



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS ESCUELA DE POSTGRADO

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis cinerea* DE
DISTINTO NIVEL DE SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS INHIBIDORES DE SDH EN
ARÁNDANOS**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS MENCIÓN SANIDAD VEGETAL**

**GEOVANNY ELIZABETH JULCA MENDOZA
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

Directores de Tesis

MARCELA ESTERIO GREZ
JAIME AUGER SAVEEDRA

Profesores Consejeros

JOSE LUIS HENRIQUEZ S.
NICOLA FIORE

Santiago - Chile
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS ESCUELA
DE POSTGRADO

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis cinerea* DE
DISTINTO NIVEL DE SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS INHIBIDORES DE SDH EN
ARÁNDANOS

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al
Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias con Mención Sanidad Vegetal

GEOVANNY ELIZABETH JULCA MENDOZA

Calificaciones

DIRECTORES DE TESIS

MARCELA ESTERIO GREZ
Ingeniero Agrónomo, Mg. Cs.

Aprobada

JAIME AUGER SAVEEDRA
Ingeniero Agrónomo, MS, Ph.D.

Aprobada

PROFESORES CONSEJEROS

JOSE LUIS HENRIQUEZ S.
Ingeniero Agrónomo, MS, Ph.D.

Aprobada

NICOLA FIORE
Ingeniero Agrónomo, Dr.

Aprobada

Santiago - Chile
2016

A Paula, Eduardo, Jesús, Lidia y Reyna.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Dios por permitirme dar cada paso en cada etapa de mi vida y permitir llegar al término de este ciclo.

Agradecer al gobierno de Perú que, a través del programa nacional de becas (PRONABEC) tuve la oportunidad de realizar mis estudios de magíster adquiriendo conocimientos en el área molecular y de fitopatología.

Al Proyecto InnoVaChile de CORFO/FDF/ ASOEX, Comité de Arándanos de Chile – U. de Chile.

A mis profesores guías Marcela y Jaime, quienes confiaron en mi persona y me permitieron desarrollar esta investigación en el laboratorio a su cargo por su paciencia, compromiso y por sus consejos durante toda esta etapa.

Gracias a Lorena quien fue parte importante del inicio y desarrollo de esta investigación y en mi formación en el área molecular.

A mis profesores José Luis y Nicola Fiore por la disposición recibida y consejos durante mi etapa de estudiante y para la redacción de la tesis.

A Alan por sus oportunos consejos y colaboración en la interpretación de los resultados, de esta tesis.

A mi madre, a quién le debo el haber empezado esta nueva etapa y todo lo que he logrado hasta el momento, a Sabino, por sus enseñanzas, cariño y paciencia en todo este tiempo.

A mis compañeros de laboratorio y amigos María José, Verónica, Charleen, Isabel, Mauricio, Simón, Carlos, Nicolás, Marcelo y Lissette, quienes de una manera u otra aportaron en el desarrollo de la tesis.

A mi familia en Perú y a todos quienes creyeron en mí.

ÍNDICE

RESISTENCIA A FUNGICIDAS SDHI EN <i>Botrytis cinerea</i>	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
Morfología y Epidemiología de <i>Botrytis cinerea</i>	1
Control químico de <i>Botrytis cinerea</i>	1
Uso de fungicidas SDHI para el control de <i>Botrytis cinerea</i>	2
Resistencia a Inhibidores del complejo mitocondrial II	3
Genes de <i>Botrytis cinerea</i> asociados a la resistencia a fungicidas SDHIs	4
Capacidad de adaptabilidad de aislados de <i>Botrytis cinerea</i>	6
Detección de mutaciones en aislados de <i>Botrytis cinerea</i> mediante uso de PCR	7
<i>Botrytis cinerea</i> en arándano	7
LITERATURA CITADA.....	9
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE <i>Botrytis cinerea</i> DE DISTINTO NIVEL DE SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS INHIBIDORES DE SDH Y EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE CAPACIDAD DE ADAPTABILIDAD.....	14
RESUMEN.....	15
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN.....	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS.....	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Ubicación del estudio	20
Fungicidas	20
Metodología.....	20
Sensibilidad a boscalid, fluopyram e isofetamida	22
Evaluación de la capacidad de adaptabilidad de aislados de <i>Botrytis cinerea</i> resistentes a SDHIs	23
Virulencia de los aislados de <i>Botrytis cinerea</i> con cambios aminoacídicos en las subunidades del complejo SDH.....	24
Análisis estadístico	24
RESULTADOS	25
Caracterización genética de los aislados seleccionados de <i>Botrytis cinerea</i> de distinto nivel de sensibilidad a boscalid	25

Sensibilidad a boscalid, fluopyram e isofetamida	29
Evaluación de la capacidad de adaptabilidad de aislados de <i>Botrytis cinerea</i> resistentes a SDHs	33
Virulencia de los aislados de <i>Botrytis cinerea</i> con cambios aminoacídicos en las subunidades del complejo SDH.....	36
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	42
LITERATURA CITADA.....	43
APÉNDICES	47
ANEXO	51

CAPITULO I

RESISTENCIA A FUNGICIDAS SDHI EN *Botrytis cinerea*

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Morfología y Epidemiología de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers. es uno de los patógenos fúngicos más interesante por sus características particulares, puede vivir como patógeno; pero también saprofiticamente, se puede encontrar en todo el mundo y puede infectar un gran número de especies de plantas y sus diferentes partes. *B. cinerea* pertenece al phylum Ascomycota, clase Leotiomycetes, orden Helotiales (Hibbett et al., 2007). *B. cinerea* es el nombre de la fase asexual y en su fase teleomórfica corresponde a *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (Groves and Loveland, 1953), presenta un micelio con hifas septadas, con poros simples, su crecimiento hifal es en ramificaciones con abundante producción de conidias heterocarióticas hialinas a levemente coloreadas formadas sobre conidióforos (Agris, 1997). En un comienzo el micelio es hialino y luego se torna gris, debido a ello es que se ha denominado a la enfermedad con el nombre de “pudrición gris” (Harvey, 1955).

Botrytis cinerea tiene un estilo de vida necrotrófico, forma una variedad de estructuras de penetración, incluyendo apresorio y espiga de penetración con los cuales invade la epidermis del tejido vegetal, produce una gama de enzimas que degradan la pared celular, toxinas y otros compuestos de bajo peso molecular, tales como el ácido oxálico (Salinas et al., 1986; Williamson et al., 2007). Además, *Botrytis* se disemina a través de conidias y puede sobrevivir en tejidos vegetales muertos como micelio o como esclerocios que actúan como estructuras de resistencia del patógeno ante condiciones climáticas desfavorables (Ten Have, 2000).

Puede causar infecciones latentes que manifiestan su acción patogénica en la maduración de la fruta. Climas templados y húmedos favorecen el desarrollo de infecciones por *B. cinerea*, particularmente cuando ocurren eventos de alta humedad relativa (> 95%) y temperaturas templadas (15 a 22 °C) durante los periodos críticos de infección como floración (desde inicio a término) y en fruto, desde pinta o envero a cosecha (sólidos solubles > 8%), (Pastor, 1980; Veloukas and Karaoglanidis, 2012), así como también en poscosecha durante el almacenamiento y transporte a los mercados de destino (Ceponis y Capellini, 1983; Rosslenbroich and Stuebler, 2000).

Control químico de *Botrytis cinerea*

La única forma de lograr un control eficaz de *B. cinerea* es llevando a cabo un manejo integrado, ello conlleva la utilización del control químico conjuntamente con prácticas culturales que disminuyan las condiciones predisponentes para el ataque del patógeno, tales como el exceso de nitrógeno, altas densidades de plantas, uso de variedades de vid de floración prolongada, daño por viento y heladas. Los controles con productos químicos o biológicos deben iniciarse junto con la floración y continuar desde envero a cosecha, en donde el fruto es más susceptible de afectarse. Además, en uva de mesa es importante previo

a cierre de racimo eliminar los restos florales adheridos al fruto, ya que son un buen reservorio de inóculo, pero, en arándanos es una labor difícil de realizar (Auger y Esterio, 1997; Undurraga y Vargas, 2013).

El control químico es la base del manejo de *Botrytis* en los distintos cultivos afectados. Actualmente existe una larga lista de ingredientes activos registrado en diferentes cultivos para controlar el moho gris en pre y poscosecha (Romanazzi y Feliziani, 2014), éstos compuestos activos pertenecen a grupos de moléculas con distinto modo de acción y entre éstos se encuentran los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos, los fungicidas que afectan la transducción de señales (osmorregulación), los inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos, los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol y los fungicidas que afectan a la respiración; dentro de éste último grupo existen ocho subgrupos diferentes siendo los SDHI uno de ellos (FRAC, 2015; Fillinger and Walker, 2016).

Uso de fungicidas SDHI para el control de *Botrytis cinerea*

Entre los fungicidas autorizados que más se han utilizado en el control de *B. cinerea* destacan, la mezcla cyprodinil & fludioxonil, fenhexamid y los inhibidores de la succinato deshidrogenasa mitocondrial (complejo II) conocidos como SDHIs que son el último gran grupo de inhibidores respiratorios que se han utilizado como pesticidas agrícolas y químicamente la mayoría corresponde a carboxamidas (FRAC, 2015).

La enzima succinato deshidrogenasa (SDH) es una enzima anclada a la membrana mitocondrial, participando en el transporte de electrones en la cadena respiratoria, cataliza la reacción de oxidación de succinato a fumarato y la reducción de ubiquinona a ubiquinol (Leroux et al., 2010; Cecchini, 2003). Esta proteína se compone de cuatro subunidades: Las subunidades SDHA y SDHB que forman la parte soluble del complejo, que tiene actividad succinato deshidrogenasa; SDHA es una flavoproteína encargada de catalizar la oxidación de succinato a fumarato mientras que SDHB es una proteína de hierro-azufre que contiene grupos de hierro-azufre responsables de la transferencia de electrones desde el succinato de la ubiquinona. Las otras dos subunidades, SDHC y SDHD, cuentan con el grupo hemo b situado entre dos hélices antiparalelas entre éstas y tienen por función anclar a SDHA y SDHB a la membrana (Leroux et al., 2010; Stammler et al., 2015).

Los inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHIs) son el grupo químico de fungicidas más moderno, se introdujeron alrededor de la década del 60s, hasta el 2009 eran denominadas carboxamidas por su estructura química; pero a partir de ese año cambió a SDHIs considerándose el modo de acción de estas moléculas (inhibición de la succinato deshidrogenasa). Las SDHIs afectan la respiración mitocondrial (inhibición de transporte de electrones / complejo II), impidiendo la formación de ATP, en consecuencia la producción de energía en la célula (Cecchini, 2003; Leroux et al., 2010; FRAC, 2015). Los SDHIs pertenecen a un grupo muy atractivo de fungicidas debido a su historia de uso, a las innovaciones químicas y al espectro de las enfermedades seleccionadas. Su uso masivo en aplicaciones foliares en vides para el control de *B. cinerea* no fue sino hasta mediados del 2000 (FRAC, 2015; Stammler et al., 2015)

Entre las moléculas pertenecientes a este grupo se encuentran boscalid (pyridin-carboxamida), fluopyram (pyridinil ethyl-benzamida) e isofetamida (phenyloxo-ethyl-thiophen amida) (FRAC, 2015). Dentro de las mencionadas, boscalid fue la primera de este grupo que se consideró en los programas preventivos de control de *B. cinerea* a nivel mundial y en Chile (Stammler et al., 2007). Boscalid presenta acción sistémica local translaminar, con efecto preventivo y curativo, eficaz contra la germinación de esporas, la elongación del tubo germinativo y crecimiento del micelio. También se ha utilizado con éxito en el control de otros importantes hongos fitopatógenos tales como: *Alternaria* spp., *Sclerotinia* spp., *Mycosphaerella* spp., *Monilinia* spp. y *Erysiphe* spp. (Stammler, 2008; Stammler et al., 2015).

Resistencia a Inhibidores del complejo mitocondrial II

Botrytis cinerea es considerado un patógeno de alto riesgo de desarrollo de resistencia a los fungicidas debido a su alta variabilidad genética, abundante esporulación, corto tiempo de reproducción, gran número de plantas hospederas y una alta presión de fungicidas por programas inadecuados de control (Leroux et al., 2010). La presión selectiva ejercida por el control químico contra el moho gris induce el desarrollo de aislados resistentes a pesar de que existe un gran número de botryticidas en el mercado agrícola chileno, dificultando su control.

La resistencia es una adaptación estable y heredable y puede ser el resultado de una mutación mono o multigénica, sobreexpresión del sitio activo o eliminación de compuestos tóxicos por la membrana. Estos cambios no solo ocurren como respuesta al uso repetitivo de un mismo fungicida, sino también al uso repetitivo de otros fungicidas relacionados al mismo grupo químico y/o mecanismo bioquímico de acción (Brent, 1995; Leroux et al., 1999; Leroux et al., 2010). De los mecanismos de resistencia mencionados en *B. cinerea*, el principal es la mutación, mecanismo que le otorga una menor sensibilidad frente a una molécula fungicida determinada, principalmente debido a la alteración del sitio de unión del fungicida a la proteína (Panebianco, 2012; Stammler et al., 2015).

