoma que implica el uso *Rhizobium radiobacter*. En resumen, un total de 54 aislados fueron analizados para evaluar estas características (aislados WT, n=9, y los mutantes para cada uno, n=45).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Higromicina para la selección de los aislados transformados de *B. cinerea*.

Se seleccionaron un total de 50 aislados de *B. cinerea*, no transformados, entre los cuales se destacan los nueve empleados en este estudio y el strain universal secuenciado de *Botrytis cinerea*, B05.10. El resto fue elegido al azar del cepario del laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular de la Universidad de Chile. Estos aislados fueron testeados a concentraciones crecientes de higromicina entre 0 y 200 µg/ml.

Test de estabilidad mitótica

Se determinó la estabilidad del mutante y la capacidad de permanecer con el gen de resistencia y fluorescencia, mediante el análisis de la octava generación evaluada en medio selectivo (AML, Agar malta levadura + Higromicina) tras crecimiento consecutivo por 7 generaciones del hongo en medio no selectivo (AML, sin higromicina).

Visualización de los hongos mutantes mediante microscopía de epifluorescencia y confocal para verificar la expresión de la proteína.

Se empleó el microscopio de epifluorescencia marca Alltion modelo L2000A/B, trinocular con fuente de poder externa y lámpara de mercurio como emisor, para la determinación inicial de la fluorescencia así como el confocal Carl Zeiss modelo LSM 710, del Laboratorio de Biología Vegetal Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, para caracterizar y fotografiar el resultado de la transformación.

Caracterización genética de los aislados WT y mutantes.

Para la caracterización genética del total de los aislados (n=54), se realizó el incremento de la biomasa fúngica en medio líquido glucosado dispuesto en viales de centelleo de 20 ml. (200 g de papa, 20 g de glucosa diluidos en 500 ml de caldo de papa y 500 ml de agua destilada).

La biomasa fúngica obtenida en estos medios líquidos se recuperó al tercer día de la inoculación del medio y luego fue dispuesta por al menos 24 horas a -80°C , y luego de este tiempo sometida a liofilización (liofilizador marca Liobras modelo L101).

El material liofilizado se procesó según el protocolo de extracción de ADN descrito por Bainbridge *et al.* (1990), y posteriormente modificado por (Muñoz *et al.*, 2002).

Una vez obtenido el ADN de cada una de los aislados se realizó un PCR con partidores que amplifican para parte del gen *sgfp* (Cuadro 2). El gen completo comprende una longitud de 720 pb y el fragmento amplificado por los partidores posee un tamaño de 543 pb (Cuadro 3).

Cuadro 2: Secuencia nucleotídica de los partidores para la amplificación del gen *sgfp*.

<i>sgfp forward</i>	TAAACGGCCACAAGTTCA=18 bp
<i>sgfp reverse</i>	TGCTCAGGTAGTGGTTGT=18 bp

(Chiu *et al.*, 1996).

Cuadro 3: Secuencia nucleotídica del gen *sgfp*.

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCG
 ACGTAAACGGCCACAAGTTCA*GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG
 CTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCAC
 CTTACCTACGGCGTGCAAGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCA
 AGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
 CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG
 CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCCA
 CAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCAC
 AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC
 GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCA*CCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
 CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGC
 ATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Chiu *et al.*, (1996).

*Secuencia nucleotídicas de unión a los partidores *sgfp forward* y *reverse*.

Asimismo, mediante PCR-dúplex se determinó la correspondencia genotípica de los aislados mutantes clasificándolos como *transposa*, *vacuma*, *boty* o *flipper* de acuerdo a la presencia o ausencia de los fragmentos transponibles (Muñoz *et al.*, 1999; Esterio *et al.*, 2011). Para este análisis se emplearon los partidores LTR98 y LTR728 que amplifican para el transposón *boty* (648 pb), mientras que para *flipper* (1250 pb) se utilizaron los partidores F14 y F304 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Secuencia nucleotídica de los partidores que se utilizaron en las reacciones de PCR-dúplex para la detección de los genotipos de *Botrytis cinerea*.

Partidor	Secuencia nucleotídica
F 14 ^a	GCA CAA AAC CTA CAG AAG A
F 304 ^a	ATT CGT TTC TTG GAC TGT A
LTR 98 ^b	AGC CTG TAG AAT CAC CAA CG
LTR 728 ^b	CGG TAT TTC TGG TTG GCA

a (Levis *et al.*, 1997).

b (Diolez *et al.*, 1995).

Ambas pruebas moleculares culminan con detección del producto de PCR y PCR dúplex mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% , con tinción Gel Red marca Biotium utilizándose como carga 30 µl de producto de PCR por aislado adicionando 1 µl de tampón de carga 6x por cada 5 µl de producto de PCR. Posteriormente, la visualización de la electroforesis se realizó empleando el transiluminador de luz UV marca Vilber Lournat.

Caracterización morfológica de los aislados

Para la observación y posterior caracterización de los aislados respecto de su aspecto miceliar y esclerocial, nivel de esporulación, capacidad formadora de esclerocios se utilizó la información referencial descrita por Martínez *et al.* (2003) y modificada por Esterio (2005) (Cuadro 5). Los aislados en repetición de tres, fueron dispuestos en placas de Petri de 90x15mm conteniendo medio AM (Agar Malta) en régimen de oscuridad continua a una temperatura de 20± 2°C por un período máximo de 20 días.

El aspecto miceliar, esporulación y capacidad formadora de esclerocios fueron evaluados al día 10, 15 y 20 post-siembra.

Mediante el empleo del software estadístico Minitab Release 12.1, y la prueba estadística Chi-cuadrado (χ^2) se desarrollaron comparaciones entre los aislados WT y mutantes con respecto a las variaciones morfológicas y los efectos generados tras la transformación genética.

Cuadro 5: Cuadro de criterios empleados para la caracterización morfológica de los aislados transformados.

Parámetros a analizar	Escala de evaluación (niveles)			
Miceliar (M)	M-I Micelio corto	M-II Micelio suelto	M-III Crecimiento en masa	M-IV Micelio grueso y lanudo
Esclerocial (S)	S-I Esclerocios formados en borde de placa Petri	S-II Esclerocios grandes dispuestos radialmente en placa Petri	S-III Esclerocios grandes distribuidos irregularmente en placa Petri	S-IV Esclerocios numerosos y pequeños desuniformemente distribuidos
Nivel de Esporulación (€)	€-0 Ausencia de esporulación (0%)	€-1 Esporulación escasa (1-10%)	€-2 Esporulación débil (10%<€-2<50%)	€-3 Esporulación profusa abundante (>50%)
Capacidad formadora de Esclerocios (Cfe)	Cfe-0 Ausencia de esclerocios	Cfe-1 Escasa producción de esclerocios (1-15/placa Petri)	Cfe-2 Moderada producción de esclerocios (15-30/placa Petri)	Cfe-3 Alta producción de esclerocios>30/placa Petri

(Esterio, 2005).

Virulencia en bayas de vid cv. Thompson Seedless.

Para evaluar la capacidad patogénica de cada uno de los aislados de *B. cinerea* transformados y sus correspondientes WT (n=54) se llevó a cabo una prueba de virulencia *in vivo* sobre bayas de vid cv. Thompson Seedless, con 16,5° Brix promedio, medidos mediante un refractómetro portátil. La uva provenía de parrales sin tratamientos de fungicidas y destinada para el mercado de fruta parcialmente deshidratada.

Para el montaje del ensayo se requirió la preparación de cámaras húmedas considerando dos condiciones (bayas con herida y sin herida) y un total de 12 submuestras (bayas) y 3 repeticiones (cámara húmeda) y 45 aislados transformados más 9 WT y un control inoculado con agua destilada estéril (n=55) se requirió de un total de 4000 bayas de uva las que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 10% de la solución comercial por 2 minutos y luego enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril. Bajo la acción de mecheros Bunsen se secaron sobre papel absorbente estéril.

La herida en cada una de las bayas de esa condición, se realizó con la punta estéril de una pipeta Pasteur a profundidad constante. Sobre la baya se dispuso una pequeña gota de 10 μ l de la suspensión conidial previamente determinada mediante hemacitómetro, y ajustada a 200.000 conidias/ml.

Al cabo de 72 horas desde el momento de la inoculación a temperatura más o menos constante de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, se midió el diámetro de la lesión tisular necrótica.

Los mediciones obtenidas como resultado de la virulencia fueron analizadas mediante un análisis de varianza one-way y posterior comparación múltiple mediante el test de Dunnett.

Pruebas de sensibilidad a fungicidas.

Se realizaron pruebas de sensibilidad a fungicidas considerando el total de aislados ($n=54$). Todas las pruebas contemplaron el uso del programa estadístico Minitab 12.1 Release, para el cálculo de la concentración media efectiva (CE_{50}) mediante el análisis de la inhibición en el crecimiento miceliar (medido en mm) y comparados con su correspondiente testigo (sin fungicida). Se emplearon análisis estadísticos de Confiabilidad/Sobrevivencia y posteriormente el test Probit. Se realizó un promedio de mediciones empleando tres repeticiones para cada una de las concentraciones.

En el caso de fenhexamid (TELDOR[®] 50WP), perteneciente al grupo de las hidroxianilidas el nivel de sensibilidad se determinó en el medio de cultivo sintético Sisler (medio YSS) descrito por Leroux *et al.* (1999), suplementado con el fungicida a concentraciones crecientes (0; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 $\mu\text{g/ml}$).

En iprodione (ROVRAL[®] 4Flo 480g/L SC), perteneciente al grupo de las dicarboximidas la prueba de inhibición de crecimiento miceliar se realizó en medio APD (Agar-Papa-Dextrosa) según la metodología propuesta por Leroux y Gredt (1981), suplementado con el fungicida a concentraciones crecientes, según lo descrito por Ma *et al.* (2007) (0; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 $\mu\text{g/ml}$).

En ambas pruebas de inhibición del crecimiento miceliar se utilizaron discos del medio de cultivo sisler o PDA, según el fungicida a tratar, con micelio en activo crecimiento (3 días) de los distintos aislados en estudio.

De manera especial, el aislado WT con fenotipo multidroga (WT 1E) y sus correspondientes mutantes (1E00, 1E01, 1E02, 1E03 y 1E04) fueron testeados mediante la prueba de resistencia a multidroga. Se realizaron 3 repeticiones para cada una de las concentraciones establecidas.

Los fungicidas empleados fueron: pyrimethanil (Scala[®] 408g/L), iprodione (Rovral[®] 4Flo 480 g/L), fludioxonil (Scholar[®] 230 SC), fenhexamid (Teldor[®] 50 WP) y tolnaftato, antimicótico del grupo de los tiocarbamatos que actúa inhibiendo la ruta del ergosterol (Ryder *et al.*, 1986) (Cuadro 6). Las concentraciones empleadas corresponden, en la mayoría de los casos, al valor inhibitorio medio o punto de corte para el fungicida.

Cuadro 6: Ensayo de resistencia multidroga: Ingredientes activos, Concentraciones, medios de cultivo y fenotipos que caracterizan los aislados tipo multidroga.

Ingrediente Activo	Concentración (µg/ml)	Medio de Cultivo	MDRS	MDR1	MDR2a	MDR2b	MDR3
iprodione	2,5	AA ¹	-	+/-	+/-	+/-	+/-
fludioxonil	1	AA ¹	-	+	-	-	+
pyrimethanil	1	PG ²	-	+/-	+/-	+/-	+/-
fenhexamid	0,4	PG ²	-	-	+	+	+
	4	PG ²	-	-	+	-	+
	10	PG ²	-	-	+	-	+
tolnaftato	10	PG ²	-	+	+	+	+

(+) *Conidias germinadas; (-) Conidias no germinadas*

(1)AA: Agar-agua (1,5% Agar)

(2) PG: Glucosa-Fosfato (Glucosa 1%; 0,2% KH₂PO₄; 0,2% K₂HPO₄; 1,5% Agar).

De acuerdo a la metodología descrita por Chapeland *et al.* (1999) se evaluó la germinación de las conidias de *B. cinerea in vitro*. Para ello se realizó una suspensión conidial de cada uno de los aislados esta fue filtrada mediante el uso de gasa estéril.

La suspensión conidial filtrada fue inoculada en cada una de las placas de la prueba a un volumen de 200 µl y distribuidos por toda la superficie del medio. La visualización de la germinación conidial se realizó 24 horas posterior a la inoculación.

El fenotipo se determinó mediante la observación microscópica del tubo germinativo. Se consideró como una conidia germinada cuando el tamaño del tubo germinativo fue mayor a 3 veces el tamaño longitudinal de la conidia (Leroux y Gredt, 1981). Los tubos germinativos desarrollados y la forma de ellos permiten la categorización del aislado.

RESULTADOS

Optimización del protocolo de transformación de *B. cinerea* mediado por *R. radiobacter*.

Los protocolos descritos por De Groot *et al.* (1998); Rolland *et al.* (2003), Michielse *et al.* (2008) y Rajaguru (2008), para la transformación genética mediada por *R. radiobacter*, para las condiciones particulares de este experimento, fueron considerados para obtener el protocolo optimizado empleado en el presente estudio.

1. **Material biológico inicial:** La gran ventaja de emplear *R. radiobacter* frente otras técnicas de transformación es la posibilidad de comenzar el proceso con distintas estructuras que pueden ser transformadas con ella, ya sea, conidias, micelio, protoplastos, cuerpos fructíferos, etc. El empleo de protoplastos reniega la capacidad innata de la bacteria para introducir material genético foráneo sin la necesidad de heridas o degradaciones en la pared fúngica, por ello es un proceso innecesario que incrementa los costos en reactivos, la laboriosidad y la dificultad del protocolo. Por otro lado, el uso de micelio incubado en medio líquido (Rajaguru, 2008) incrementa las posibilidades de contaminación con otros hongos o bacterias y su manipulación es un poco más compleja. De esta forma, el uso de una suspensión conidial resultó ser la más eficiente y sencilla forma de material inicial empleada.
2. **Selección de los hongos transformados:** El uso de celofán (Rolland *et al.*, 2003), filtro de nitrocelulosa, y el papel filtro para trasladar los aislados fúngicos transformados desde el medio de co-cultivo al selectivo fueron ineficientes. Todos estos materiales implican costos adicionales, mayor laboriosidad, y menor eficiencia de transformación con respecto al simple método de agregar sobre el co-cultivo una delgada capa de medio de cultivo suplementada con los antibióticos adecuados para la selección del hongo (higromicina) y para la eliminación de la bacteria (cefatoxima) a las concentraciones descritas para cada protocolo.

Por ello, se concluyó que el diseño de una nueva metodología basada en los antecedentes presentes fue fundamental para optimizar la obtención de mutantes, en función de la combinación bacteria-plásmido (GV3101:pCAMgfp), y también de los aspectos prácticos del método (Fig. 3).

Las principales modificaciones que generaron cambios positivos en la eficiencia de transformación fueron:

- Suspensión conidial de *B. cinerea* en Medio de Inducción Líquido: Esto se debe a que de esta manera no se diluye la concentración de sales y AS requeridas para la activación de la virulencia de la bacteria.

- Mantenimiento de la suspensión conidial de *B. cinerea* en cámara de incubación por al menos 3 horas a 20°C (Latorre, 2002): Esto permite una mayor susceptibilidad del hongo frente al proceso infectivo de la bacteria, pues luego de ese lapso se comienza a activar la germinación conidial facilitando la entrada y adherencia de la bacteria al tubo germinativo recién expuesto, o bien al interior de la conidia tras la ruptura de la pared conidial.
- Medio de selección con una menor concentración del antibiótico de selección: Según Rolland (2003) o Hamada y Malfatti (1997) se debiese emplear una concentración entre 70 y 100 µg/ml de Higromicina, respectivamente, para seleccionar los aislados transformados. Sin embargo, de acuerdo a resultados experimentales previos, se demostró que con valores de 40 µg/ml se lograba un efecto inhibitorio de las colonias no transformadas y evitaba la muerte por estrés de aquellas colonias recién transformadas. Adicionalmente, se planteó un sistema de selección con concentraciones crecientes de higromicina hasta llegar a los valores descritos por Hamada y Malfatti (1997), de 100 µg/ml de Higromicina.

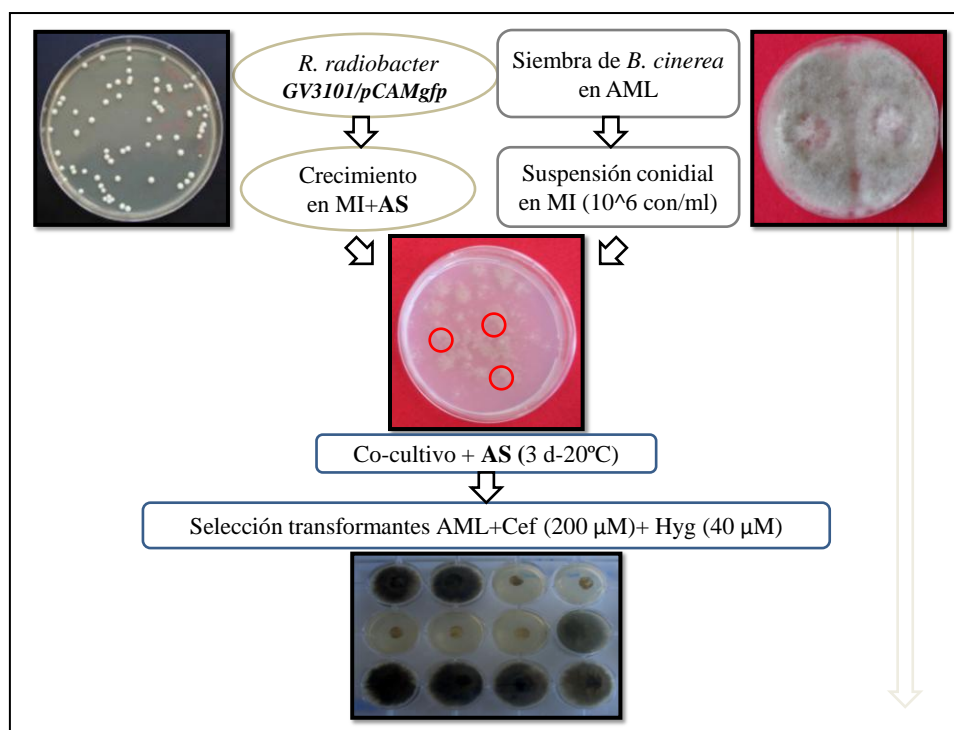


Fig. 3: Esquema que presenta los procesos claves en la metodología de transformación genética de *Botrytis cinerea* mediada por *Rhizobium radiobacter* (AS: Acetosiringona; Cef: Cefatoxima; MI: Medio de Inducción; AML: Agar Malta Levadura).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Higromicina para la selección de los aislados transformados de *B. cinerea*.

Se determinó que a concentraciones superiores a 30 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina es posible lograr la selección necesaria para los hongos transformados ya que del total de aislados analizados ninguno logró crecer y desarrollarse a esa concentración. A 10 $\mu\text{g/ml}$ se presentó cierto crecimiento miceliar en 3 cepas del total de aislados analizados ($n=50$). Sin embargo, para todos los estudios posteriores se consideró como mínimo 40 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 4) para seleccionar las primeras colonias transformadas obtenidas, para luego, incrementar la concentración hasta valores de 100 $\mu\text{g/ml}$ y así asegurar la capacidad de resistencia frente al antibiótico.

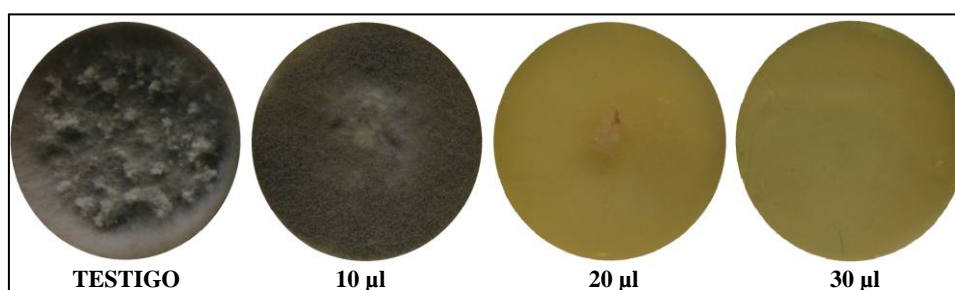


Fig. 4: Prueba de inhibición del crecimiento mediado por higromicina. Concentraciones crecientes del antibiótico y su efecto sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* del tipo WT.

Test de estabilidad mitótica

El total de aislados transformados analizados mantuvo las características de fluorescencia y resistencia a higromicina al término de 7 generaciones bajo un medio sin presión de selección y luego ser transferidos a una placa con 100 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico higromicina.

El comportamiento obtenido señala una alta estabilidad de la transformación y la capacidad de heredar la característica de manera altamente conservada. Por lo que se asume la permanencia de la fluorescencia aún cuando no está bajo medios con antibióticos.

Visualización de los hongos mutantes mediante microscopía de epifluorescencia y confocal para verificar la expresión de la proteína.

La totalidad de los mutantes expresaron constitutivamente la proteína verde fluorescente en todas las estructuras fúngicas. Conidias, hifas, conidióforos expresaron fuertemente la fluorescencia verde.

Las muestras microscópicas de los hongos WT visualizados en el microscopio confocal (Fig. 7) o de epifluorescencia (Fig. 8) empleando la misma longitud de onda que excitan lumínicamente los hongos transformados no logran generar una imagen que permita la discriminación de la morfología del hongo. En este sentido, el registro fotográfico es completamente oscuro, demostrando la enorme diferencia entre un WT y un hongo transformado bajo la excitación de la GFP.

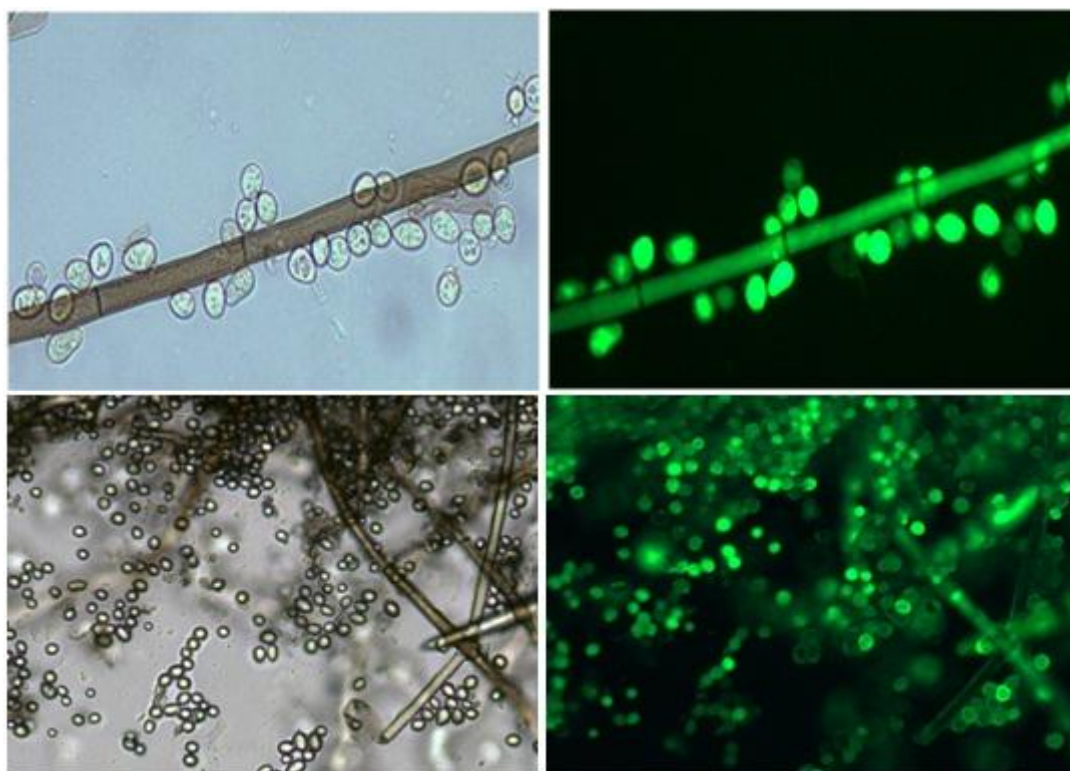


Fig. 7: Micelio de *B. cinerea* transformado. Se observa el micelio tabicado y la presencia de conidias. Observación en microscopio confocal, campo claro (izq.) y fluorescencia (der.)

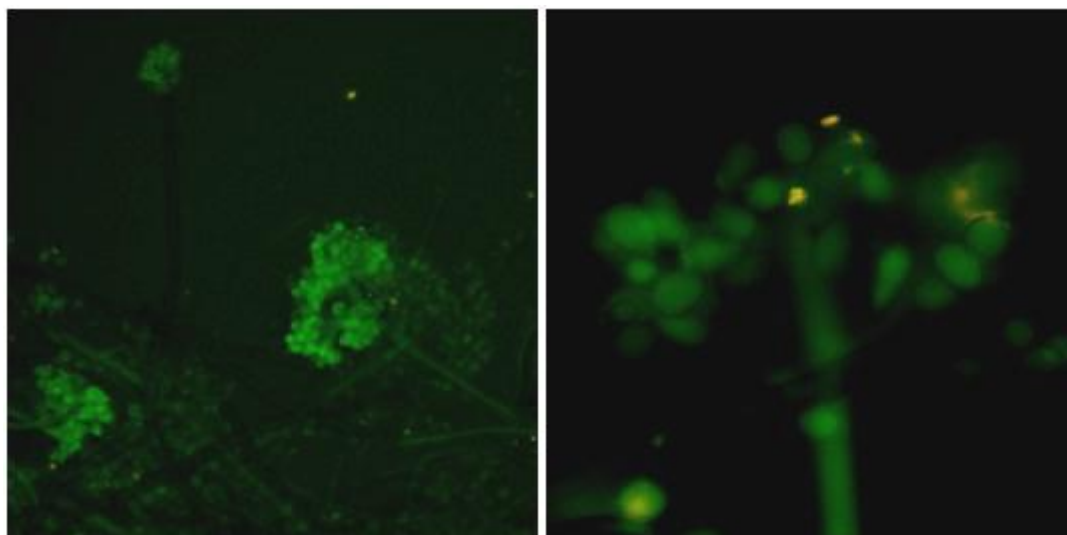


Fig. 8: Conidióforos, conidias y micelio. Observación en microscopio epifluorescente.

Visualización del producto de PCR para la detección del gen de la proteína fluorescente verde (*sgfp*) en los aislados transformados.

El total de los aislados mutantes analizados (n=45) presentaron la secuencia correspondiente al gen de la fluorescencia verde (*sgfp*) amplificada mediante el uso de los partidores *sgfp forward* y *sgfp reverse*. (Fig. 9). La visualización del producto de PCR en gel de agarosa permitió la identificación del amplicón esperado de ~543 pb en los carriles correspondientes del 1-45 (Figura 9).