Aunque los fungicidas SDHIs son considerados de riesgo medio a alto para el desarrollo de resistencia en los patógenos fúngicos (FRAC, 2015), la primera referencia de pérdida de sensibilidad a boscalid fue reportada en *Alternaria alternata* en pistacho en EE.UU. (Avenot y Michailides, 2007). Posteriormente, también se detectó en aislados de *B. cinerea* en vides y fresa (Leroux et al., 2010); en *Podosphaera xanthii* en cucurbitáceas (McGrath, 2008) y en otros cultivos (McGrath y Miazzi, 2008; Stammler, 2008; Stevenson et al., 2008). En Chile, la primera referencia de pérdida de sensibilidad a boscalid se reportó en 2011, en aislados de *B. cinerea* recuperados desde vides de mesa, los que se comportaron solo como leve a moderadamente resistentes al fungicida (Esterio et al., 2011) y recientemente también en este mismo patógeno en arándano (Esterio et al., 2014).

Genes de *Botrytis cinerea* asociados a la resistencia a fungicidas SDHIs

Las subunidades que conforman la proteína succinato deshidrogenasa se encuentran codificadas por cuatro genes, *sdhA*, *sdhB*, *sdhC* y *sdhD*, en los cuales se ha reportado mutaciones que llevan a un cambio de aminoácidos en las proteínas codificadas, lo que conduce a la pérdida de sensibilidad a los fungicidas SDHIs. La mayoría de estas mutaciones se han detectado en los genes *sdhB* y algunas en los genes *sdhC* y *sdhD*, que codifican para la proteína hierro-azufre y dos subunidades de anclaje del complejo de la succinato deshidrogenasa, respectivamente. Las modificaciones actualmente identificadas que afectan al complejo II de *B. cinerea* se han detectado en otros patógenos resistentes a SDHI, aislados de diferentes plantas (Cuadro 1) (Anexo 1) (Leroux et al., 2010; Stammler et al., 2015).

Stammler et al. (2007), detectaron la presencia de un alelo con una modificación genética en el gen *sdhB*, la mutación P225F, en donde una prolina se sustituía por fenilalanina en el codón 225. La misma mutación fue identificada en aislamientos resistentes a boscalid, en el año 2011 por Veloukas et al., en aislados de *B. cinerea* recuperados desde fresa.

Posteriormente, se han detectado otras mutaciones en el gen *sdhB*, con cambios aminoacídicos en el codón 272 (H272R/Y); los aislados moderadamente resistentes mostraron un cambio nucleotídico de C a T en el codón 272, lo que resulta en un cambio de histidina por arginina (H272R), también detectaron un cambio de nucleótido de A a G en el mismo codón, lo que resulta en una sustitución de histidina por tirosina (H272Y). Además en el codón 225 se detectaron otras mutaciones (P225L y P225T), las que se relacionan con distintos niveles de resistencia a boscalid (Stammler, 2008; De Miccolis et al., 2010). Por otro lado, en aislados moderadamente resistentes se detectó la mutación N230I que resulta en la sustitución de una asparragina por isoleucina, por un cambio de nucleótido de A por T en el codón 230 (Veloukas et al., 2011).

Al respecto Leroux et al. (2010), informaron que además de las mutaciones en el gen *sdhB* (H272A/R/L, N230I y P225T/L) se presentan también otras en el gen *sdhD* (H132R), que están asociadas a niveles de resistencia moderada y que también se han relacionado con resistencia al mismo fungicida en aislados de *B. cinerea* procedentes de Francia y Alemania (fresas y uvas). Asociado a esto, Veloukas et al. (2011) determinaron que los aislamientos resistentes presentan las mutaciones 272 (H272R) de la subunidad *sdhB* y según Yin et al. (2011) estas mutaciones H272 (R/Y) corresponderían al genotipo mutante dominante de los aislados recuperados desde manzanas.

En Chile, Román et al. (2013) detectaron las mutaciones H272R y H272Y en el gen *sdhB* en aislados de *B. cinerea* recuperados desde uva de mesa y que presentaban distintos niveles de sensibilidad a boscalid. Del mismo modo, Piqueras et al. (2014) reportaron la mutación H272L en el mismo gen, en aislados de *B. cinerea* recuperados desde viñedos comerciales del Valle Central de Chile. Recientemente, Esterio et al. (2015) reportaron dos mutaciones, P225L y P225H, las que estarían asociadas a la pérdida de sensibilidad a boscalid.

Por otro lado, es importante considerar que para éste y otros fungicidas del grupo de los inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHIs) se han reportado riesgos de desarrollo

de resistencia cruzada entre fungicidas del mismo grupo químico, por lo que se han realizado estudios para confirmar la asociación entre las mutaciones detectadas en los genes *sdh* y los niveles de sensibilidad frente a otros fungicidas del grupo SDHIs (Leroux et al., 2010; Stammler et al., 2015).

Cuadro 1. Hongos fitopatógenos resistentes a fungicidas SDHI, su origen y mutaciones detectadas que confieren la resistencia.

Nombre de la especie	Reporte del Hospedero	Origen	Mecanismo de resistencia (subunidad-mutación)
<i>Ustilago maydis</i>	(Laboratorio)	Laboratorio	B-H257L
<i>Aspergillus oryzae</i>	(Laboratorio)	Laboratorio	B-H249Y / L / N, C-T90I, D-D124E
<i>Zymoseptoria tritici</i>	(Laboratorio)	Laboratorio	B-N225I, B-H267Y / R / L, B-I269V, C-A84V, C-H152R, C-T79I, C-N86K, C-G90R, D-H129E y varios otros
<i>Zymoseptoria tritici</i>	Trigo	Campo	B-N225T, C-T79N, C-W80S, C-N86S
<i>Pyrenophora teres</i>	Cebada	Campo	B-H277Y, C-N75S, C-G79R, C-H134R, C-S135R, D-D124N / E, D-H134R, D-D145G
<i>Botrytis cinerea</i>	Varios	Campo	B-P225L / V / F, B-H272Y / R / L / V, B-N230I, D-H132R, C-A85V
<i>Botrytis elliptica</i>	Lirios	Campo	B-H272Y / R
<i>Alternaria alternata</i>	Pistacho	Campo	B-H277Y / R, C-H134R, D-D123E, D-H133R
<i>Alternaria solani</i>	Papa	Campo	B-H277Y / R, D-H133R
<i>Corynespora cassiicola</i>	Cucurbitáceas	Campo	B-H278Y / R, C-S73P, D-S89P, D-G109V
<i>Didymella bryoniae</i>	Cucurbitáceas	Campo	B-H277R / Y
<i>Podosphaera xanthii</i>	Cucurbitáceas	Campo	BH > Y (homóloga a H272 en <i>B. cinerea</i>)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Semilla de oleaginosa	Campo	B-H273Y, C-H146R, D-H132R
<i>Stemphylium vesicarium</i>	Espárrago	Campo	B-P225L, H272Y / R
<i>Venturia inaequalis</i>	Manzana	Campo	C-H151R

Fuente: Stammler et al., 2015.

Por lo expuesto anteriormente se han llevado a cabo diversos estudios como el de De Miccolis et al. (2014) en el que por medio de pruebas *in vitro* descubrieron que las distintas mutaciones presentes en el gen *sdhB* originan diferentes niveles de resistencia a boscalid y a fluopyram; los aislados resistentes con las mutaciones P225L y P225F en el gen *sdhB* conferían alta resistencia a boscalid y resistencia alta o moderada a fluopyram, respectivamente. Los mutantes que presentaban la sustitución N230I eran moderadamente resistentes a ambos SDHIs y las sustituciones en la posición H272 conferían alta resistencia a boscalid (H272R), hipersensibilidad a fluopyram (H272Y) y resistencia moderada (H272V) a este último fungicida.

Amiri et al. (2014), investigaron la pérdida de sensibilidad de *B. cinerea* en aislados recuperados desde fresa a fluopyram, fluxapyroxad y penthiopyrad y la resistencia cruzada con boscalid previamente reportada y al relacionar las mutaciones H272R, H272Y, H272L, P225F y N230I detectadas en el gen *sdhB*, se evidenció la existencia de resistencia cruzada entre boscalid, fluxapyroxad y penthiopyrad pero no con fluopyram. Todas las mutaciones conferían moderada a muy alta resistencia a boscalid, H272Y originaba resistencia a fluxapiroxad y penthiopyrad y las mutaciones H272L, N230I y P225F originaban un alto nivel de resistencia a las cuatro moléculas SDHIs evaluadas, sugiriendo la existencia de resistencia cruzada desarrollada por *B. cinerea* ante los nuevos SDHIs.

Capacidad de adaptabilidad de aislados de *Botrytis cinerea*

El desarrollo y la evolución de la resistencia a los fungicidas en las poblaciones del patógeno dependen en gran medida de la capacidad de adaptabilidad (fitness) de la fracción resistente de la población. La capacidad de adaptabilidad puede ser definida como el éxito reproductivo individual o grupal de un alelo (Pringle y Taylor, 2002). En algunas oportunidades la presencia de una mutación implica un costo metabólico en el desarrollo del patógeno, el cual determina el resultado de la competencia entre aislados resistentes y sensibles.

La importancia del costo metabólico reside en que si se relaciona con la resistencia a fungicidas, la frecuencia de los aislados resistentes sería afectada en ausencia del fungicida, por ejemplo, el desarrollo de la resistencia a los fungicidas podría ser menor si la subpoblación resistente tiene una menor aptitud parasitaria o saprófita (Raposo et al., 2000; Mikaberidze and McDonald, 2015). En contraste, la ausencia de costo metabólico en la fracción resistente de la población conduciría a una frecuencia estable o a un rápido desarrollo de los aislados resistentes en ausencia o presencia de selección por los fungicidas (Panebianco, 2012).

Los parámetros que se utilizan para verificar si la mutación presente en los aislados de *B. cinerea* producen un costo metabólico son: (i) el crecimiento del micelio y producción de conidias (ii) la agresividad y (iii) la producción de esclerocios *in vitro*, entre otros (Veloukas et al., 2014).

La determinación del comportamiento de sensibilidad o resistencia de un patógeno determinado frente a un fungicida considera el uso de técnicas tradicionales tales como crecimiento miceliar, germinación conidial, elongación de tubo germinativo en medios de

cultivo específicos enmendados con el fungicida, midiéndose como la concentración del ingrediente activo que es capaz de inhibir el crecimiento en un 50% (EC₅₀), valor que se denomina concentración media efectiva y se calcula para cada individuo (Damicone, 2004). Para el caso de boscalid se considera como aislados sensibles los que presenten un valor EC₅₀ menor a 15 µg.mL⁻¹, mientras que los que estén por encima de ese valor se consideran aislados resistentes (De Miccolis et al., 2014).

Detección de mutaciones en aislados de *Botrytis cinerea* mediante uso de PCR

Los métodos tradicionales para evaluar la resistencia a los fungicidas requieren de mucho tiempo y mano de obra; sin embargo son fundamentales para estudiar las características fenotípicas del patógeno. Por otro lado, estas características generalmente están relacionadas con el genotipo y las pruebas basadas en el análisis de DNA son utilizadas para detectar rápidamente y con precisión los alelos asociados a resistencia a fungicidas dentro de las poblaciones de hongos (Avenot y Michailides, 2010).

El estudio de genes ha permitido implementar técnicas de detección rápida de mutaciones asociadas a pérdidas de sensibilidad a fungicidas (Ma et al., 2003), entre éstas técnicas la más utilizada es el PCR (Polymerase Chain Reaction), que consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA en presencia de la enzima DNA polimerasa. Se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos utilizados como iniciadores que delimitan la secuencia de DNA de doble cadena “blanco” a amplificar. Estos iniciadores son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias que flanquean la región “blanco” (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Ma and Michailides, 2005). Posteriormente, se han desarrollado varias técnicas moleculares basadas en PCR, tales como PCR asociado al polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción enzimática (PCR-RFLP), PCR alelo específico y PCR en tiempo real, utilizándose con éxito en la detección de genotipos resistentes a fungicidas de varios hongos fitopatógenos.

***Botrytis cinerea* en arándano**

El arándano es un arbusto de follaje caduco perteneciente a la familia de las Ericaceas y al género *Vaccinium*; su fruto es una baya esférica de 0,7 a 1,5 cm de diámetro, de color azul a negro y sabor agridulce. Posee numerosas propiedades alimenticias y medicinales, debido al alto contenido de sustancias promotoras de la salud como flavonoides, taninos y ácidos fenólicos (antocianos, flavonoles y derivados del ácido cinámico) por lo que su consumo como frutas frescas y procesadas, ha tenido un sostenido incremento a nivel mundial y es una de las especies más importantes de las exportaciones frutícolas chilenas (Chávez et al., 1997; Cardeñosa et al., 2016).

El cultivo del arándano se desarrolla principalmente en las zonas templadas, subtropicales y tropicales cálidas del mundo tales como EE.UU., Canadá, Chile, Argentina, Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda, Japón, China y varios países europeos (Strik, 2005; Strik et al.,

2014; Konarska, 2015). A nivel mundial para el año 2010 existía una superficie de 77.102 hectáreas plantada con arándanos y Sudamérica presentaba la segunda mayor superficie plantada con 17.814 hectáreas, equivalente al 23,1% de la superficie mundial. Chile registraba para ese año la mayor superficie en Sudamérica y la segunda a nivel mundial, con 13.057 hectáreas (16,9% de la superficie mundial) (Bravo, 2012) y para el año 2015 en Chile se reportó alrededor de 14.573 hectáreas plantadas (ODEPA, 2016).