Ninguno de los aislados WT en su producto de PCR generó una banda en el gel de agarosa para los partidores descritos (carriles 46-54, Fig. 9), lo que corrobora la especificidad y la inexistencia de alguna región genómica similar en los hongos no transformados.

El control positivo (carril C⁺, Fig. 9) empleado corresponde al plásmido pCAMgfp clonado en *E. coli*, cuyo producto de PCR generó un amplicón de similar tamaño al resto de los mutantes (~543 pb).

El control negativo evaluado, cepa B05.10 de *Botrytis cinerea* no generó banda alguna en la reacción con los partidores antes descritos (carril C⁻, Fig. 9).

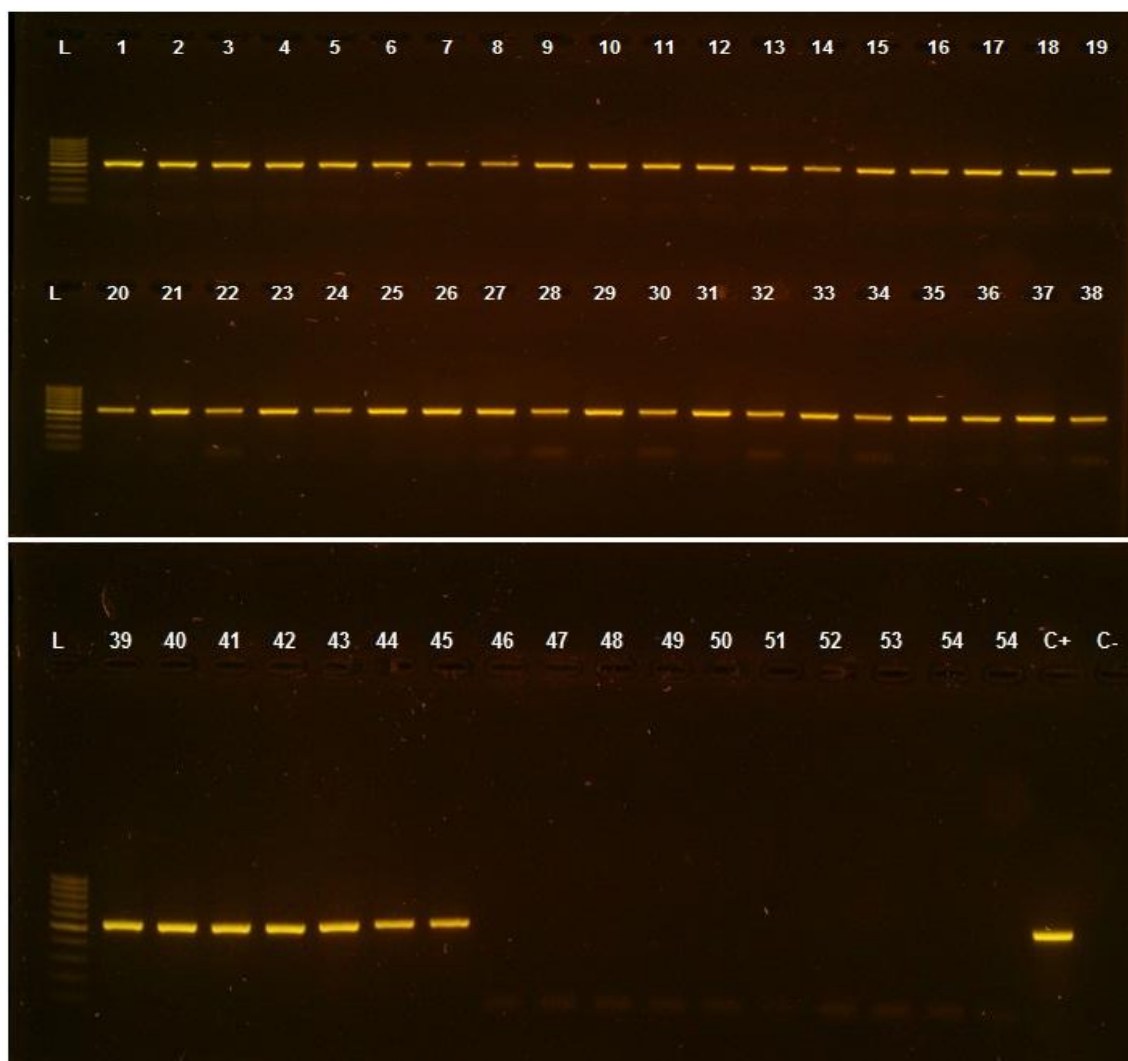


Fig. 9: Visualización del producto de PCR para los partidores específicos para *sgfp*.

L (Ladder): 1000 pb

1-5: Resistentes a fenhexamid: 21FR3+00; 21FR3+01; 21FR3+02; 21FR3+03 y 21FR3+04.

6-10: Resistentes a fenhexamid: ANP2C00; ANP2C01; ANP2C02; ANP2C03 y ANP2C04.

11-15: Resistentes a fenhexamid: A2R3+00; A2R3+01; A2R3+02; A2R3+03 y A2R3+04.

16-20: Sensibles a fenhexamid: 47C00; 47C01; 47C02; 47C03 y 47C04.

21-25: Resistente multidrogas tipo MDR1: 1E00; 1E01; 1E02; 1E03 y 1E04.

26-30: Resistente a iprodione: SP8D00; SP8D01; SP8D02; SP8D03 y SP8D04.

31-35: Resistente a iprodione: 33AR00; 33AR01; 33AR02; 33AR03 y 33AR04.

36-40: Sensible a iprodione: 67S00; 67S01; 67S02; 67S03 y 67S04.

41-45: Sensible a iprodione: 53S00; 53S01; 53S02; 53S03 y 53S04.

46-54: WT: 21FR3+; ANP2C; A2R3+; 47C; 1E; SP8D; 33AR; 67S y 53S.

C+: Control Positivo, Plásmido pCAMgfp.

C-: Control Negativo, *Botrytis cinerea* B05.10. (Sin el gen *sgfp*)

Visualización del producto de PCR para la detección de los transposones *boty* y *flipper*.

Al visualizar los productos de PCR-dúplex para los partidores que permiten amplificar parcialmente fragmentos de los transposones *boty* y *flipper*, se logró identificar al genotipo *transposa* en la totalidad de los aislados analizados (n=54) (Figura 10). Estos corresponden a aquellos que presentan ambos amplicones en la reacción lo que genera una banda superior correspondiente al transposón *flipper* (1250 pb) y otra más pequeña, correspondiente al transposón *boty* que se ubica más abajo en el mismo carril del gel de agarosa, con un peso de 648 pb (Fig.10).

Esto se condice con estudios anteriores, que indican la alta frecuencia de las poblaciones genéticas de *B. cinerea* correspondientes al tipo *transposa* (presencia de ambos transposones) en aislados recuperados de uva de mesa. Incluso se ha correlacionado la presencia o ausencia de los transposones con su adaptabilidad frente a los distintos estadios fenológicos de los cultivos asociados (Esterio *et al.*, 2011).

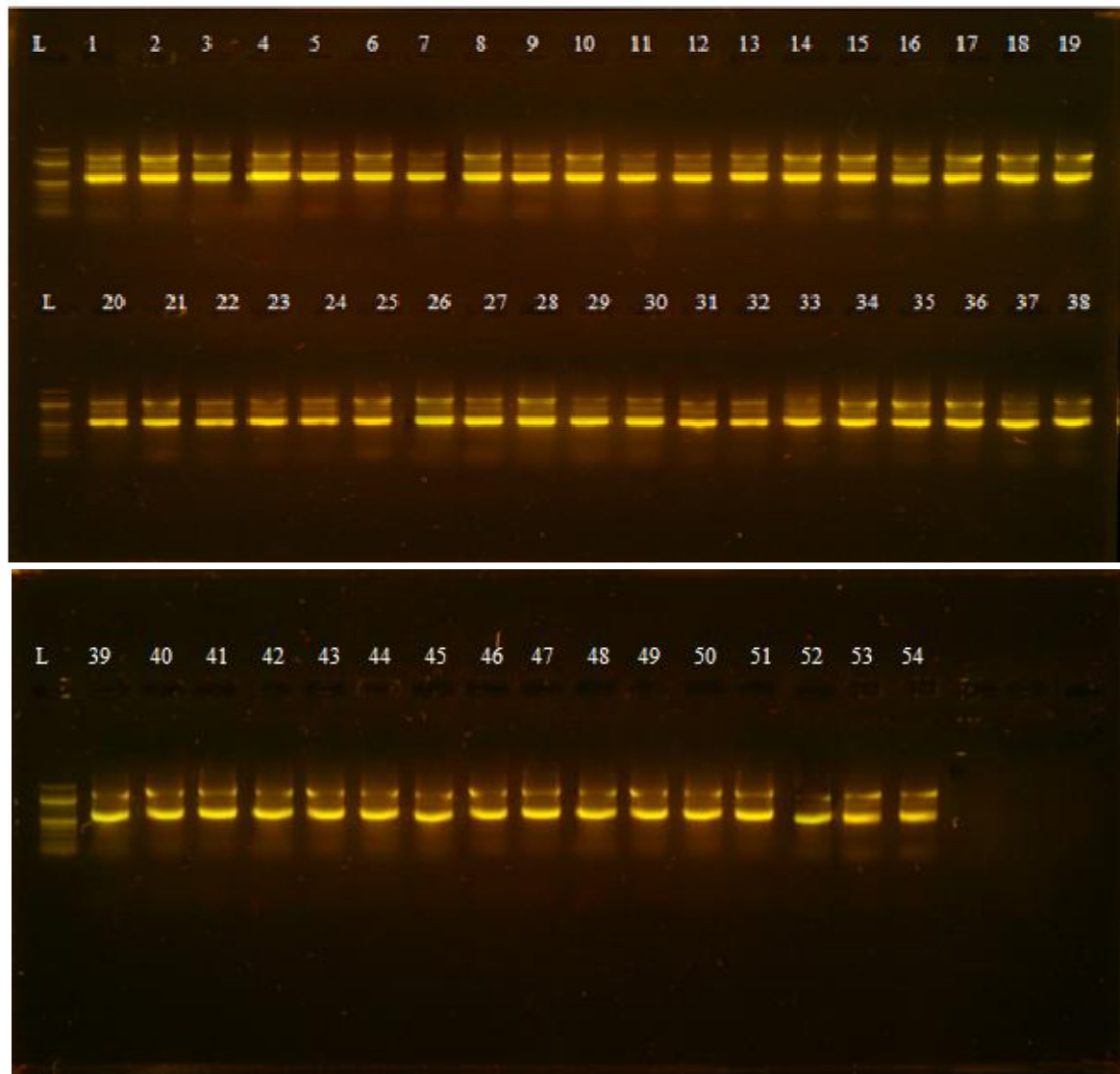


Fig. 10: Visualización del producto de PCR-dúplex para la detección de los fragmentos transponibles *boty* y *flipper*, mediante partidores específicos.

L (Ladder): 100 pb

1-6: 1E; 1E00; 1E01; 1E02; 1E03 y 1E04

7-12: ANP2C; ANP2C00; ANP2C01; ANP2C02; ANP2C03 y ANP2C04.

13-18: A2R3+; A2R3+00; A2R3+01; A2R3+02; A2R3+03 y A2R3+04.

19-24: 47C; 47C00; 47C01; 47C02; 47C03 y 47C04.

25-30: 21FR3+; 21FR3+00; 21FR3+01; 21FR3+02; 21FR3+03 y 21FR3+04.

31-36: SP8D; SP8D00; SP8D01; SP8D02; SP8D03 y SP8D04.

37-42: 33AR; 33AR00; 33AR01; 33AR02; 33AR03 y 33AR04.

43-48: 67S; 67S00; 67S01; 67S02; 67S03 y 67S04.

49-54: 53S; 53S00; 53S01; 53S02; 53S03 y 53S04.

Caracterización morfológica de los aislados WT y mutantes.

Mediante el uso de la tabla de caracterización morfológica descrita por Martínez (2003) y modificada por Esterio (2005) se pudo determinar diferencias en las morfologías expresadas por los hongos transformados de los WT. Así se pudo identificar la presencia de morfologías miceliares o esclerociales (Fig. 11) según los parámetros descritos por los investigadores.