Para el año 2011, los cinco mayores exportadores mundiales de arándanos frescos concentraron casi el 90% del volumen de las exportaciones bajo el liderazgo de Chile, con una participación de 30,9%, seguido por Estados Unidos (23,7%), Canadá (22,2%), Argentina (7,3%) y España (4,4%). Logrando Chile posicionarse como el mayor exportador mundial de arándanos frescos ese año, incrementando su participación en el mercado (Bravo, 2012).

El arándano, al igual que otros frutales, es altamente susceptible a *B. cinerea*, lo que ha llevado a que en el último tiempo se produzcan rechazos en el momento en que la fruta arriba a los mercados de destino. En Chile, la pudrición gris es el problema de índole fitopatológico que produce las mayores pérdidas en arándano (Fernández, 2016).

Entre los fungicidas registrados para el control de *B. cinerea* en este cultivo se encuentran benomilo, iprodione, fenhexamid y boscalid (SDHI). Es importante señalar que en estudios recientemente efectuados se ha podido constatar resistencia de niveles leves a moderados a iprodione, fenhexamid y boscalid en aislados de *B. cinerea* desde arándano (Esterio et al., 2014), sin embargo no se ha asociado ésta pérdida de sensibilidad a mutaciones en los genes *sdh* de *B. cinerea*.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 1997. *Plant Pathology* (4^a ed.). Academic Press, 635 p.
- Amiri, A., S. Heath and N. Peres. 2014. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. *Plant Disease*, 98:532-539.
- Auger, J. y M. Esterio. 1997. Botrytis en vides de Chile: Epidemiología y resistencia a fungicidas. 3-9 p. En: Esterio M. y J. Auger. Botrytis: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Santiago, Chile. 125 p.
- Avenot, H. and T. Michailides. 2007. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease*, 91:1345-1350.
- Avenot, H. F., and T. J. Michailides. 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 29: 643– 651.
- Bravo, J. 2012, oct. Mercado de arándanos, sin nubarrones en el horizonte (Boletín frutícola), Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Ministerio de Agricultura, Chile. 10 p.
- Brent, K. 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC Monograph N° 1 GCPF Brussels UK 48 p.
- Cardeñosa, V., A. Girones-Vilaplana, J.L. Muriel, D.A. Moreno and J.M., Moreno-Rojas. 2016, Jan. Influence of genotype, cultivation system and irrigation regime on antioxidant capacity and selected phenolics of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), *Food Chemistry*, 202: 276-283.
- Cecchini, G. 2003. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual Review of Biochemistry*, 72:77-109.
- Ceponis, M. and R. Capellini. 1983. Control of postharvest decays of blueberry fruits by precooling, fungicide, and modified atmospheres. *Plant Disease Reporter*, 67: 169-171.
- Chávez, R., F. Sánchez y B. Gustavsson. 1997. Chile: Berries para el 2000. Fundación Chile, Santiago, Chile. 133 p.
- Damicone, J. 2004. Fungicide resistance management. Oklahoma State University. 7p.
- De Miccolis, A., W. Habia, C. Rotolo, S. Pollastro, and F. Faretra. 2010. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. *European Journal of Plant Pathology*, 128:185-199.

De Miccolis R., M. Masiello, C. Rotolo, S. Pollastro y F. Faretra. 2014. Molecular characterization and detection of resistance to SDHI fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science*. (Doi: 10.1002/ps.3748).

Esterio, M., C. Ramos, M. Araneda y J. Auger. 2011. Situación actual de sensibilidad a botryticidas en las principales zonas productoras de uva de mesa en Chile. XX Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Libro de Resúmenes. Eds. Montealegre, J. y Henríquez, J. L. Santiago, Chile: SOCHIFIT. 49 p.

Esterio, M., M. Araneda, A. Román, A. Copier, L. Pizarro y J. Auger. 2014. Nuevas mutaciones asociadas con pérdida de sensibilidad a carboxamidas en aislados chilenos de *Botrytis cinerea*. XXIII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Libro de resúmenes. Eds. Cáceres M., Lolas M., Mujica., Sandoval C. Chile. 60 p.

Esterio, M., M. Araneda, A., Román, L. Pizarro, L., C. Copier and J. Auger. 2015. First report of boscalid resistant *Botrytis cinerea* isolates carrying the mutations H272R, H272Y, P225L, and P225H from table grape in Chile. *Plant Disease*, 99: 891.

Fernández, X. Nuevo sistema para detectar la *Botrytis* en arándanos promete revolucionar el sector. Revista de campo (Supl.) El Mercurio. Santiago, Chile. 14 de enero de 2016.

Ferreira, M. y D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ª edición. Brasilia. EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.

Fillinger, S and A. Walker. 2016. Chemical control and resistance management of *Botrytis* diseases. (Cap. 10, pp. 189-216). En: Fillinger, s. and Y. Elad (eds.). *Botrytis – the fungus, the Pathogen and its management in agricultural systems*. Japan: Springer. 486 p.

FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2015. FRAC Code list of fungicides sorted by mode of action (including FRAC code numbering). Disponible en: <http://www.frac.info>. Consultado el 28 de enero del 2016.

Groves, J. and C. Loveland. 1953. The connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 45, 415-425.

Harvey, J. 1955. Decay in stored grapes reduced by field applications of fungicides. *Phytopathology*, 45: 137-140.

Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T., James, P. M. Kirk, R. Lücking and H.T. Lumbsch. 2007. A higher level Phylogenetic Classification of the Fungi, *Mycological Research*, 111 (5): 509-547.

Konarska, A. 2015, Jun. Morphological, anatomical and ultrastructural changes in *Vaccinium corymbosum* fruits during ontogeny. Botany. University of Life Sciences in Lublin, Department of Botany. 35 p.

Leroux, P., F. Chapeland, D. Desbrosses and M. Gredt. 1999 jul. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolate from French vineyards. *Crop protection*, 18: 687-697.

Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch and A. Walker. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6615-6630.

Ma, Z., D. Felts and T. Michailides. 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77: 66-74.

Ma, Z. and T. Michailides. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 853-863 p.

McGrath M. 2008. Fungicide sensitivity in *Podosphaera xanthii* and efficacy for cucurbit powdery mildew in NY, USA, in 2003-2006. *Journal of Plant Pathology* 90 (Suppl. 2), 90.

McGrath M. y Miazzi M. 2008. Sensitivity of *Podosphaera xanthii* to registered fungicides at-risk for resistance related to their efficacy for powdery mildew in pumpkin. *Phytopathology*, 98, S102.

Mikaberidze A. and B.A. McDonald. 2015. Development of fungicide resistance. Fitness cost resistance: Impact on management (cap. 1, pp77-89). En: Ishii H. and D.W. Hollomon (eds.). *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Japan: Springer. 490 p.

ODEPA (Oficina de estudios y políticas agrarias). [En línea]. Recuperado en: <<http://www.odepa.cl/superficie-de-frutales-por-region-2/>>. Consultado el: 05 de febrero de 2016.

Panebianco A. 2012. Study on fungicide sensitivity and resistance in a population of *Botryotinia fuckeliana* collected from table grapes in Sicily (Southern Italy). Thesis [Ph.D.] University of Catania. 128 p.

Piqueras, C., Herrera, D. and Latorre, B. 2014. First report of high boscalid resistance in *Botrytis cinerea* associated with the H272L mutation in grapevine in Chile. *Plant Disease applications note*, 98(10): 1,441.1 - 1,441.1.

Pringle, A. and Taylor, J. W. 2002. The fitness of filamentous fungi. *Trends Microbiology*, 10:474-481.

Raposo, R., V. Gomez, T. Urrutia and P. Melgarejo. 2000, nov. Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology*, 90 (11): 1246-1249.

Román, A., J. Auger, y M. Esterio. 2013. Caracterización genética y fenotípica de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de diferente grado de sensibilidad a boscalid. En: XXII

Congreso Peruano y XVII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Libro de Resúmenes. Eds. Rodríguez, E. y Murguía, C. Lambayeque, Perú: CLAP, ALF. 60 p.

Romanazzi G. and E. Feliziani. 2014. *Botrytis cinerea*. En: Bautista-Baños, S. (ed). Postharvest decay: control strategies. London: Elsevier. 131–146.

Rosslénbroich, H. and D. Stuebler. 2000, sep. *Botrytis cinerea* History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19: 557-561.

Salinas, J., F. Warnaar and K. Verhoeff. 1986. Production of cutin hydrolyzing enzymes by *Botrytis cinerea* in vitro. *Journal Phytopathology*, 116: 299-307.

Stammler, G. 2008. Mode of action, biological performance and latest monitoring results of boscalid sensitivity. In: Abstr.18th Symposium Res. Committee on Fungicide Resistance. The Phytopathological Society of Japan. Matsueshi, Japan. 30-43 p.

Stammler, G., H. Brix, A. Glättli, M. Semar, U. Schoefl, 2007. Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. In: Proceedings XVI International Plant Protection Congress. Glasgow, UK. 40- 45 p.

Stammler, G., A. Wolf, A. Glaettli and K. Klappach. 2015. Mechanisms of resistance. Respiration Inhibitors: Complex II. (cap. 1, pp.104-117). En: Ishii H. and D.W. Hollomon (eds.). Fungicide resistance in plant pathogens. Japan: Springer. 490 p.

Stevenson K., D. Langston, F. Sander, 2008. Baseline sensitivity and evidence of resistance to boscalid in *Didymella bryoniae*. *Phytopathology*, 98, S151.

Strik, B.C. 2005. Blueberry – an expanding world berry crop. *Chron. Hortic.* 45: 7–12.

Strik, B., C. Finn, and P. Moore. 2014. Blueberry cultivars for the Pacific Northwest. [Corvallis, Or.]: Oregon State University Extension Service 656: 1-13.

Ten Have, A. 2000. The *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase gene family. Thesis [doctoral] Wageningen Universiteit. 119 p.

Undurraga, P. y Vargas, S. (eds.) 2013. Manual del arándano (Bol. INIA N° 263). Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile. 120 p.

Veloukas, T. and G. Karaoglanidis. 2012. Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. *Pest Management Science*, 68: 858-864.

Veloukas, T., P. Kalogeropoulou, A. N. Markoglou, and G. S. Karaoglanidis. 2014. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and

QoI fungicides, associated with several *sdh B* and the *cytb G143A* mutations. *Phytopathology*, 104(4): 347-356.

Veloukas, T., M. Leroy, M. Hahn and G. Karaoglanidis. 2011. Detection and molecular characterization of boscalid resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease*, 95:1302-1307.

Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, and J. Kan. 2007, sep. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5): 561-580.

Yin, Y., K. Kim and C. Xiao. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology*, 101:986-995.

CAPITULO II

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis cinerea* DE
DISTINTO NIVEL DE SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS INHIBIDORES DE
SDH Y EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE CAPACIDAD DE
ADAPTABILIDAD**

RESUMEN

En los últimos años, en aislados de *Botrytis cinerea* recuperados desde vides, se ha detectado pérdida de sensibilidad a boscalid, asociada a presencia de mutaciones en los genes *sdh* que codifican para las subunidades del complejo SDH del patógeno. El objetivo de éste estudio fue identificar las mutaciones presentes en los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* en aislados del hongo de distinto nivel de sensibilidad a boscalid colectados desde arándanos en las principales zonas productoras de Chile y evaluar el comportamiento de efectividad de nuevas moléculas SDHs próximas a introducirse en la industria agrícola chilena (fluopyram e isofetamida). Mediante la amplificación de los genes por PCR y posterior análisis bioinformático se detectaron por primera vez en arándano las mutaciones H272R y H272Y presentes en zonas no conservadas del gen *sdhB* y que están asociadas con la pérdida de sensibilidad a boscalid. Además, se identificó la mutación G37S en el gen *sdhC* de cuatro aislados resistentes a boscalid, siendo éste el primer reporte en *B. cinerea*. Mediante análisis de correlación de Spearman se demostró que las mutaciones H272Y/R y G37S no confieren un perfil de resistencia cruzada hacia fluopyram ni a isofetamida. Además, al evaluarse los parámetros de capacidad de adaptabilidad en aislados de *B. cinerea* asociados a resistencia a boscalid y mediante la prueba LSD de Fisher, se determinó que la presencia de mutaciones conlleva un costo metabólico que se aprecia en un menor crecimiento miceliar a 20°C en APD y en aislados con la mutación H272Y una producción más lenta de esclerocios.

Palabras claves: Moho gris, boscalid, fluopyram, isofetamida, resistencia a fungicidas, mutación.

ABSTRACT

In recent years, *Botrytis cinerea* isolates retrieved from grapevines, has detected loss of sensitivity to boscalid, associated with the presence of mutations in *sdh* genes encoding subunits of the SDH complex of the pathogen. The objective of this study was to identify the mutations present in *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* genes in several isolates of the fungus with different levels of sensitivity to boscalid, collected from blueberries in the main producing areas of Chile, and evaluate the behaviour of effectiveness of new SDHIs molecules near to enter in the chilean agricultural industry (fluopyram and isofetamid). Through amplification of the genes by PCR and subsequent bioinformatic analysis of *sdh* genes, H272R and H272Y mutations, present in regions not conserved in the *sdhB* gene, were first detected in blueberry and they are associated with loss of sensitivity to boscalid. In addition, the G37S mutation was identified in the *sdhC* gene of four isolates resistant to boscalid, this being the first report in *B. cinerea*. Through Spearman correlation analysis, it was concluded that H272Y/R and G37S mutations don't confer cross-resistance profile to fluopyram or to isofetamid. Additionally, the parameters of fitness obtained by Fisher's LSD test evaluated in boscalid resistant isolates of *Botrytis*, it was determined that the presence of mutations leads to a metabolic cost that it is appreciated in a lower mycelial growth at 20°C on PDA and in isolates with the mutation H272Y, a slower production of sclerotia.

Keywords: Gray mold, boscalid, fluopyram, isofetamid, fungicide resistance, mutation.

INTRODUCCIÓN

La demanda y la disponibilidad de arándanos han aumentado sustancialmente en los últimos años, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, por su alto contenido de vitamina C y antioxidantes. Por otro lado, en arándanos así como en otras especies cultivadas, diversos estudios señalan que las enfermedades causadas por hongos son las que reportan las mayores pérdidas tanto en pre como en poscosecha, siendo el principal agente causal de estas pérdidas *Botrytis cinerea* (Ceponis y Capellini, 1983; Chávez et al., 1997).

El control de *B. cinerea* se lleva a cabo mediante prácticas de manejo integrado dentro del cual el uso de agroquímicos es fundamental, sin embargo, un uso reiterado de éstos se ha traducido con el tiempo en pérdida de sensibilidad a determinados fungicidas que incluso puede estar asociada a disminución de la eficacia de control del patógeno en campo (Esterio et al, 2014).

Los fungicidas inhibidores de la respiración, tales como los inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHIs) son fungicidas importantes en el control del moho gris, ya que al inhibir esta enzima se produce un bloqueo del ciclo de energía de la célula (Veloukas et al., 2014). Sin embargo, *B. cinerea* ha desarrollado resistencia a este grupo fungicida, la cual puede ser causada por varios mecanismos y entre éstos el más importante es la resistencia específica que se correlaciona con varias mutaciones en los genes *sdh* que codifican las subunidades del complejo proteico succinato deshidrogenasa (SDH) y *B. cinerea*, patógeno con alta variabilidad genética, ha mostrado un alto riesgo para el desarrollo de este mecanismo de resistencia (Stammler et al. 2007; Veloukas et al., 2011; Veloukas et al., 2014; Stammler et al., 2015).

Boscalid fue el primer fungicida SDHIs que se consideró en los programas preventivos de control de *B. cinerea* tanto a nivel mundial como en Chile, sin embargo a la fecha nuevos fungicidas pertenecientes a éste grupo (benzovindiflupir, bixafen, fluopyram, fluxapiraxad, isofetamida, isopirazam, penflufeno, penthiopyrad y sedaxane) (Stammler, 2008), se están introduciendo en el mercado para su uso en los principales cultivos agrícolas.

Es importante destacar que los SDHIs comparten características químicas comunes necesarias para la actividad fungicida, lo que sugiere una unión muy similar al sitio diana como se ha demostrado por modelamiento químico tridimensional (Stammler et al., 2015). Por otro lado, las poblaciones de patógenos que desarrollan resistencia a un fungicida se vuelven también resistentes a otros fungicidas que comparten el mismo modo de acción. Estos fungicidas al tener una relación química muy estrecha, pueden ser afectados por las mismas mutaciones y mecanismo de resistencia, generando el riesgo de desarrollo de resistencia cruzada (Panebianco, 2012).

Por lo anteriormente mencionado, se han desarrollado diversas investigaciones para confirmar la asociación entre las mutaciones detectadas en los genes *sdh* de *B. cinerea* y los niveles de sensibilidad frente a fungicidas SDHIs, habiéndose reportado así el desarrollo de resistencia cruzada, entre boscalid y otros fungicidas del grupo SDHIs (Leroux et al., 2010;

Kim and Xiao, 2010; Veloukas et al., 2011; Veloukas and Karaoglanidis, 2012; Amiri et al., 2014).

Otro aspecto importante a considerar es el eventual efecto que puede generar la resistencia a los fungicidas en la capacidad de adaptabilidad de los aislados que la presentan, lo cual puede afectar el manejo de la enfermedad. Si los costos metabólicos se asocian con resistencia a los fungicidas, la frecuencia de aislados resistentes se reducirá en ausencia del fungicida (Raposo et al., 2000).

Por todo lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente estudio fueron identificar las mutaciones presentes en los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* en aislados de *B. cinerea* resistentes a boscalid, recuperados desde arándanos y evaluar el comportamiento de los aislados que presentan mutaciones frente a otras moléculas fungicidas SDHI (fluopyram e isofetamida). Además mediante la evaluación de distintos parámetros se determinó la capacidad de adaptabilidad de estos aislados y si la presencia de mutaciones generaba algún costo metabólico en éstos.

HIPÓTESIS

Los aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a boscalid recuperados desde arándano presentan resistencia cruzada a otras moléculas SDHI debido a mutaciones en los genes *sdhB*, *sdhC* o *sdhD*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar las mutaciones presentes en los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* en aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a boscalid, recuperados desde arándanos y evaluar su comportamiento frente a otras moléculas fungicidas SDHI (fluopyram e isofetamida).

Objetivos específicos

- Secuenciar e identificar las mutaciones presentes en los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de aislados de *Botrytis cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a boscalid.
- Determinar la concentración media efectiva (valor EC_{50}) a fluopyram e isofetamida de los aislados de *Botrytis cinerea* de distintos niveles de sensibilidad a boscalid.
- Determinar la capacidad de adaptabilidad de los aislados de *Botrytis cinerea* de distintos niveles de sensibilidad a boscalid bajo condiciones *in vitro* mediante la evaluación de los siguientes parámetros: crecimiento miceliar, capacidad de esporulación, capacidad formadora de esclerocios y nivel de virulencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular del Departamento de Sanidad Vegetal de la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas.

Fungicidas

- Boscalid (Cantus 500 WG), proporcionado por BASF Chile S.A.
- Fluopyram (Luna Privilege 500 SC), proporcionado por Bayer S.A.
- Isofetamida (IKF-5411 400 SC), proporcionado por Summit-Agro Chile SpA.

Metodología

Cien aislados monospóricos de *B. cinerea* de diferente nivel de sensibilidad a boscalid (sensibles y resistentes), fueron seleccionados del cepario del Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular del Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, para llevar a cabo el presente estudio. Los aislados fueron recuperados desde flores y bayas de arándano de las regiones del Maule, Bío-Bío y de los Ríos durante las temporadas 2012-2014 (Proyecto InnovaChile de CORFO/FDF/ASOEX, Comité de Arándanos de Chile – U. de Chile, Código: 12BPC2-13492)

Los aislados de *B. cinerea* fueron reactivados en medio agar malta levadura (AML, Haynes et al., 1955), luego de siete días de incubación a 20°C se obtuvo micelio, que fue respaldado en glicerol al 20% a -20°C con el fin de tener un stock de cada aislado.

El establecimiento de los niveles de sensibilidad para boscalid se efectuó utilizando una escala de rangos (Cuadro 2), según De Miccolis et al. (2014), modificado*.

Cuadro 2. Nivel de sensibilidad de aislados de *B. cinerea* según valores críticos para boscalid.

EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Grado de sensibilidad	EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
	S	<15 ppm
15 ppm <	LR	< 30 ppm
30 ppm <	MR	< 45 ppm
	AR	> 45 ppm

Fuente: De Miccolis et al., 2014, modificado*

*Esterio, M., comunicación personal.

Caracterización genética de los aislados seleccionados de *Botrytis cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a boscalid

Obtención de biomasa: Con este propósito se cultivó micelio de los distintos aislados de *B. cinerea* en caldo glucosado (10g glucosa en 500 mL⁻¹; Gale and Epps, 1942), incubándose por un periodo de 5 días a 20°C hasta obtener una capa uniforme de micelio superficial. La biomasa obtenida fue secada en papel absorbente estéril, luego se transfirió la cuarta parte a un tubo eppendorf de 2 mL. Estos tubos se mantuvieron a -80°C y posteriormente fueron liofilizados por un periodo de 18 horas.

Extracción de DNA: Se realizó con el método CTAB siguiendo el protocolo de Monsanto (2004). El DNA obtenido de cada aislado fue disuelto en 50 µL de agua ultra pura y una alícuota de 1µL de esta dilución fue utilizada para la amplificación con PCR.

Cuantificación y calidad del DNA extraído: La cantidad y calidad del DNA obtenido se determinó a través de lecturas de absorbancia realizadas a longitudes de onda de 260nm y 280nm en un espectrofotómetro Biochrom, modelo Biowave DNA. La relación de las lecturas a 260nm y 280nm permitió estimar la pureza y la concentración del DNA extraído además de determinar una posible contaminación con proteínas y/o fenoles. Para determinar la integridad del DNA y la ausencia de ARN, se realizó en cada una de las extracciones una electroforesis en gel de agarosa 0,8% por una hora a 95 volts, en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) IX (Sambrook et al., 1989).

Amplificación de los genes *sdh*: Para identificar las mutaciones relacionadas con resistencia a boscalid se realizó un análisis molecular de los genes que codifican para las subunidades de la enzima succinato deshidrogenasa, SDHB, SDHC y SDHD en los 100 aislados de *B. cinerea*, tanto sensibles como resistentes, secuenciándose los genes completos. Como secuencias de referencia para el estudio de los genes de las subunidades analizadas se utilizaron las secuencias publicadas de los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de *B. cinerea* sensible (B.05.10) de GenBank con números de acceso GQ25344339, GQ25344340, GQ25344341, GQ25344342 y GQ25344343. Los partidores utilizados se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Partidores utilizados en la amplificación de los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de *B. cinerea*.

Partidor	Secuencia (5'- 3')	Fragmento amplificado (bp)	Gen blanco	Orientación
IpBcBeg	CCACTCCTCCATAATGGCTGCTCTCCGC	1011	<i>sdhB</i>	Fw
IpBecEnd2	CTCATCAAGCCCCCTCATTGATATC	----	<i>sdhB</i>	Rev
SdhC1	ATCACGTGCCAGATTTCTT	963	<i>sdhC</i>	Fw
SdhC2	TTACAAGCCCTCCAAATTGC	----	<i>sdhC</i>	Rev
SdhD1	TGATGACCTTGACGTGACT	892	<i>sdhD</i>	Fw
SdhD2	AGCAGCATGTGTTTGACAGC	----	<i>sdhD</i>	Rev

Fuente: Leroux et al. (2010)

La reacción de PCR se realizó según lo descrito por Leroux et al. (2010). Se empleó un volumen de 20 μL que contenía 10 μL de GoTaq (buffer (10X), dNTPS (2 mM), Taq 1 U), 1 μL de DNA (10 a 20 ng de DNA genómico) y 0,5 μL de cada primer (10 pmol). El ciclo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, luego 35 ciclos de: 30 s a 95°C, 60 s a 52°C y 60 s a 72°C y finalmente una elongación final de 5 min a 72°C, para los genes *sdhC* y *sdhD*, del mismo modo para el gen *sdhB* con excepción de la fase de hibridación que se llevó a cabo a una temperatura de 62°C en vez de 52°C.

Separación y visualización de los fragmentos amplificados de DNA: Los productos del PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE IX a 80 V por 30 min, utilizándose como carga 5 μL de cada producto de amplificación, los eventuales fragmentos de DNA fueron visualizados después de la tinción con SYBR Red mediante un transiluminador UV de onda corta Vilber Lourmat.

Purificación y secuenciación de productos de PCR: Los productos resultantes del PCR fueron purificados y secuenciados en MacroGen USA Corp., Estados Unidos. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y traducidas *in silico* con Bioedit (Hall, 1999) versión 7.2.5.0 y alineados utilizando ClustalW Multiple alignment disponible también en la interfaz de Bioedit.

Identificación de zonas conservadas: Para la identificación de zonas conservadas en los genes estudiados, se realizó una comparación en GenBank con las secuencias de los hongos más cercanos filogenéticamente, utilizando BLASTn (Altschul et al, 1990), las que fueron alineadas también con las secuencias del aislado de referencia B05.10.

Sensibilidad a boscalid, fluopyram e isofetamida

La determinación de la sensibilidad de los aislados en estudio a boscalid y a las nuevas moléculas SDHIs (fluopyram e isofetamida) se realizó mediante la evaluación de germinación conidial. Con este propósito, se preparó una suspensión de cada aislado equivalente a 1×10^5 conidias mL^{-1} en agua destilada estéril. Posteriormente 200 μL de la suspensión conidial fueron sembrados en placas de Petri de 60 mm conteniendo Agar Agua (Lingappa and Lockwood, 1960) enmendados con concentraciones crecientes de los ingredientes activos (i.a.) en estudio: 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para boscalid y 0,002; 0,05; 0,1; 0,6; 1,2; 10 y 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el caso de fluopyram e isofetamida, considerándose tres repeticiones para cada concentración. Las placas así sembradas se mantuvieron a 20°C en oscuridad continua por 18 horas.