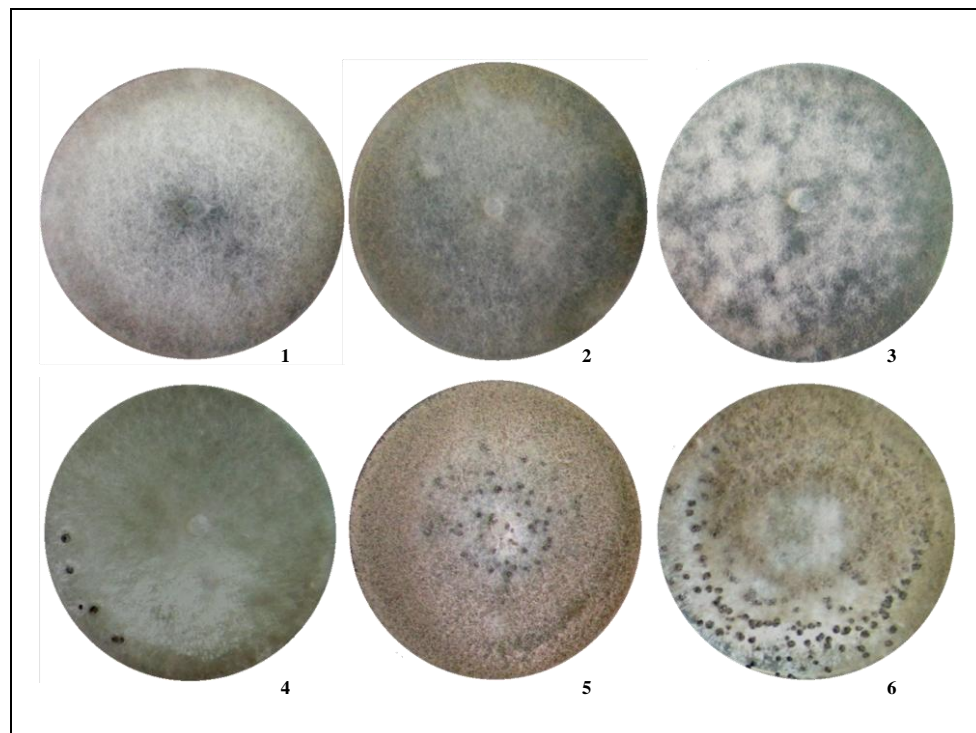


Fig. 11: Tipos miceliares 1.- Micelio Corto (M-I) con Esporulación escasa (€-1); 2.- Micelio suelto (M-II) con Esporulación profusa (€-3); 3.- Crecimiento en masa (M-III) con Esporulación débil (€-2). **Tipos Esclerociales:** 4.- Esclerocios formados en borde de placa Petri (S-I) con Escasa producción de esclerocios (Cfe-1), 5.- Esclerocios grandes dispuestos radialmente en placa Petri (SII) con una moderada producción de esclerocios (Cfe-2); 6.- Esclerocios numerosos y pequeños desuniformemente distribuidos (S-IV) con Alta producción de esclerocios (Cfe-3).

Tanto en los aislados WT como en los mutantes existe una predominancia del tipo miceliar por sobre el esclerocial, sin expresar diferencias estadísticamente significativas entre los aislados WT y los mutantes, de acuerdo a la prueba χ^2 ($p > 0,05$; $p = 0,443$). Los valores obtenidos en la categoría miceliar corresponden a 70,37% y 77,16% para los aislados WT y mutantes, respectivamente. Los aislados categorizados como del tipo esclerociales tienen un 29,62% y 22,83% para los WT y mutantes, respectivamente (Fig. 12).

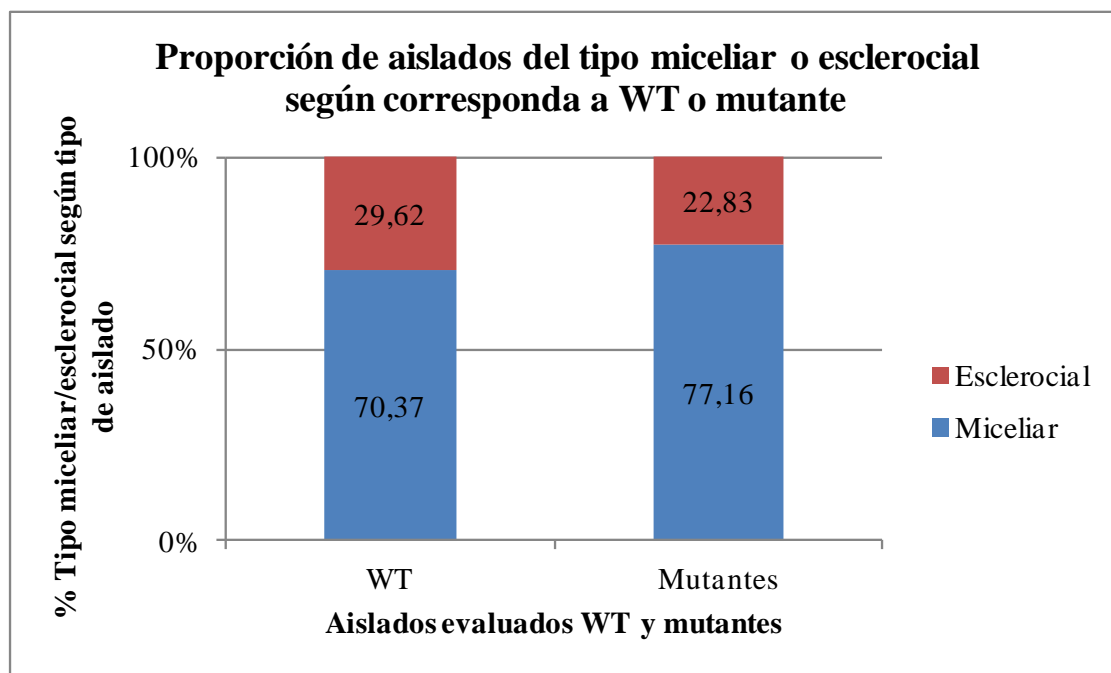


Fig. 12: Proporción de aislados del tipo miceliar o esclerocial en la condición WT o mutante.

En los aislados WT categorizados como del tipo miceliar se presentó un 100% de los aislados de la clase miceliar M-II mientras que en los mutantes, si bien predomina la misma clase (M-II), también se presentan aunque en una baja frecuencia las clases miceliar M-I y M-III (2,4% y 6,4%; respectivamente).

En relación al nivel de esporulación, tanto los aislados WT como los mutantes presentaron altos porcentajes de frecuencia en la categoría €-1 (78,9% y 81,6%; respectivamente) así como en la categoría €-2 (21,1% y 14,4%; respectivamente), en estos últimos no existieron diferencias estadísticamente significativa ($p > 0,05$; $p = 0,502$). En los mutantes nuevamente surge un grupo de aislados con otra categorización (€-0) con un porcentaje de prevalencia del 4%. (Fig. 13).

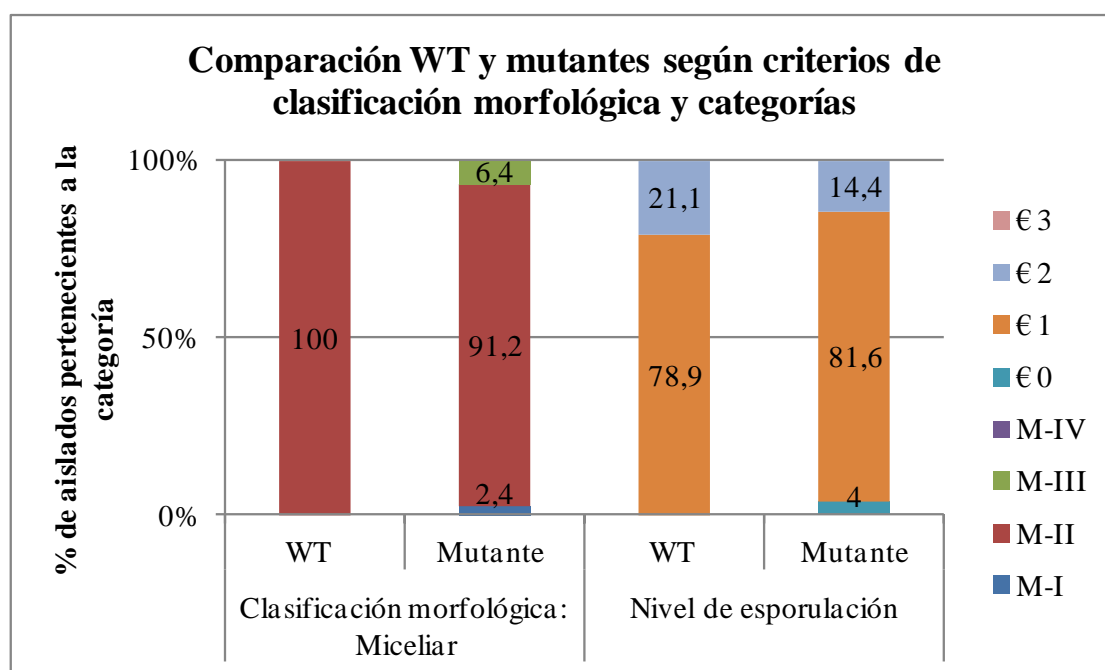


Fig. 13: Comparación WT y mutantes según criterios de clasificación morfológica y categorías. € (0-3): Nivel de Esporulación; M (I-IV): Miceliar.

Al evaluar los aislados según la categoría morfológica esclerocial se muestra un alto porcentaje de aislados pertenecientes al tipo S-I, correspondiendo al 100% en los aislados WT y de un 82,8% en los aislados mutantes. En los aislados mutantes se presenta una nueva categoría (S-IV) que representa el 16,2% del total de los aislados categorizados como esclerociales. En cuanto a la capacidad formadora de esclerocios existe prevalencia del tipo Cfe-0 con un 100% para los aislados WT y de un 82,8% para los mutantes. En los aislados mutantes un 16,2% de los aislados categorizados como esclerociales presentaron una capacidad formadora de esclerocios categorizadas como Cfe-2 (Fig. 14).

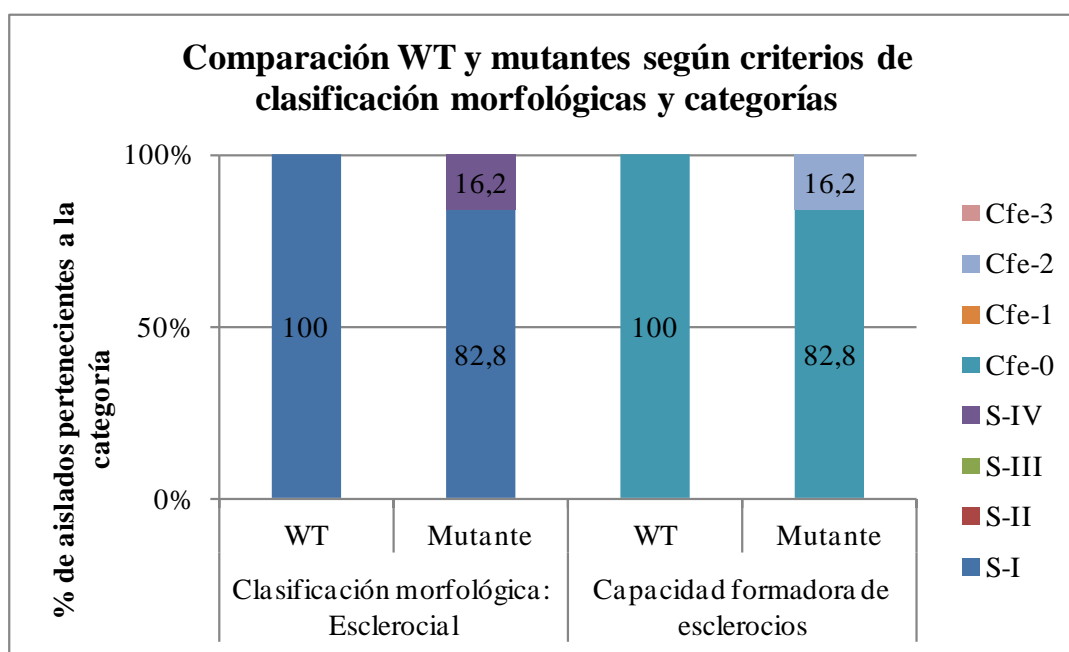


Fig. 14: Comparación WT y mutantes según criterios de clasificación morfológicas y categorías. Cfe (0-3): Capacidad formadora de esclerocios; S (I-IV): Esclerocial.

Grado de virulencia de los aislados mediante pruebas *in vivo* realizadas en bayas de vid cv. Thompson Seedless.

Las pruebas de patogenicidad realizadas *in vivo* en la condición de inoculación con herida se caracterizaron por cambios de coloración en el epi y mesocarpo de la baya debido a la acción de las enzimas del hongo transcurridas las primeras horas. Posteriormente, se observa pérdida de continuidad en el epicarpio y liberación del contenido acuoso celular de la baya. Finalmente, el micelio de coloración blanca se hace evidente y luego de 72 hrs. presenta esporulación y se torna de color gris (Pudrición Gris) (Fig. 15).

Se corroboró la presencia de al menos un aislado transformado por WT que se comportó con el mismo grado de virulencia que su WT correspondiente. Sólo el aislado WT SP8D (Ip+: Resistente a iprodione) no tuvo mutantes que mantuvieran niveles similares de agresividad, siendo en este caso, todos los aislados transformados de mayor virulencia promedio que el WT (Fig. 16).

La condición sin herida presentó valores erráticos afectando el análisis. Se descartaron los datos por no representar correctamente lo evidenciado.

En los aislados sensibles a las dos moléculas fungicidas analizadas (fenhexamid e iprodione), la familia de aislados mutantes originada a partir del aislado 47C, fue la que indujo el menor tamaño promedio de lesión en las bayas de vid (13,04 mm). Mientras que la familia de aislados pertenecientes al resistente a iprodione (33AR), mostró los valores más altos de de lesión (23,301 mm) (Fig. 16).