Posteriormente, se evaluó el porcentaje de germinación conidial en 100 conidias por cada concentración del fungicida. Se consideró como conidia germinada a aquella que presentaba un tubo germinativo con una elongación de al menos tres veces el tamaño de la conidia. A partir del porcentaje de conidias germinadas se determinó el valor EC_{50} de cada i.a. para cada aislado mediante análisis Probit utilizando el programa MINITAB 17.

Evaluación de la capacidad de adaptabilidad de aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a SDHIs

Se evaluaron 4 parámetros de capacidad de adaptabilidad sobre un total de 34 aislados de *Botrytis cinerea*, 18 de éstos con mutación en el gen *sdh*, 8 aislados con resistencia pero que no presentaban mutación alguna y 8 aislados sensibles (sin mutación). El ensayo consistió en la evaluación *in vitro* de los siguientes parámetros fenotípicos: (i) crecimiento miceliar en PDA a 20° y 0°C, (ii) capacidad de esporulación y (iii) capacidad formadora de esclerocios luego de 20 y 40 días de incubación en PDA a 20°C (número y peso de esclerocios) (Monteau et al., 2003). Considerándose 4 repeticiones por cada aislado para cada una de las pruebas.

Crecimiento miceliar. Discos de 5 mm de diámetro de PDA con micelio activo del hongo, tomados del borde de una colonia creciente, de cada aislado de 2 días de edad, fueron dispuestos de forma invertida sobre una placa de Petri conteniendo el mismo medio. Las placas así sembradas se mantuvieron en oscuridad continua por 5 y 16 días a 20 °C y 0 °C, respectivamente, midiéndose al término de este tiempo el crecimiento miceliar en 2 direcciones perpendiculares. Por cada aislado y condición de incubación se consideraron 4 repeticiones y cada una de éstas correspondió a una placa de Petri.

Capacidad de esporulación. La esporulación fue evaluada en agar malta levadura (AML), procediéndose inicialmente de la misma forma que en crecimiento miceliar, pero con variaciones en las condiciones de incubación: 3 días en oscuridad continua a 20 °C y luego bajo condiciones de fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad durante 17 días, para facilitar la producción de conidias. Posterior al periodo de incubación, se añadieron 20 mL de agua destilada estéril sobre cada placa de Petri, las conidias fueron cuidadosamente removidas con un bisturí de la superficie del medio AML, se filtró este contenido a través de dos capas de gasa en viales de centelleo individuales estimándose el contenido total de conidias (conidias/placa) por cada aislado en base a 4 mediciones efectuadas mediante hemacitómetro.

Capacidad formadora de esclerocios. Después de mantener los cultivos por 2 días a 20°C en oscuridad, discos de 5 mm de diámetro del margen de crecimiento activo de cada aislado se colocaron en forma invertida en el centro de placas de Petri conteniendo PDA. Las placas así sembradas fueron incubadas a 20 °C durante 20 y 40 días; posterior a estos tiempos se evaluó el número y el peso de los esclerocios de cada aislado.

Virulencia de los aislados de *Botrytis cinerea* con cambios aminoacídicos en las subunidades del complejo SDH

Para determinar el nivel de virulencia se utilizaron los aislados de *B. cinerea* ya indicados en pruebas anteriores, ésta prueba fue realizada en plántulas de pepino, *Cucumis sativus* L. variedad Marketmore 76, de acuerdo a la metodología descrita por Ma et al. (2007).

La producción de las plántulas de pepino fue realizada en bandejas almacigueras (a partir de semilla certificada) utilizando sustrato estéril. Transcurrida una semana de sembradas las semillas, las plántulas fueron seleccionadas y trasplantadas a contenedores individuales, manteniéndolas bajo condiciones controladas de temperatura (20°C), humedad (90 % HR) y luz (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) en una cámara de crecimiento Wisecube, modelo WGC-1000.

En total se utilizaron 4 plántulas de pepino (repeticiones) de 28 días de crecimiento, por cada uno de los 34 aislados en estudio (6 H272Y, 8 H272R, 3 G37S, 1 H272Y/G37S, 8 RSM y 8 sensibles), inoculándose las primeras hojas verdaderas de cada plántula (sub-muestras). El inóculo correspondió a un disco de 5 mm de diámetro de AML con crecimiento activo de *B. cinerea* de 2 días de edad que fue colocado de forma invertida sobre la hoja. Una vez realizada la inoculación las plántulas se mantuvieron a 25°C y 100% HR y las mediciones de los diámetros de la lesión se realizaron 72 horas post-inoculación.

Análisis estadístico

El nivel de sensibilidad a los fungicidas SDHI (boscalid, fluopyram e isofetamida) se determinó calculando los valores EC₅₀ de cada aislado mediante análisis Probit utilizando para ello el programa MINITAB 17.

La evaluación de la posible existencia de resistencia cruzada (positiva o negativa) entre boscalid y fluopyram así como entre boscalid e isofetamida, se analizó considerando los valores EC₅₀ transformados logarítmicamente, mediante coeficientes de correlación de Pearson.

La evaluación de los parámetros de capacidad de adaptabilidad se efectuó mediante un diseño completamente al azar para cada una de las pruebas efectuadas, como los resultados no cumplían con los supuestos de ANDEVA, los promedios fueron sometidos a modelos lineales mixtos seguidos por una prueba LSD de Fisher para las comparaciones múltiples (p<0,05), en este caso una placa de Petri representaba una unidad experimental.

Para el Análisis de virulencia en plántulas se consideró un diseño completamente al azar, compuesto por 4 plántulas de pepino (repeticiones), con 2 hojas verdaderas cada una (sub muestras), por aislado de *B. cinerea*, los resultados obtenidos en las evaluaciones del nivel de virulencia (diámetro de la lesión) se sometieron a modelos lineales mixtos seguidos por una prueba LSD de Fisher (p<0,05).

RESULTADOS

Caracterización genética de los aislados seleccionados de *Botrytis cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a boscalid

De los 100 aislados de *B. cinerea* en estudio, seis presentaron la mutación H272Y, con sustituciones del nucleótido citosina (C) por timina (T) en el codón 272, que origina un cambio de histidina (H) por tirosina (Y), (H272Y) (Cuadro 4) (Figura 1) y 33 aislados presentaron la mutación H272R (Figura 2), que resulta del cambio de adenina (A) por guanina (G) en el mismo codón, produciendo un cambio aminoacídico de histidina por arginina (Cuadro 5); cambios que se dan en el tercer dominio rico en cisteína de la subunidad SDHB.

Los resultados de la secuenciación y posterior alineamiento se presentan en las Figuras 1, 2 y 3; en donde la secuencia del aislado sensible B05.10 fue utilizada como referencia para la alineación con las secuencias de los aislados en estudio. En éstas se observa que las regiones enmarcadas presentan las sustituciones de nucleótidos (A) y las sustituciones de aminoácidos (B) en la secuenciación de los genes *sdhB* y *sdhC* de los aislados de *B. cinerea*.

Cuadro 4. Cambio del nucleótido citosina (C) por timina (T) presente en el codón 272 del gen *sdhB* de *B. cinerea*.

MUTACIÓN	CAMBIO DE AA	AMINO-ÁCIDO	ARNm	DNA
H272Y	H → Y	His	CAC	CAC
		Tyr	UAC	T AC

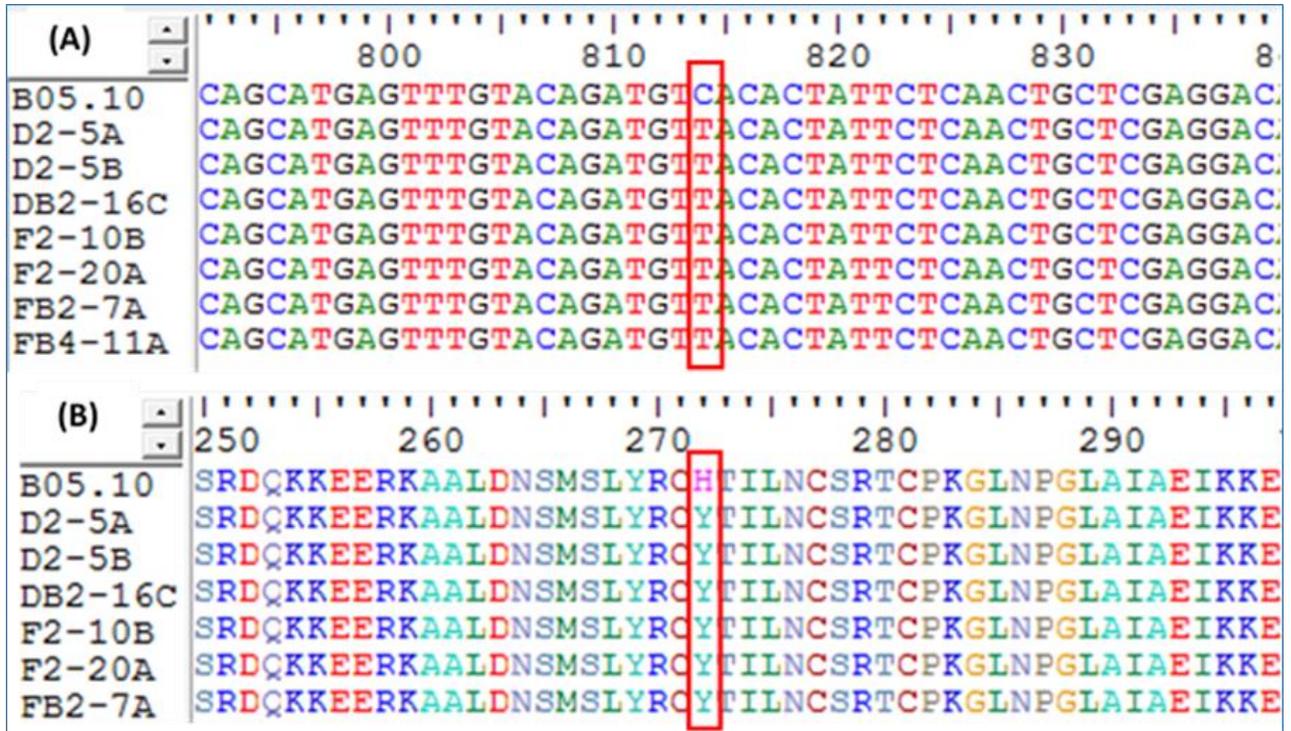


Figura 1. Alineamiento de secuencias del gen *sdhB* de los aislados de *B. cinerea* resistentes a boscalid con la secuencia de referencia de *B. cinerea* (B05.10). En A se muestra el reemplazo de un nucleótido citosina (C) por timina (T). En B se muestra el cambio de aminoácido de histidina (H) a tirosina (Y).

Cuadro 5. Cambio de nucleótido adenina (A) por guanina (G) presente en el codón 272 del gen *sdhB* de *B. cinerea*.

MUTACIÓN	CAMBIO DE AA	AMINO-ÁCIDO	ARNm	DNA
H272R	H → R	His	CAC	CAC
		Arg	CGC	CGC

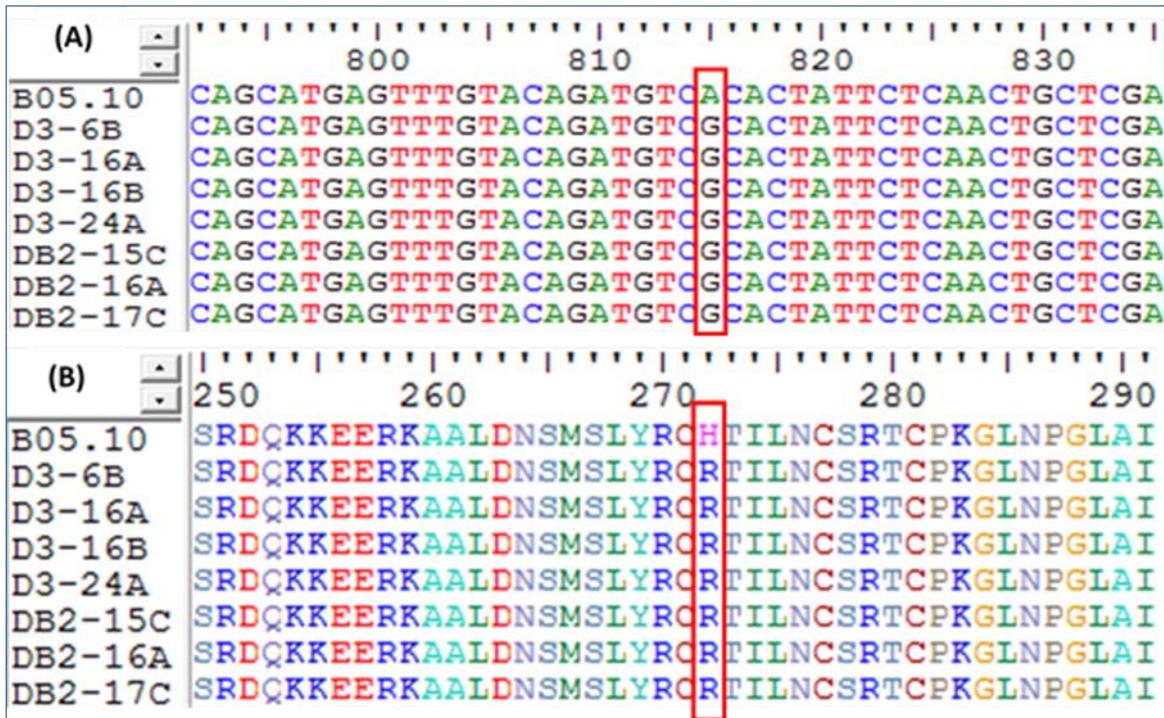


Figura 2. Alineamiento de secuencias del gen *sdhB* de los aislados de *B. cinerea* resistentes a boscalid con la secuencia de referencia de *B. cinerea* (B05.10). En A se muestra el reemplazo de un nucleótido Adenina (A) por Guanina (G). En B se muestra el cambio de aminoácido Histidina (H) por Arginina (R).