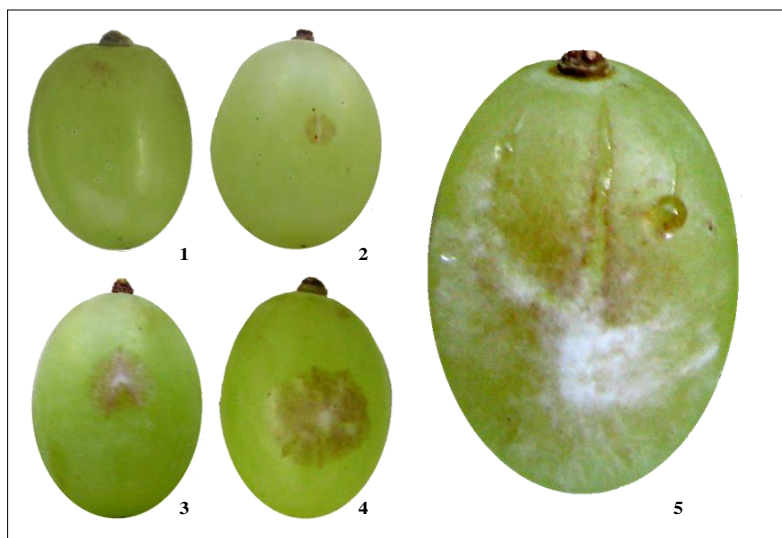


Fig. 15: (1-5) Secuencia temporal de avance de la lesión en bayas de vid var. Thompson seedless producto del ataque de *B. cinerea* desde inicio de mácula parda hasta desarrollo de micelio visible.

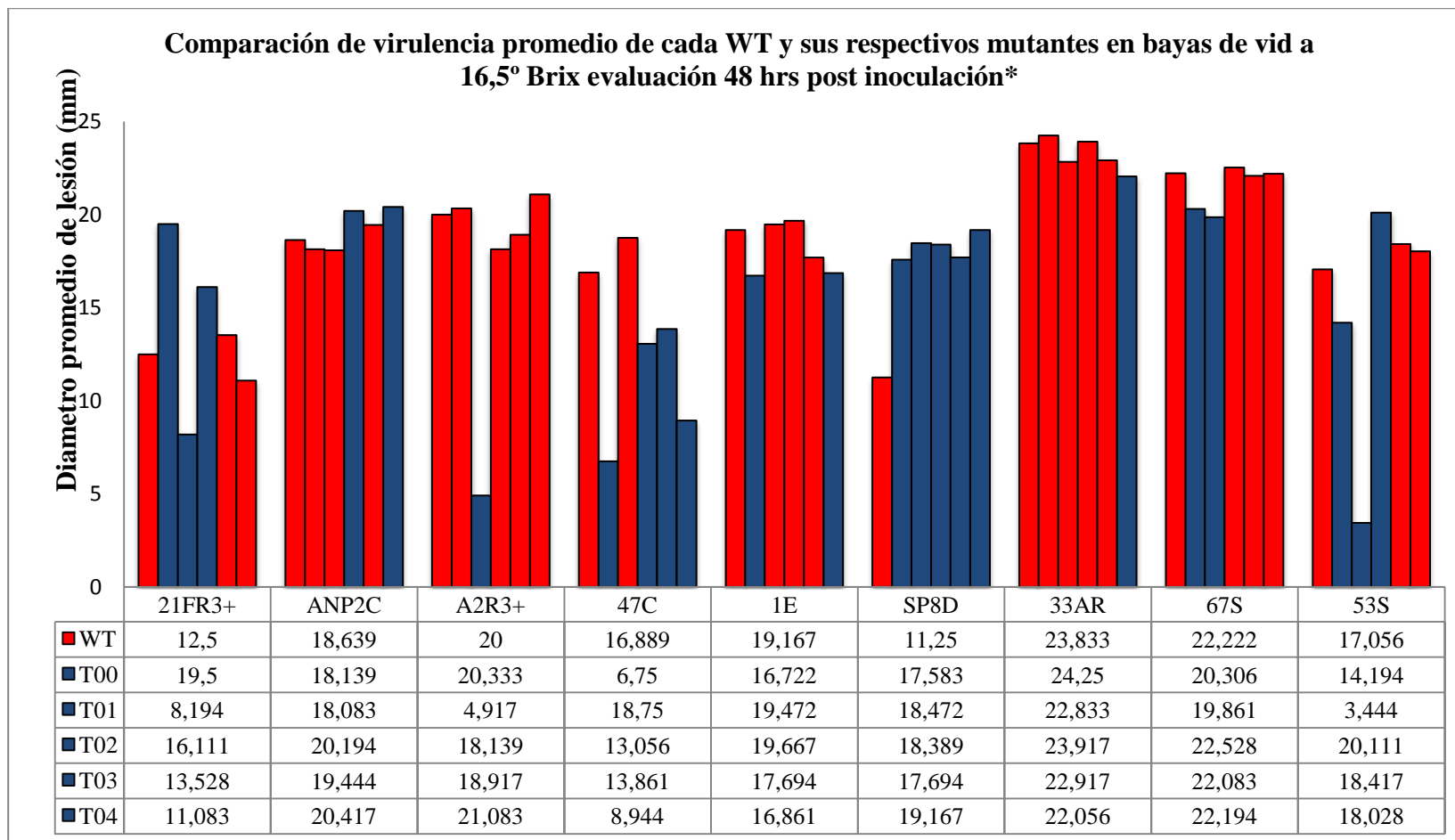


Fig. 16: Diámetro promedio de lesión (mm) generada por los distintos aislados evaluados agrupados por grupo de transformación. *La primera barra del grupo representa al WT (en rojo) y las cinco barras siguientes hacia la derecha corresponden a los mutantes de dicho WT (00; 01; 02; 03; 04). **Los mutantes con barra roja son estadísticamente iguales, en cuanto a promedio de lesión, con su WT ($p > 0,05$).**

Los aislados 21FR3+03 y 21FR3+04, se comportaron estadísticamente idénticos al compararlos con su aislado original WT. Los aislados 21FR3+00 y 21FR3+02, presentaron valores de avance de la lesión mayores que su WT. Por otro lado, el aislado 21FR3+01 presentó un promedio de diámetro de lesión en bayas de vid inferiores que en cualquier otro aislado con un valor promedio de 8,19 mm (Fig.17).

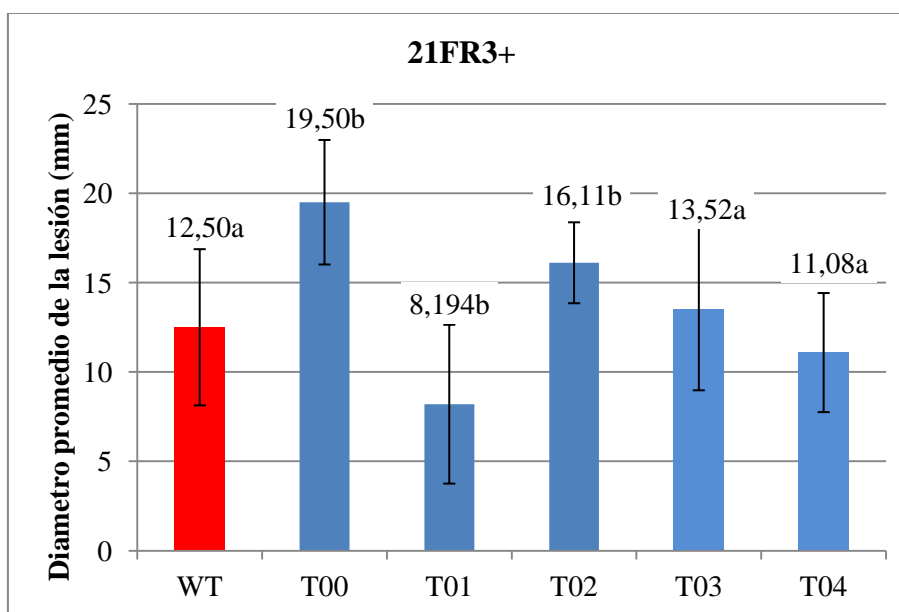


Fig. 17: Diámetros promedio de lesión familia WT 21FR3+ y sus 5 mutantes (T00, T01, T02, T03 y T04). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La barra roja representa al WT, mientras que las azules corresponden a los mutantes obtenidos a partir de éste WT.

En los aislados ANP2C se presentaron leves variaciones en los promedios de lesión. Sin embargo, los aislados ANP2C02 y ANP2C04, presentaron valores promedio de lesión levemente superiores al WT, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). (Fig. 18).

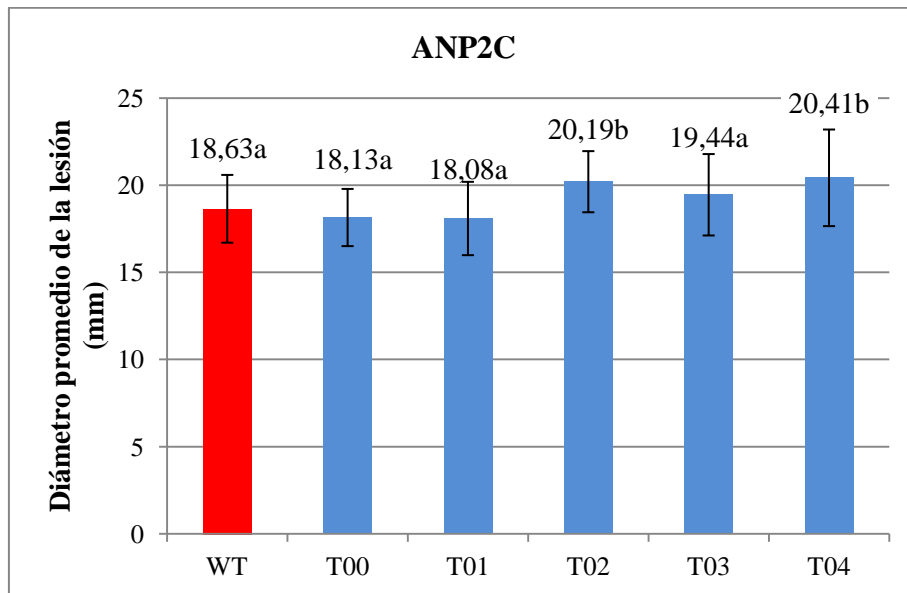


Fig. 18: Diámetros promedio de lesión familia WT ANP2C y sus 5 mutantes (T00, T01, T02, T03 y T04). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La barra roja representa al WT, mientras que las azules corresponden a los mutantes obtenidos a partir de ese WT.

Se evidencia una fuerte disminución en la capacidad de virulencia (hipovirulencia) del aislado A2R3+01, lo que sugiere una alteración en la codificación o expresión de los genes de virulencia. Este tipo de aislados son buscados intensamente mediante técnicas de mutagénesis al azar, en los programas genéticos para la identificación de genes asociados a virulencia. (Fig. 19).

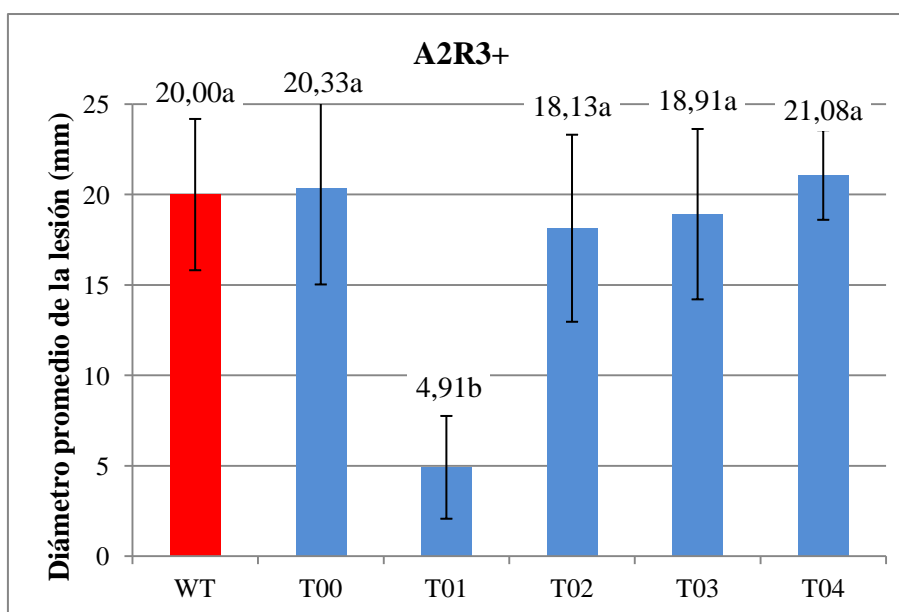


Fig. 19: Diámetros promedio de lesión familia WT A2R3+ y sus 5 mutantes (T00, T01, T02, T03 y T04). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La barra roja representa al WT, mientras que las azules corresponden a los mutantes obtenidos a partir de éste WT

Casi la totalidad de los aislados mostraron hipovirulencia. El aislado 47C01 presentó un promedio levemente superior de diámetro de lesión con respecto a su WT, pero similar estadísticamente con éste (Fig. 20).