Además, como se muestra en la Figura 3, al secuenciar el gen *sdhC* se visualizó la presencia de otra mutación en cuatro aislados de *B. cinerea*, en el codón 37 de este gen; cambio de guanina (G) por adenina (A) que da como resultado la sustitución aminoacídica de glicina por serina (G37S) (Cuadro 6). Adicionalmente, uno de los cuatro aislados que presentaba la mutación G37S (DB2-16C), presentaba además la mutación H272Y en el gen *sdhB*.

Cuadro 6. Cambio de nucleótido guanina (G) por adenina (A) en el codón 37 del gen *sdhC* de *B. cinerea*.

MUTACIÓN	CAMBIO DE AA	AMINO-ÁCIDO	ARNm	DNA
G37S	G → S	Gly	GGC	GGC
		Ser	AGC	A GC

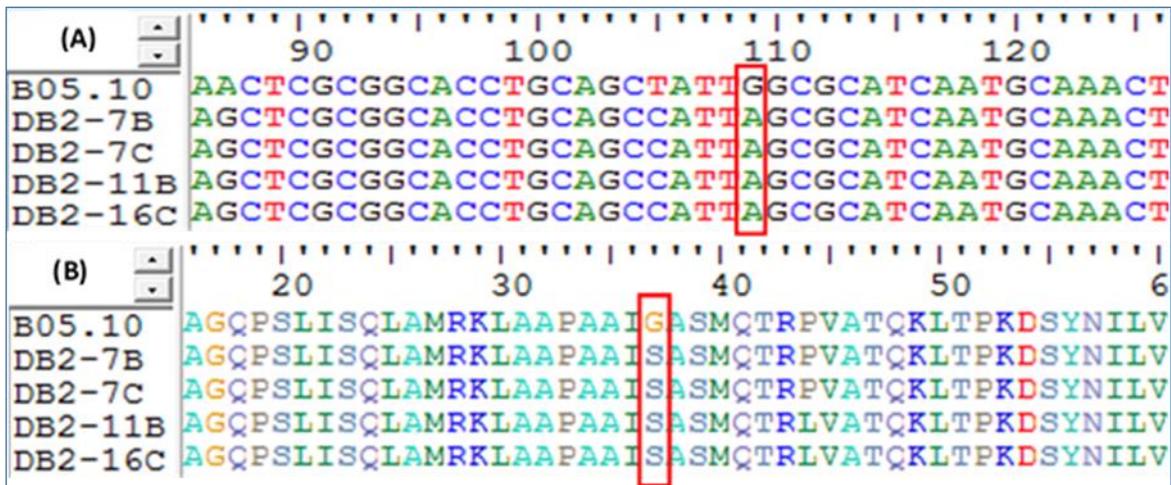


Figura 3. Alineamiento de secuencias del gen *sdhC* de los aislados de *B. cinerea* en estudio con la secuencia de referencia de *B. cinerea* (B05.10). En A se muestra el reemplazo de un nucleótido guanina (G) por adenina (A). En B se muestra el cambio de aminoácido de glicina (G) a serina (S).

Para determinar si la mutación G37S se localizaba en una zona conservada dentro del gen, se realizó una comparación en GenBank con la secuencia del gen que codifica para la subunidad SDHC, destacando los hongos más cercanos a *B. cinerea* como *Sclerotinia borealis*, *Monilinia fruticola* y *Oidiodendron maius* con 87%, 87% y 68% de identidad respectivamente. Las secuencias del mismo gen, *sdhC*, de los hongos mencionados fueron alineadas con las secuencias del gen de referencia B05.10 y con las secuencias del gen de los aislados que presentaban la mutación G37S, evidenciándose que la mutación se encuentra en un dominio que posee una alta identidad aminoacídica (Apéndice 1).

A diferencia del gen *sdhB* y gen *sdhC*, no se detectaron polimorfismos de nucleótidos en el gen *sdhD* asociados con pérdida de sensibilidad a boscalid.

Sensibilidad a boscalid, fluopyram e isofetamida

De los 100 aislados de *B. cinerea* en estudio, 58 presentaron algún grado de resistencia a boscalid ($EC_{50} > 15 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y 42 fueron sensibles ($EC_{50} < 15 \mu\text{g.mL}^{-1}$), mientras que, el total de los aislados fueron sensibles a fluopyram e isofetamida. Los aislados presentaron diferentes niveles de sensibilidad a boscalid según las mutaciones que presentaban, observándose que los aislados H272Y y H272R eran altamente resistentes a boscalid (AR_b); aislados con mutación G37S eran levemente resistentes (LR_b) y un aislado que presentó las mutaciones H272Y y G37S, se comportó como altamente resistente a boscalid (AR_b). Es importante señalar que 15 aislados sin mutación presentaron alta resistencia (Resistentes sin mutación: RSM) y 42 aislados que no presentaron ningún tipo de mutación en los genes estudiados fueron sensibles ($EC_{50} < 15 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Cuadro 7). Del total de aislados analizados el 33% presentó la mutación H272R, un 6% la H272Y, solo un 3% la mutación G37S y finalmente un 1% presentaba la mutación H272Y y G37S a la vez.

Cuadro 7. Análisis genotípico y niveles de sensibilidad de aislados de *B. cinerea* a boscalid, fluopyram e isofetamida.

Mutación	Nivel de sensibilidad a boscalid	(% del total analizado)	Sensibilidad promedio($EC_{50} \mu\text{g.mL}^{-1}$)		
			Boscalid	Fluopyram	Isofetamida
H272Y	AR	6	1,78E+28	0,51	0,11
H272R	AR	33	3,93E+27	1,69	0,82
G37S	LR	3	2,18E+1	2,31	1,59
H272Y/G37S	AR	1	3,82E+23	2,68	0,63
RSM*	AR	15	1,46E+5	2,83	1,46
Sensibles (sin mutación)	S	42	3,42	1,86	1,07

*RSM: Resistentes sin mutación.

Los mayores valores EC_{50} obtenidos en los aislados analizados con respecto a sensibilidad a los fungicidas SDHIs en estudio se presentaron para boscalid (Figura 4). Fluctuando los valores entre $3,42 \mu\text{g.mL}^{-1}$ y $1,78 \times 10^{28} \mu\text{g.mL}^{-1}$. En cambio en todas las categorías de aislados analizados, los valores EC_{50} para fluopyram fueron muy bajos ($0,51 \mu\text{g.mL}^{-1} < EC_{50} < 2,83 \mu\text{g.mL}^{-1}$); en el caso de isofetamida, los valores fueron aún más bajos, fluctuando entre $0,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ y $1,59 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Cuadro 7).

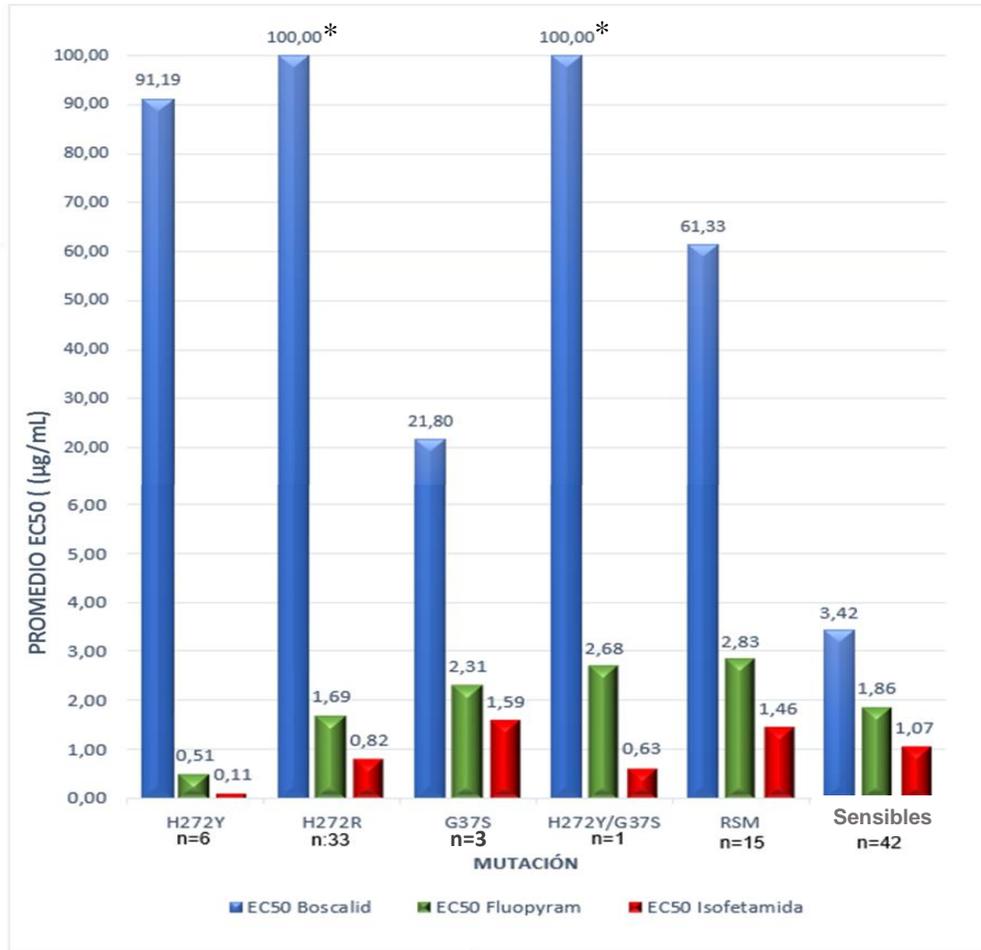


Figura 4. Promedios de valores EC_{50} de aislados de *B. cinerea* para boscalid, fluopyram e isofetamida, en relación a las mutaciones identificadas en los genes de las subunidades SDH.

RSM: Resistentes sin mutación.

* Valores $EC_{50} > 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

La evaluación de una posible correlación entre la sensibilidad a las moléculas SDHIs en estudio se calculó a partir de los logaritmos de las EC_{50} presentados por los 100 aislados de *B. cinerea* (Apéndice 2) a boscalid, fluopyram e isofetamida mediante un análisis de correlación de Pearson (Figura 5 y 6). Los resultados obtenidos señalan que en los aislados resistentes no existe correlación significativa alguna entre boscalid y fluopyram, como tampoco entre boscalid e isofetamida ($P < 0,05$), con excepción de los aislados con la mutación H272Y, que presentaron una fuerte correlación negativa entre boscalid y fluopyram ($r = 0,87$; $p = 0,02$), pero por el bajo número de aislados con esta mutación ($n = 6$) no es considerada significativa (Figura 5A).

También se evidenció una correlación positiva entre boscalid y fluopyram ($r = 0,67$; $p < 0,001$) y boscalid e isofetamida ($r = 0,78$; $p < 0,001$) en aislados sensibles (Figura 6I y 6J respectivamente).

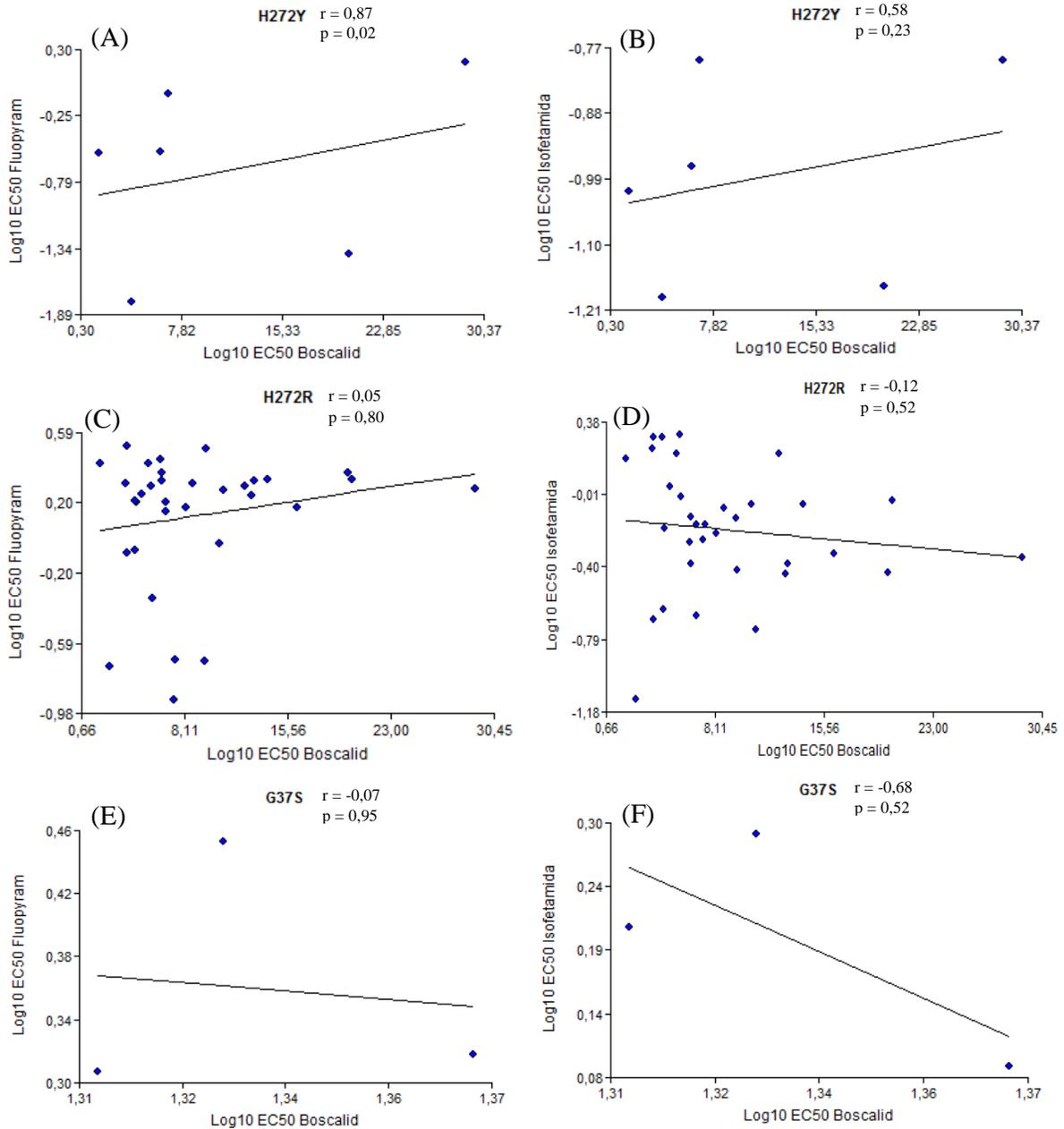


Figura 5. Coeficientes de correlación de Pearson de la sensibilidad expresada como \log_{10} de la concentración efectiva media (EC₅₀) de aislados de *B. cinerea* para boscalid con fluopyram y boscalid con isofetamida, en relación a las mutaciones identificadas en los genes *sdh*: H272Y (A), (B); H272R (C), (D); G37S (E), (F) respectivamente.

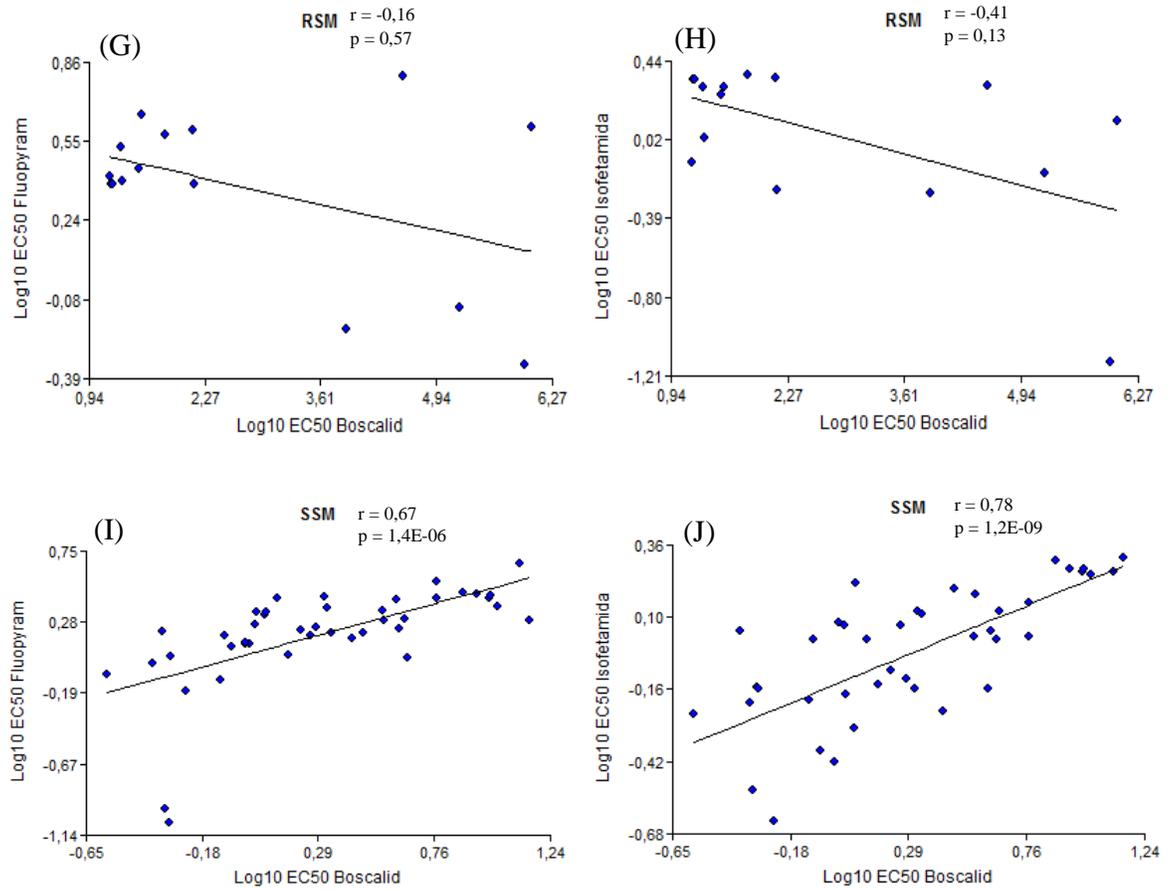


Figura 6. Coeficientes de correlación de Pearson de la sensibilidad expresada como log₁₀ de la concentración efectiva media (EC₅₀) de aislados de *B. cinerea* para boscalid con fluopyram y boscalid con isofetamida, en relación a aislados Resistentes sin mutación (RSM) (G), (H) y Sensibles (I), (J) respectivamente.

Evaluación de la capacidad de adaptabilidad de aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a SDHIs

Varios de los parámetros de capacidad de adaptabilidad de los aislados en estudio se mostraron significativamente diferentes, siendo consecuentes con que existe un mayor costo metabólico debido a la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las subunidades SDHB y SDHC en comparación con los aislados que no presentaron mutaciones (Cuadro 8).

Al respecto, es importante señalar que se detectó diferencias significativas en el crecimiento miceliar a 20°C entre los aislados que presentaban mutación con respecto a los sin mutación (resistentes como sensibles) (Figura 7). Estos últimos presentaron el mayor diámetro de crecimiento y los aislados con mutación un crecimiento menor, a diferencia del crecimiento obtenido a 0°C en donde, aunque los aislados sensibles crecieron más rápido, no se detectaron diferencias con respecto a los resistentes con o sin mutación ($p > 0,05$) (Cuadro 8). En la evaluación de la capacidad de esporulación tampoco se detectaron diferencias entre los distintos aislados presentando todos un comportamiento similar (Figura 7C) ($p > 0,05$).

Respecto de la capacidad formadora de esclerocios, se detectaron diferencias a los 20 días de incubación tanto en número como en peso de los esclerocios formados, lo que no se observó a los 40 días ($p > 0,05$). A los 20 días de incubación, el menor número de esclerocios lo presentaron los aislados con mutación H272Y, G37S y RSM, pero los dos últimos no se diferenciaron de los aislados sensibles, presentando el mayor número de esclerocios los aislados con la mutación H272R (Cuadro 8, Figura 8). Respecto al peso de los esclerocios formados por placa de Petri, los aislados con la mutación H272Y, G37S y RSM presentaron menor peso que los demás aislados, aunque éstos dos últimos no se diferenciaron de los aislados H272R; mientras que, los aislados sensibles presentaron el mayor peso de esclerocios (Cuadro 8).

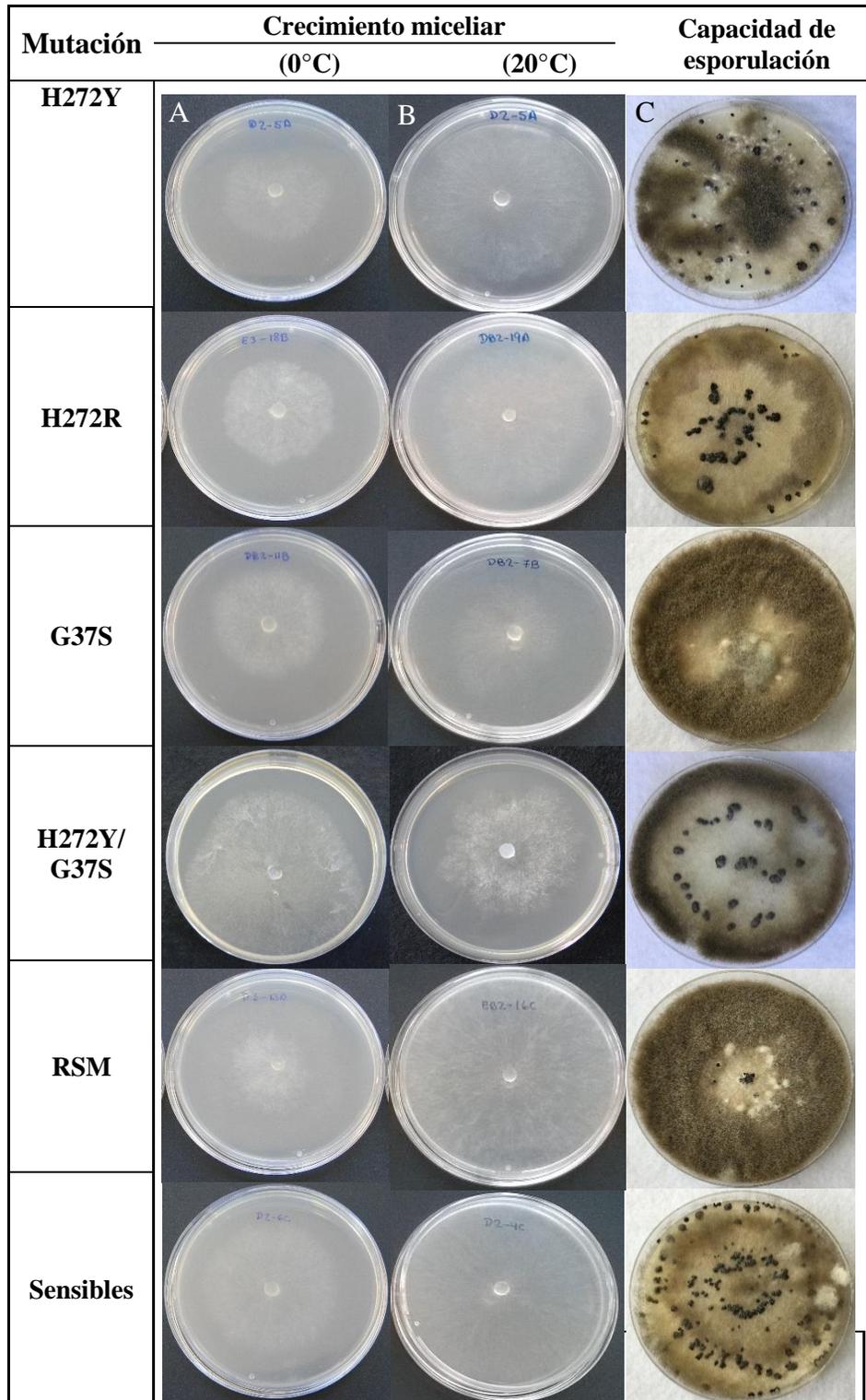


Figura 7. Crecimiento miceliar a 0°C y 20°C en PDA (columnas A y B) y capacidad de esporulación en 20 días de incubación a 20°C (columna C) de aislados con mutaciones H272Y, H272R, G37S, H272Y/G37S resistentes sin mutación (RSM) y sensibles de *B. cinerea*.