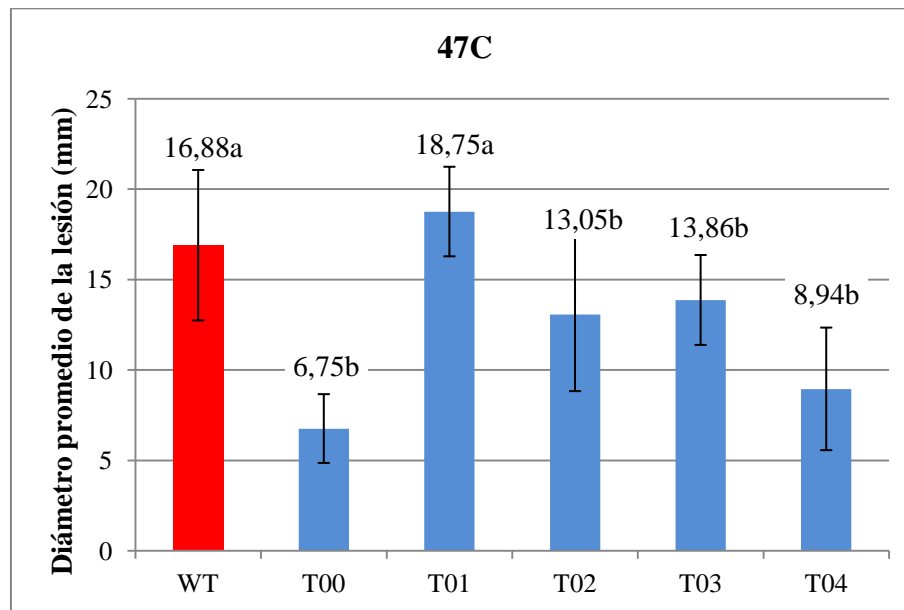


Fig. 20: Diámetros promedio de lesión familia WT 47C y sus 5 mutantes (T00, T01, T02, T03 y T04). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La barra roja representa al WT, mientras que las azules corresponden a los mutantes obtenidos a partir de éste WT.

Si bien no se presentaron grandes diferencias numéricas en el diámetro de la lesión de los aislados de este grupo, las herramientas estadísticas permiten la detección de dos mutantes estadísticamente distintos, mostrando una hipovirulencia respecto su WT (1E00 y 1E04) (Fig. 21).

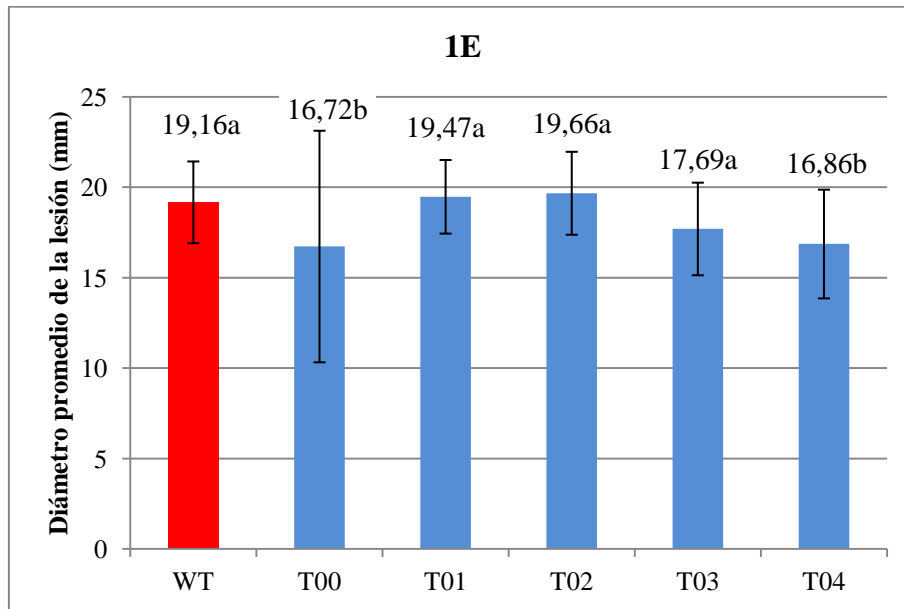


Fig. 21: Diámetros promedio de lesión familia WT 1E y sus 5 mutantes (T00, T01, T02, T03 y T04). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La barra roja representa al WT, mientras que las azules corresponden a los mutantes obtenidos a partir de éste WT.

El WT de este grupo presentó valores inferiores a todos los mutantes obtenidos de su transformación. A pesar de los resultados los promedios de los mutantes se encuentran dentro del rango del resto de los aislados analizados, es el tipo WT el que tiene el valor promedio más bajo (Fig. 22). Existen diferencias estadísticamente significativas de los mutantes respecto al WT ($p > 0,05$).

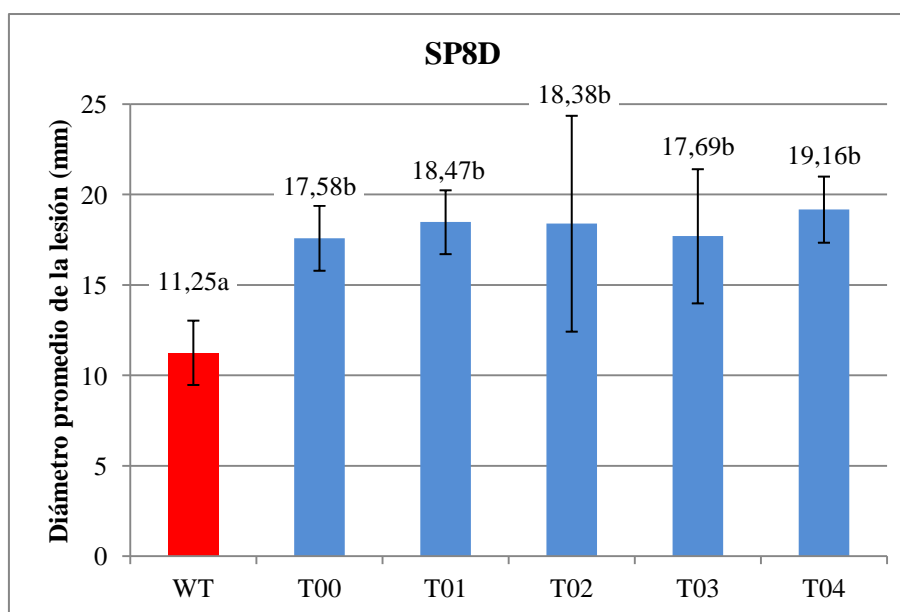


Fig. 22: Diámetros promedio de lesión familia WT 1E y sus 5 mutantes (T00, T01, T02, T03 y T04). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La barra roja representa al WT, mientras que las azules corresponden a los mutantes obtenidos a partir de éste WT.a

Este es el grupo de aislados con valores más altos de diámetro de lesión. Con promedios superiores a 22 mm en 48 hrs y representa a los aislados más agresivos. Los valores numéricos son bastantes similares, sin embargo, el aislado 33AR04 estadísticamente es inferior a su WT (Fig. 23).

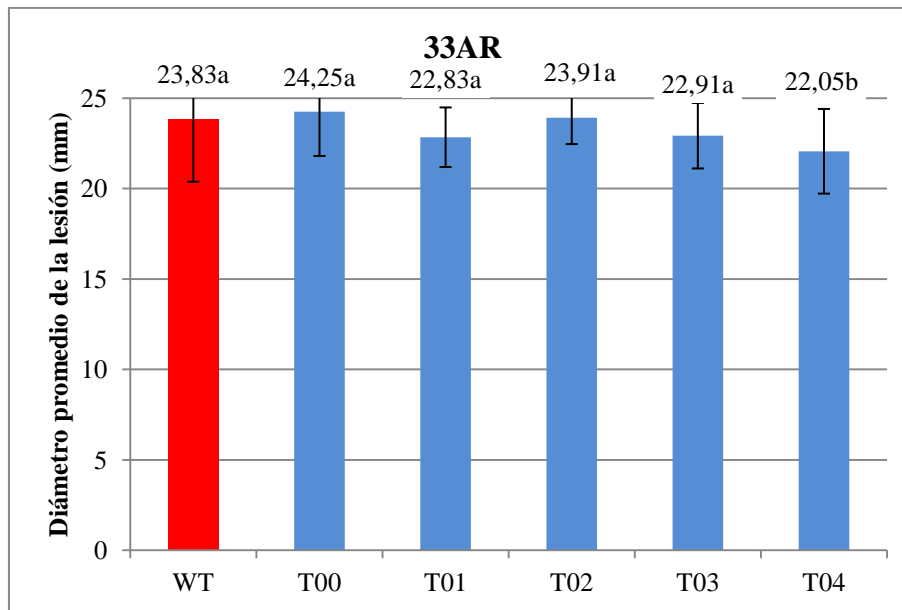


Fig. 23: Diámetros promedio de lesión familia WT 33AR y sus 5 mutantes (T00, T01, T02, T03 y T04). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La barra roja representa al WT, mientras que las azules corresponden a los mutantes obtenidos a partir de éste WT.

Este aislado presenta valores muy similares entre los mutantes y su WT. Sin embargo, los aislados 67S00 y 67S01 presentan valores inferiores con diferencias significativas respecto a su WT.

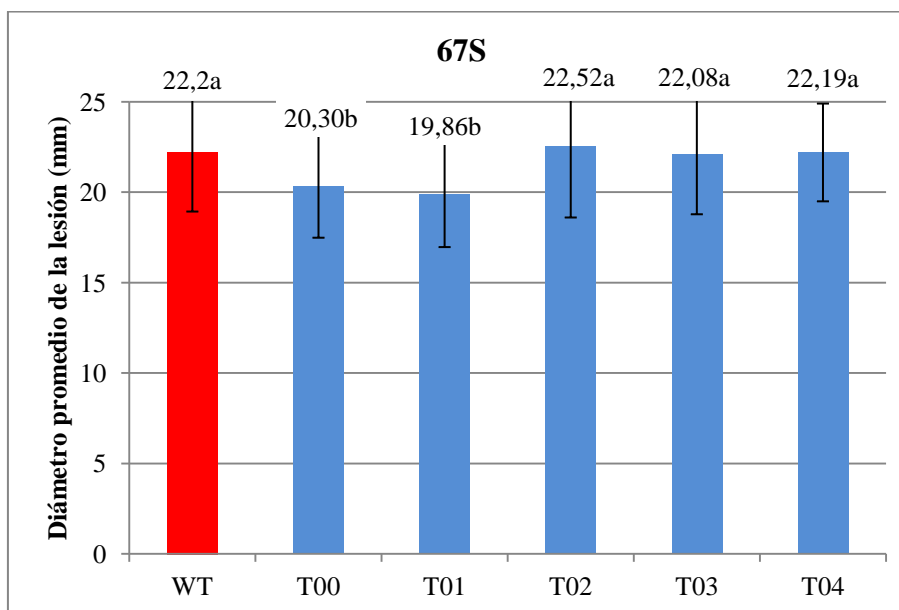


Fig. 24: Diámetros promedio de lesión familia WT 67S y sus 5 mutantes (T00, T01, T02, T03 y T04). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La barra roja representa al WT, mientras que las azules corresponden a los mutantes obtenidos a partir de éste WT.

El aislado 53S01 es el aislado con menor diámetro promedio de lesión de todos los aislados analizados. Por otro lado, el aislado 53S02 superó los valores promedio de lesión de su WT. Ambos (hipo e hipervirulencia), son estadísticamente distintos con respecto a su WT (Fig. 25).

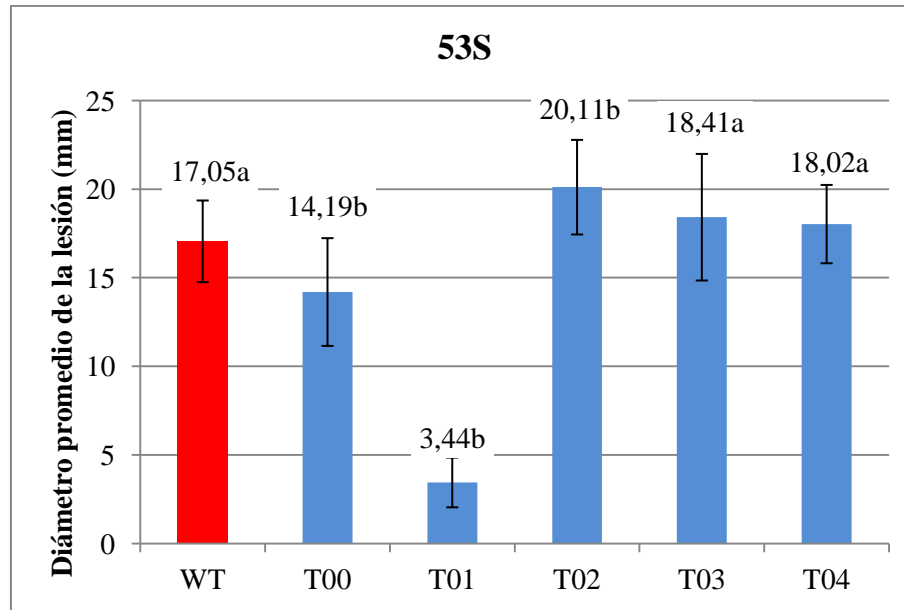


Fig. 25: Diámetros promedio de lesión familia WT 53S y sus 5 mutantes (T00, T01, T02, T03 y T04). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La barra roja representa al WT, mientras que las azules corresponden a los mutantes obtenidos a partir de éste WT.

Pruebas de sensibilidad a fungicidas.

Las pruebas de sensibilidad a fungicidas por inhibición del crecimiento micelial para las moléculas fenhexamid e iprodione, dieron como resultado la mantención, por parte de los aislados mutantes, de las características de resistencia o sensibilidad a las moléculas, según correspondiera con el aislado original o WT. La inserción de los genes *sgfp* y *hph* debido a la transformación genética, tienen una menor probabilidad de establecerse en medio de una secuencia específica única que altere el comportamiento fenotípico del aislado frente al fungicida. En cambio, los aislados de fenotipo multidroga se caracterizan por presentar mutaciones que afectan familias de genes que codifican para proteínas de membrana que detoxifican internamente la célula fúngica mediante la expulsión de las moléculas, independiente el modo o sitio de acción o sitio de acción de ésta.

Todos los aislados con resistencia multidroga presentaron diferencias en los parámetros analizados en relación a sus respectivos WT. El WT aislado multidrogas(1E) tiene sensibilidad a fenhexamid y resistencia a iprodione. Sin embargo, los aislados 1E01, 02 y 04 fueron resistentes a fenhexamid. En iprodione, 1E00, 02 o 03 se tornaron sensibles a la molécula (Cuadro 7).

Sin embargo, y a pesar de estas variaciones, los aislados del tipo multidroga al ser analizados mediante la observación y caracterización de la elongación del tubo germinativo frente a diversas concentraciones y distintas moléculas fungicidas (test multidroga) se determinó la no existencia de diferencias entre la condición multidroga presentada antes y después del proceso de transformación (Cuadro 8).

Cuadro 7: Valores promedio de CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) de los aislados con fenotipo multidroga.

<i>Aislados</i>	<i>Valor CE₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Categorización/Fenotipo</i>	<i>Valor CE₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Categorización/Fenotipo</i>
1E WT	0,09791	Sensible	1,0034	Resistente
1E 00	0,08961	Sensible	0,4833	Sensible
1E 01	0,1747	Resistente	1,5545	Resistente
1E 02	0,1125	Resistente	0,6796	Sensible
1E 03	0,08337	Sensible	0,9761	Sensible
1E 04	0,1934	Resistente	1,2573	Resistente

Cuadro 8: Resultados prueba de multidroga aislados familia 1E.

	<i>1E WT</i>	<i>1E 00</i>	<i>1E 01</i>	<i>1E 02</i>	<i>1E 03</i>	<i>1E 4</i>
Testigo AA	+	+	+	+	+	+
fludioxonil	+	+	+	+	+	+
iprodone	-	-	+	-	-	+
Testigo PG	+	+	+	+	+	+
pyrimethanil	+	+	-	+	+	+
fenhexamid 0,4 (µg/ml)	-	-	-	-	-	-
fenhexamid 4 (µg/ml)	-	-	-	-	-	-
fenhexamid 10 (µg/ml)	-	-	-	-	-	-
tolnaftato	+	+	+	+	+	+
Fenotipo MDR	MDR1	MDR1	MDR1	MDR1	MDR1	MDR1

(+): Conidias germinadas

(-): Conidias no germinadas

Testigo AA: Medio Agar-Agua sin fungicida

Testigo PG: Medio Glucosa-Fosfato sin fungicida

Los aislados 67S01, 67S02, A2R3+00 y A2R3+01 se comportaron como resistentes a iprodione, mientras que su WT, es sensible.

Por otro lado, los aislados 21FR3+01, 21FR3+03 se comportaron sensibles a fenhexamid siendo su WT resistente y, por el contrario, los aislados 47C00, 47C03 y 47C04 se comportaron resistentes siendo su WT sensible.

De acuerdo a la prueba estadística χ^2 no existen diferencias estadísticas entre ambas moléculas en cuanto al cambio en la categoría de sensibilidad ($p > 0,05$; $p = 0,192$).

Un alto porcentaje, en ambas moléculas se mantuvo sin variaciones con respecto a su categoría original de sensibilidad del WT. (85,2% y 87% sin modificaciones en las moléculas Fenhexamid e Iprodione, respectivamente).

En fenhexamid se presenta un porcentaje mayor de aislados que pasan de sensibles a resistentes a la molécula (11,1%), mientras que en iprodione este porcentaje es mucho menor (3,7%).

Sólo un 9,3% de los aislados pasaron de una condición inicial de resistencia a iprodione a mayor sensibilidad (Fig. 26).

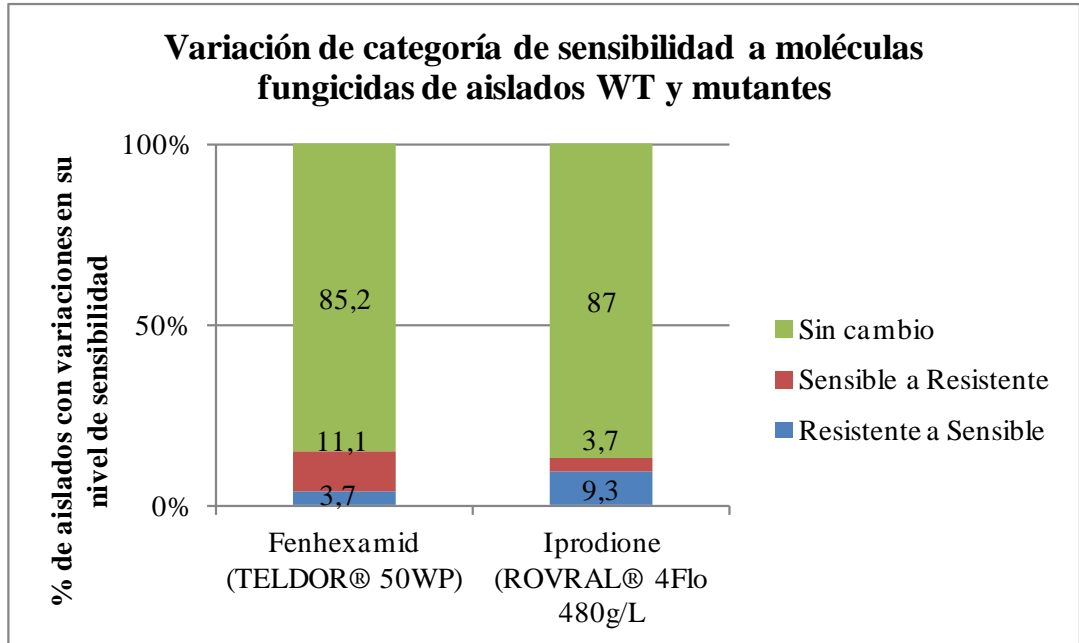


Fig. 26: Variación de categoría de sensibilidad a los fungicidas fenhexamid e iprodione, entre los aislados WT y los mutantes.

Finalmente, la concentración de todos los resultados obtenidos en las pruebas de evaluación WT-mutantes se detallan en el cuadro 9.

En el Cuadro 9 se destacan a color aquellos aislados que, considerando todos los antecedentes comparativos entre los aislados transformados y sus correspondientes WT, no mostraron diferencias significativas en los aspectos fenotípicos y genéticos evaluados lo que permite considerarlos en futuros estudios epidemiológicos. Estos corresponden a los resistentes a iprodione (33AR00, 33AR01, 33AR02, 33AR03) y sensibles a la esta molécula (67S03 y 67S04). Por otro lado, el resistente a fenhexamid, aislado ANP2C00 y el sensible a esta molécula 47C01, no variaron respecto a su WT en ninguno de los criterios evaluados.

Cuadro 9: Resumen de los resultados obtenidos en cada uno de los criterios comparativos entre WT y mutantes						Variaciones respecto de su WT en los aspectos:							
						Morfológicos			Fenotípicos Categoría sensibilidad a fungicida				
Aislado Mutante	GFP*	<i>hph</i> *	<i>sgfp</i> *	Estabilidad mitótica*	Genotipo*	M*	E*	NE*	CFE*	Fenh.*	Ipro.*	MDR*	Virulencia*
33AR00*	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
33AR01*	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
33AR02*	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
33AR03*	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
33AR04	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
SP8D00	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
SP8D01	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	+	-	-	-	-	+
SP8D02	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	+	+	+	-	-	-	+
SP8D03	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	+	+	+	-	-	-	+
SP8D04	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	+	-	-	-	-	+
53S00	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
53S01	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
53S02	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	+	-	-	-	-	+
53S03	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	+	-	+	-	-	-	-
53S04	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	+	-	+	-	-	-	-
67S00	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
67S01	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	+	-	+
67S02	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
67S03*	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
67S04*	+	+	+	+	<i>transposa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 9: Resumen resultados transformación genética.

*GFP: Expresión de la proteína verde fluorescente; *hph*: presencia de resistencia a higromicina; *sgfp*: presencia del gen de la proteína GFP en el genoma del hongo; estabilidad mitótica es la mantención de la fluorescencia y resistencia a higromicina aún en medio no selectivo; M: tipo miceliar; E: tipo esclerocial; NE: Nivel de esporulación; CFE: capacidad formadora de esclerocios; Fenh: Fenhexamid; Ipro: Iprodione; MDR: Resistencia a multidroga.

Aislado Mutante	Cuadro 9 (continuación): Resumen de los resultados obtenidos en cada uno de los criterios comparativos entre WT y mutantes					Variaciones respecto de su WT en los aspectos:							
	GFP	hph	sgfp	Estabilidad mitótica	Genotipo	Morfológicos				Fenotípicos			
						M	E	NE	CFE	Categoría sensibilidad a fungicida			
										Fenh.	Ipro.	MDR	Virulencia
ANP2C00*	+	+	+	+	transposa	-	-	-	-	-	-	-	-
ANP2C01	+	+	+	+	transposa	+	-	-	-	-	-	-	-
ANP2C02	+	+	+	+	transposa	+	-	-	-	-	-	-	+
ANP2C03	+	+	+	+	transposa	-	+	-	+	-	-	-	-
ANP2C04	+	+	+	+	transposa	+	-	-	-	-	-	-	+
A2R3+00	+	+	+	+	transposa	-	+	-	+	-	+	-	-
A2R3+01	+	+	+	+	transposa	-	+	+	+	-	+	-	+
A2R3+02	+	+	+	+	transposa	-	+	-	+	-	-	-	-
A2R3+03	+	+	+	+	transposa	-	+	-	+	-	-	-	-
A2R3+04	+	+	+	+	transposa	-	+	-	+	-	-	-	-
21FR3+00	+	+	+	+	transposa	-	-	-	-	-	-	-	+
21FR3+01	+	+	+	+	transposa	-	-	+	-	+	-	-	+
21FR3+02	+	+	+	+	transposa	-	+	+	+	-	-	-	+
21FR3+03	+	+	+	+	transposa	-	+	+	+	+	-	-	-
21FR3+04	+	+	+	+	transposa	-	-	+	-	-	-	-	-
1E 00	+	+	+	+	transposa	-	+	-	+	-	+	-	+
1E 01	+	+	+	+	transposa	-	+	-	+	+	-	-	-
1E 02	+	+	+	+	transposa	-	+	-	+	+	+	-	-
1E 03	+	+	+	+	transposa	+	+	-	+	-	+	-	-
1E 04	+	+	+	+	transposa	-	+	-	+	+	-	-	+
47C00	+	+	+	+	transposa	-	-	-	-	+	-	-	+
47C01*	+	+	+	+	transposa	-	-	-	-	-	-	-	-
47C02	+	+	+	+	transposa	-	-	-	-	-	-	-	+
47C03	+	+	+	+	transposa	-	-	-	-	+	-	-	+
47C04	+	+	+	+	transposa	-	-	-	-	+	-	-	+

CONCLUSIONES

La transformación genética de *Botrytis cinerea* se puede realizar de manera eficiente con el uso de la bacteria *Rhizobium radiobacter* (= *Agrobacterium tumefaciens*).

Se estandarizó el protocolo que optimiza el uso de la combinación cepa bacteriana: plásmido (GV3101:pCAMgfp) en el proceso de transformación genética mediada por *Rhizobium radiobacter*.

El total de los aislados transformados analizados mantuvo las características de fluorescencia y resistencia a higromicina, por lo que este tipo de transformación resulta en una alta estabilidad mitótica.

La categorización genotípica de los aislados transformados no se mostró afectada por los procesos de transformación genética, manteniéndose la correspondencia genotípica inicial en todos los aislados transformados.

La inserción azarosa de genes de interés en el genoma de *Botrytis cinerea* genera alteraciones morfo-fisiológicas que deben ser consideradas en próximos estudios epidemiológicos a desarrollarse con estos aislados.

Dentro de las alteraciones evidenciadas destaca la disminución en la agresividad de ciertos aislados (hipovirulencia) que podrían permitir la identificación de algunos de los genes involucrados con los mecanismos de virulencia del hongo.

Por otro lado, como resultado de la transformación genética se obtuvieron aislados que no variaron respecto de sus WT en ninguno de los parámetros evaluados. Éstos son una valiosa herramienta biotecnológica para ser utilizados en estudios de epidemiología de la principal enfermedad que afecta a la vid..

BIBLIOGRAFÍA

- Aboul-soud, M. A. Byung-wook Yun, L. Harrier, and G. Loake. 2004. Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterization of the resulting transformants expressing a GFP transgene. *Mycopathologia* 158: 475–482.
- Agrios, G. 2001. Fitopatología. 2 Edición. Edit. UTEHA-Noriega. México. 838 p.
- Anco, D. J., S. Kim, T. Mitchell, L. Madden, and M. Ellis. 2009. Julio. Transformation of *Phomopsis viticola* with the green fluorescent protein. *Mycologia* 101 (6): 853–858.
- Auger, J. y M. Esterio. 1997. Control integrado de *Botrytis cinerea* Pers. en vid (*Vitis vinifera* L.) 14-25 p. En: Esterio, M y J. Auger. 1997. Botrytis: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago, Chile. 125 p.
- Bainbridge, B., C. Spreadbury, F. 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*. 54 (1-3): 113–117
- Balint-Kurti, P., G. May, and A. Churchill. 2001. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. *FEMS Microbiology* 195: 9–15.
- Bent, A. 2006. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. In: Wang K, editor. *Agrobacterium* Protocols. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 87–103 p.
- Brooks, C., and J. Cooley. 1917. Temperature relations of apple-rot fungi. *Journal of Agricultural Research*. 8 (4): 139–169.
- Butin, H. y H. Peredo. 1986. Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile. Bibliotheca Mycologica. Ed. Cramer, Berlín, Alemania. 100 p.
- Calero, F., D. Córdoba, M. Roncero, C. Hera y A. Di Pietro. 2008. Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) para el estudio de los hongos fitopatógenos. (cap. 16, 285-292). En: Pallás, V. C. Escobar, P. Rodríguez, J. Marcos. 2008. Herramientas biotecnológicas en fitopatología. Ediciones Mundo Prensa. España. 464 p.
- Chapeland, F., R. Fritz, C. Lanen, M. Gredt, and P. Leroux. 1999. Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). *Pesticide biochemistry and physiology*. 64: 85-100.

- Chen, N., and T. Hsiang. 2003. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. *Journal of Microbiological Methods*. 53: 113 – 122.
- Chiu, W., Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi, and J. Sheen. 1996. Marzo. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*. 6 (3): 325–30.
- Coley-Smith J., K. Verhoeff and W. Jarvis. 1980. The Biology of *Botrytis*. Academic Press, London, UK. 318 p.
- Collinge, D., H. Jorgensen, O. Lund, and M. Lyngkjaer. 2010. Septiembre. Engineering pathogen resistance in crop plants: current trends and future prospects. *Annual Review of Phytopathology*. 48: 269–91.
- Cormack, B., G. Bertram, M. Egerton, N. Gow, S. Falkow, and J. Brown. 1997. Febrero. Yeast-enhanced green fluorescent protein (YEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143: 303–11.
- Curvers, K., H. Seifi, G. Mouille, R. Rycke, B. Asselbergh, A. Hecke, D. Vanderschaeghe, *et al.*, 2010. Octubre. Abscisic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. 154 (2) 847–60.
- De Groot, M., P. Bundock, P. Hooykaas, and A. Beijersbergen. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16 (9): 839–842.
- De la Riva, G., J. González-Cabrera, R. Vázquez-Padrón and C. Ayra-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1 (3): 1–16.
- De Silva, A., M. Bolton, and B. Nelson. 2009. Junio. Transformation of *Sclerotinia sclerotiorum* with the green fluorescent protein gene and fluorescence of hyphae in four inoculated hosts. *Plant Pathology*. 58 (3):487–496.
- De Wet, J., K. Wood, M. DeLuca, D. Helinski, and S. Subramani. 1987. Febrero. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*. 7(2): 725–37.
- Diolez, A., F. Marches, D. Fortini, and Y. Brygoo. 1995. Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (1): 103–108.

- Droby S., A. Lichter. 2007. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. (cap. 19, 349-367 pp.). In: Elad, Y, P. Tudzynski, and N. Delen (Ed). 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. The Netherlands. Springer. 412 p.
- Du, W., Z. Huang, J. Flaherty, K. Wells, and G. Payne. 1999. Febrero. Green fluorescent protein as a reporter to monitor gene expression and food colonization by *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (2): 834–6.
- Eckert, M., K. Maguire, M. Urban, S. Foster, B. Fitt, J. Lucas, and K. Hammond-Kosack. 2005. Diciembre. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene *dsred* and the jellyfish gene *gfp*. *FEMS Microbiology Letters*. 253 (1): 67–74.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen. 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer. The Netherlands. 412 p.
- 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*) in Chile. 29 p. En: II Reunión de Biología Vegetal. Santiago, Chile. Noviembre 5 y 6, 2007. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Esterio, M., Muñoz, G., Ramos, C., Cofré, G., Estévez, R., Salinas, A., and Auger, J. 2011. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates present in Thompson seedless table grapes in the central valley of Chile. *Plant Disease*. 95:683-690.
- Fernández-Abalos, J., H. Fox, C. Pitt, B. Wells, and J. Doonan. 1998. Enero. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 27 (1): 121–30.
- Fillinger, S., P. Leroux, C. Auclair, C. Barreau, C. Al Hajj, and D. Debieu. 2008. Noviembre. Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (11): 3933–40.
- Goh, T. 1999. Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Fungal Diversity*. 2:47-63.

- González, G., M. Moya, C. Sandoval, and R. Herrera. 2009. Genetic diversity in Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*): differential response to *Botrytis cinerea* infection. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 7 (4): 886–895.
- Gooch, V., A. Mehra, L. Larrondo, J. Fox, M. Touroutoudis, J. Loros, and J. Dunlap. 2008. Enero. Fully codon-optimized luciferase uncovers novel temperature characteristics of the *Neurospora* clock. *Eukaryotic Cell*. 7 (1): 28–37.
- Grunewaldt-Stöcker, G., N. Riediger, and C. Dietrich. 2007. Suitability of GFP-transformed isolates of the fungal root endophyte *Acremonium strictum* W. Gams for studies on induced *Fusarium*-wilt resistance in flax. *Plant Root*. 1: 46–56.
- Hamada, W., and P. Malfatti. 1997. Stability and modulated expression of a hygromycin resistance gene integrated in *Botrytis cinerea* transformants. *FEMS Microbiology Letters*. 154:187-193.
- Hammer, T., M. Thines, and O. Spring. 2007. Febrero. Transient expression of GFP in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* using electroporation and a mechano perforation method. *Plant Pathology*. 56 (1): 177–182.
- Helber, N., and N. Requena. 2008. Enero. Expression of the fluorescence markers DSRED and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *The New Phytologist*. 177 (2): 537–48.
- Holz, G., M. Gütschow, S. Coertze, and F. Calitz. 2003. Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunches of grape. *Plant Disease*. 87 (4): 351–358.
- Horowitz, S., S. Freeman, and A. Sharon. 2002. Julio. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*. 92 (7): 743–9.
- Inglis, P., F. Aragao, H. Frazao, B. Magalhaes, and M. Valadares-Inglis. 2000. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. *FEMS Microbiology*. 191:249–254.
- Jarvis, W. (1977) *Botrytinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology, and pathogenicity, a guide to the literature. *Monograph No. 15*, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.

- Jefferson, R., T. Kavanagh, and M. Bevan. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*. 6 (13): 3901–3907.
- Kaufman, G., B. Horwitz, R. Hadar, Y. Ullmann, and I. Berdicevsky. 2004. Agosto. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker for pathogenic development of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *Microbiology (Reading, England)* 150: 2785–90.
- Keller, M., O. Viret, and F. Cole. 2003. Marzo. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology*. 93 (3): 316–22.
- Koncz, C., J. Schell. 1986. The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetic*. 204:383–396.
- Kretschmer, 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.
- Kretschmer, M., M. Leroch, A. Mosbach, A. Walker, S. Fillinger, D. Mernke, *et al.*, 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*. 5 (12): 13.
- Kunik, T., T. Tzfira, Y. Kapulnik, Y. Gafni, C. Dingwall, and V. Citovsky. 2001. Febrero. Genetic transformation of *HeLa* cells by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (4): 1871–6.
- Lagopodi, A., A. Ram, G. Lamers, P. Punt, C. Van den Hondel, B. Lugtenberg, and G. Bloemberg. 2002. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *The American Phytopathological Society*. 15 (2): 172–179.
- Latorre, B. 2002. Diciembre. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*. 21 (10): 957–961.
- Leroux, P. *et* M. Gredt, 1981. Méthode de detection de la résistance de *Botrytis cinerea* Pers, aux fongicides, a partir d'échantillons prélevés dans le vignoble. *Phytiatrie-Phytopharmacie*. 30: 57 - 68.

- Leroux, P., F. Chapeland, D. Desbrosses, and M. Gredt, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*. 18(10):687-697.
- Levis, C., D. Fortini, and Y. Brygoo. 1997. Flipper, a mobile FOT1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular General Genetics*. 254 (6): 674–680.
- Li, W., G. Guo, and G. Zheng. 2000. Septiembre. *Agrobacterium*-mediated transformation: state of the art and future prospect. *Chinese Science Bulletin*. 45 (17): 1537–1546.
- Li, X., T. Zhou, and H. Yu. 2006. Transformation of *Botrytis cinerea* with a green fluorescent protein (GFP) gene for the study of host-pathogen interactions. *Plant Pathology Journal*. 6 (2): 134–140.
- Lorang, J., R. Tuori, J. Martinez, T. Sawyer, R. Redman, J. Rollins, *et al.*, (2001). Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(5), 1987-1994.
- Ma, Z., L. Yan, Y. Luo and T. Michailides. 2007. Sequence variation in the two component histidina kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88(3):300-306.
- Maor, R., M. Puyesky, B. Horwitz, and A. Sharon. 1998. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research*. 102 (4): 491–496.
- Martinez, F., D. Blancard, P. Lecomte, and C. Levis. 2003. Phenotypic differences between vacuola and transposon subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 479–488.
- McClellan, W., and W. Hewitt. 1973. Early *Botrytis* rot grapes: time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. *Phytopathology*. 63: 1151–1157.
- Mercader, G., S. Flores, and G. Vargas. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque*. 27 (2): 126–134.
- Michailides, T. 1996. Using incidence of *Botrytis cinerea* in kiwifruit sepals and receptacles to predict gray mold decay in storage. *Plant Disease*. 80 (3): 248–254.
- Michielse, C., P. Hooykaas, C. Hondel, and A. Ram. 2005. Julio. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*. 48 (1): 1–17.

- Michielse, C., P. Hooykaas, C. Hondel, and A. Ram. 2008. Enero. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols*. 3 (10): 1671–8.
- Mullins, E. 2001. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58: 2043– 2052.
- Muñoz, G., P. Hinrichsen, and M. Alvarez. 1999. Variabilidad genética de cepas de *Botrytis cinerea* provenientes de vid y tomate con resistencia a dicarboximidas. *Agricultura Técnica (Chile)*. 59 (1): 1–12.
- Muñoz, G., P. Hinrichsen, Y. Brygoo, and T. Giraud. 2002. Mayo. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research*. 106 (5): 594–601.
- Myresiotis, C., G. Karaoglanidis, and K. Tzavella-Klonari. 2007. Abril. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*. 91 (4): 407–413.
- Nair, N. and R. Allen. 1993. Infection of grapes flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Mycological Research*. 97: 1012-1014.
- Pastor, E. 1980. Período de infección y latencia de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. en *Vitis vinifera* L. cv. Sultanina. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 70 p.
- Pezet, R. and V. Pont. 1986. Infection florale et latence de *Botrytis cinerea* dans les grapes de *Vitis vinifera* (var. Gamay). *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 18: 317-322.
- Prasher, D., V. Eckenrode, W. Ward, F. Prendergast, and M. Cormier. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111 (2): 229–233.
- Rajaguru, B. 2008. Molecular ecology of *Botrytis cinerea*. PhD thesis, University of Reading. UK. 145 p.
- Riedel, M., G. Calmin, L. Belbahri, F. Lefort, M. Götz, S. Wagner, and S. Werres. 2009. Green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora ramorum*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 56 (2): 130–5.
- Rolland, S, C. Jobic, and M. Fevre. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-

based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Current Genetics*. 44:164–171.

Ryder, N., I. Frank, and M. Dupont. 1986. Ergosterol biosynthesis inhibition by the thiocarbamate antifungal agents tolnaftate and tolclolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 29 (5) (May 1): 858–860.

Sesma A., and A. Osbourn (2004). The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature*. 431:582-586.

Shimomura, O. 1979. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letters*. 104 (2): 220–222.

Spellig, T., A. Bottin, and R. Kahmann. 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular General Genetics*. 252 (5): 503–509.

Staats, M. 2007. *Botrytis* species on flower bulb crops: phylogeny, genetic variation and host specificity. Thesis to PhD in Plant Pathology. Graduate School of Experimental Plant Sciences at the Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, The Netherlands. 168p.

Tinland, B., B. Hohn, and H. Puchta. 1994. Agosto. *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 8000–8004.

Topolovec-Pintarić, S. 2011. Resistance to Botryticides. In: Resistance to botryticides, fungicides - beneficial and harmful aspects, edited by Nooruddin Thajuddin, 26. Croatia.

Tzfira, T., J. Li, B. Lacroix, and V. Citovsky. 2004. Agosto. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics*. 20 (8): 375–83.

Vallad, G., and K. Subbarao. 2008. Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*. 98 (8): 871–85.

Verhoeff K., N. Malathrakis and B. Williamson. 1992. Recent advances in *botrytis* research. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands. 294 p.

Visser, M., T. Gordon, and B. Wingfield. 2004. Transformation of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, causal agent of *Fusarium* wilt of banana, with the green fluorescent protein (GFP) gene. *Australasian Plant Pathology*. 33: 69–75.

- Weber, R. 2011. Occurrence of Hyd R3 fenhexamid resistance among *Botrytis* isolates in northern german soft fruit production. *Journal of Plant Diseases and Plant Protection*. 117 (4): 177–179.
- Weigel, D., and J. Glazebrook. *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. 354 p.
- West, J., S. Pearson, P. Hadley, E. Wheldon, F. Davis, A. Gilbert, and R. Henbest. 2000. Abril. Spectral filters for the control of *Botrytis cinerea*. *Annals of Applied Biology*. 136 (2): 115–120.
- Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, and J. van Kan. 2007. Septiembre. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. 8 (5): 561–80.
- Wise A., Z. Liu, A. Binns. 2006. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Methods in Molecular Biology*. 343:43–54.
- Young, J., L. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr, and H. Sawada. 2001. Enero. A revision of *Rhizobium* Frank, 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.*, 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 89–103.
- Young, J., S. Pennycook, and D. Watson. 2006. Febrero. Proposal that *Agrobacterium radiobacter* has priority over *Agrobacterium tumefaciens*. Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 491–3.
- Zupan, J., T. Muth, O. Draper, and P. Zambryski. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants : a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*. 23 (1): 11–28.