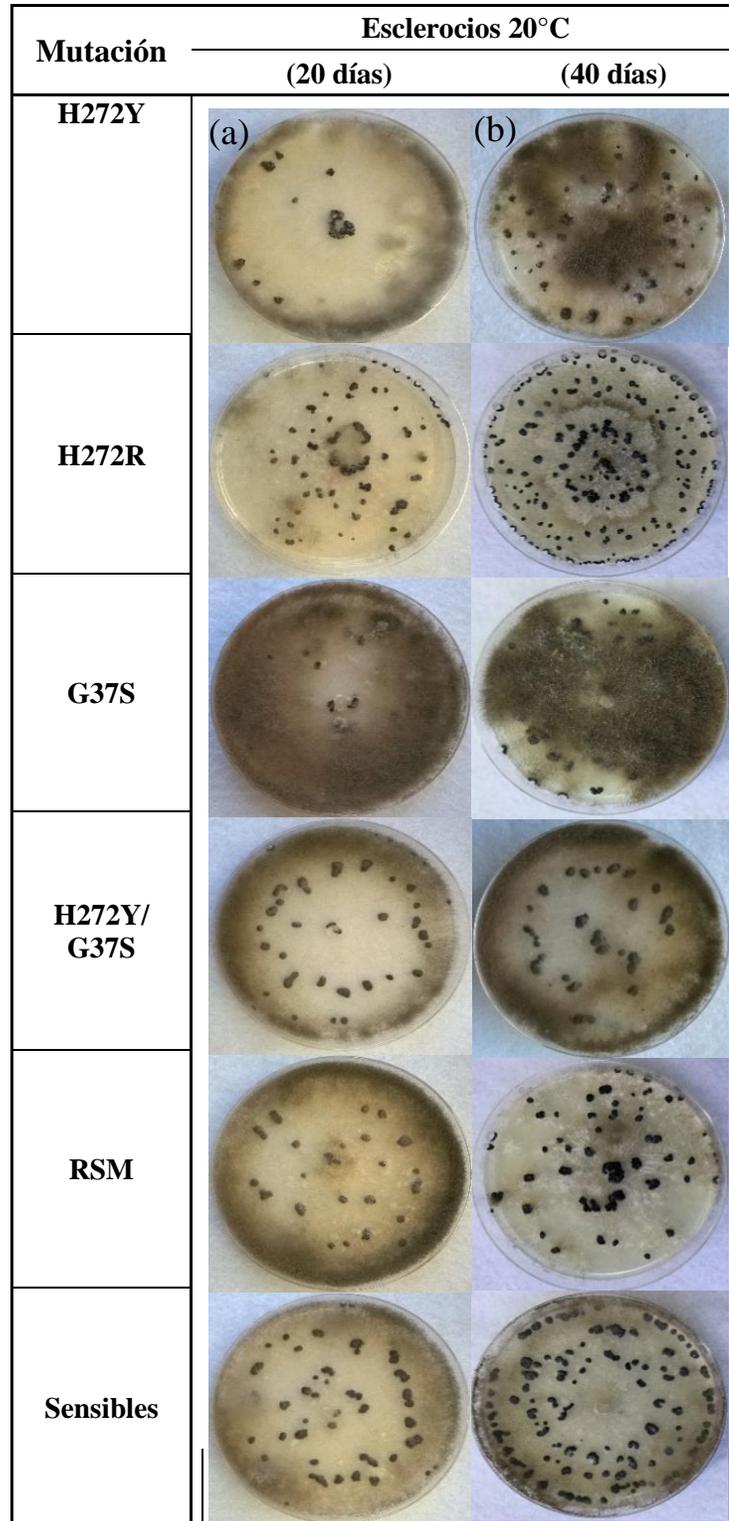


Figura 8. Producción de esclerocios luego de 20 (a) y 40 (b) días de incubación a 20 °C de aislados de *B. cinerea* con mutaciones H272Y, H272R, G37S, H272Y/G37S resistentes sin mutación (RSM) y sensibles en medio PDA.

Cuadro 8. Parámetros evaluados en la determinación de la capacidad de adaptabilidad de los distintos grupos de aislados de *B. cinerea* en estudio.

Mutación	N	Crecimiento miceliar (mm)		Capacidad de esporulación* (10E7)	Número de esclerocios**		Peso de esclerocios (g)***	
		20°C	0°C		20 DÍAS	40 DÍAS	20 DÍAS	40 DÍAS
H272Y	6	68,31 B	53,93 a	4,27 a	6,00 c	32,67 a	0,04 c	0,28 a
H272R	8	66,86 B	59,96 a	2,98 a	44,67 a	56,76 a	0,15 ab	0,43 a
G37S	3	64,65 B	59,77 a	4,49 a	9,20 bc	29,18 a	0,06 bc	0,33 a
RSM	8	71,78 ab	53,55 a	4,05 a	16,21 bc	31,12 a	0,11 abc	0,35 a
Sensibles	8	78,50 A	68,76 a	2,73 a	32,58 ab	46,00 a	0,17 a	0,41 a

RSM: resistentes sin mutación.

Aislado con mutación H272Y/G37S no fue considerado en ninguna prueba estadística por corresponder al comportamiento de un solo aislado.

Valores dentro de la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes según LSD de Fisher ($p < 0,05$).

*Número de esporas por placa de Petri.

**Número de esclerocios por placa de Petri.

***Peso fresco de esclerocios por placa de Petri.

Virulencia de los aislados de *Botrytis cinerea* con cambios aminoacídicos en las subunidades del complejo SDH

En la evaluación de virulencia no se detectaron diferencias entre los grupos de aislados evaluados ($p > 0,05$); sin embargo es importante señalar que el aislado que presentó las mutaciones H272Y/G37S obtuvo un mayor diámetro promedio de la lesión; (30,06 mm) pero, no fue considerado en ninguna prueba estadística por corresponder al comportamiento de un solo aislado, no haber más de una muestra (Figura 9) y que los aislados sensibles evidenciaron un crecimiento de micelio sobre la lesión (Figura 10).

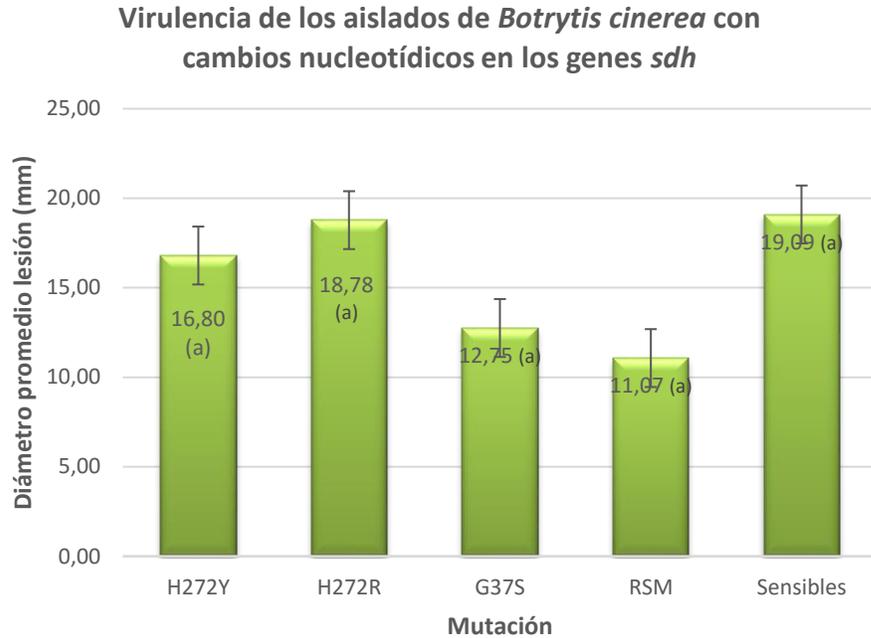


Figura 9. Virulencia expresada como diámetro promedio de la lesión causada en hojas de plántulas de *Cucumis sativus* L. variedad Marketmore 76, en relación a las mutaciones identificadas en los genes en las subunidades SDH [Diferencias no significativas ($p > 0,05$)]. Las líneas verticales indican el error estándar de la media.

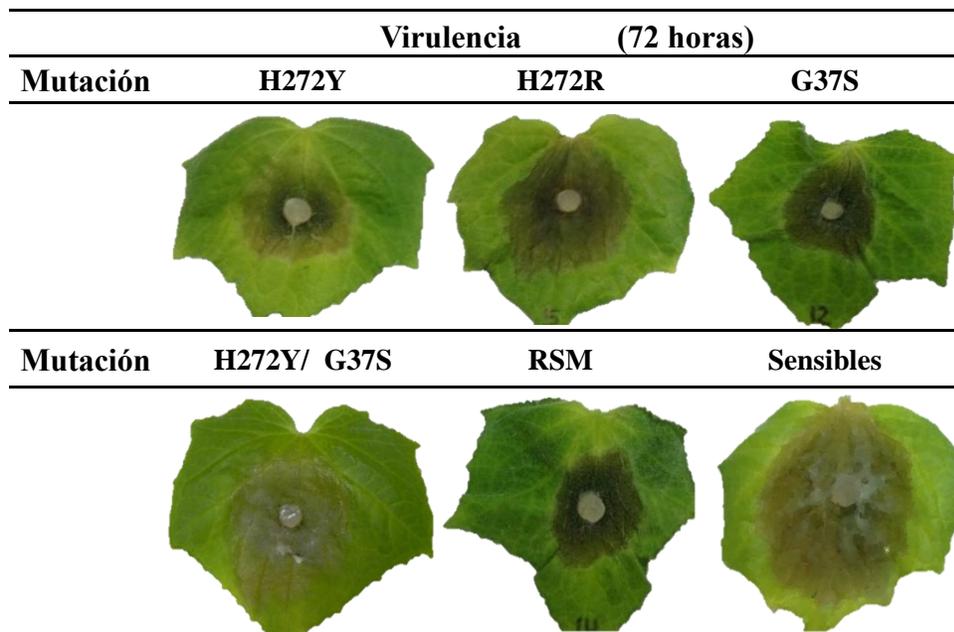


Figura 10. Lesiones en hojas de *Cucumis sativus* L. variedad Marketmore 76 inoculadas con discos de agar de aislados de *B. cinerea* con mutaciones H272Y, H272R, G37S, H272Y/G37S, aislados resistentes sin mutación (RSM) y sensibles mantenidos en incubación a 25°C y 100% HR por 72 h post inoculación.

DISCUSIÓN

La función de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), en el sistema respiratorio juega un papel importante en la generación de energía, este complejo enzimático se compone de un dominio periférico de membrana y un dominio de anclaje a la membrana. La región de las subunidades de anclaje a la membrana (SDHC y SDHD) contiene un sitio de unión de la ubiquinona y permiten la unión de las subunidades catalíticas (SDHA y SDHB) a la membrana mitocondrial interna, facilitando así la transferencia de electrones a la ubiquinona. De las mencionadas, las subunidades SDHB, SDHC y SDHD son las que contribuyen a la unión de la ubiquinona con los fungicidas de la familia de las carboxamidas (Leroux et al., 2010).

La secuenciación de los genes *sdh* de los aislados de *B. cinerea* permitió identificar las mutaciones H272Y y H272R, ambas en el codón 272 del gen *sdhB* y que se relacionan con la pérdida de sensibilidad a boscalid previamente reportadas (Stammler, 2008; De Miccolis et al, 2010; Leroux et al., 2010; Esterio et al., 2011; Veloukas et al, 2011; Yin et al., 2011). Entre las mutaciones presentes en los genes *sdh*, las más frecuentes asociadas a resistencia a los SDHIs en varios hongos fitopatógenos han sido las mutaciones en el codón 272 correspondiente a histidina (H272Y y H272R). Se ha postulado que la alta frecuencia de la mutación se debe a que la histidina reemplazada se encuentra en una región asociada con un centro de agrupamiento [3FE-4S] con un alto potencial redox hierro-azufre (SDHB), que desempeña un papel fundamental no sólo en la unión de la ubiquinona y su reducción, sino también con la unión de los fungicidas SDHIs tales como boscalid. Probablemente, esta histidina interactúa con un grupo metoxi O₃ de la ubiquinona formando un enlace de hidrógeno. Un fenómeno similar ocurre probablemente con un heteroátomo de la mayoría de los SDHI, por lo que son sitios adecuados de unión y, por tanto también de inhibición en el caso de una mutación (Leroux et al., 2010; Yin et al., 2011).

En cuanto a la predominancia de las mutaciones presentes en aislados de *B. cinerea* recuperados desde arándano, la mutación H272R destaca de manera importante, presentándose en el 33 % de los aislados analizados, seguido de un 6 % de aislados con mutación H272Y, coincidiendo con Román (2014) quien reporta un 22 % de mutaciones H272R y un 14 % de mutaciones H272Y en aislados de *B. cinerea* recuperados desde uva de mesa.

Según los resultados obtenidos tanto la mutación H272Y como la mutación H272R confieren a los aislados de *B. cinerea* recuperados desde arándano una elevada resistencia a boscalid, caso contrario a lo reportado por De Miccolis et al. (2014), en el que afirman que la mutación H272Y estaba relacionada con una baja resistencia en aislados de *B. cinerea*, pero, es importante señalar que en ese estudio los mutantes fueron inducidos en laboratorio. Por otro lado, se detectó que la mutación H272R también confería una elevada resistencia a los aislados en estudio, mientras Leroux et al. (2010) y Veloukas et al., (2011) reportaron que ambas mutaciones, H272Y/R, estaban relacionadas con una resistencia moderada hacia boscalid. Recientemente en Chile, Román et al. (2014) informaron que las mutaciones

H272R y H272Y, en aislados recuperados de *B. cinerea* desde uva de mesa se comportaban como resistentes y moderadamente resistentes a boscalid, respectivamente.

En el presente estudio, se secuenció además los genes *sdhC* y *sdhD* de los 100 aislados debido a que también se han notificado mutaciones puntuales aunque asociadas a un menor nivel de resistencia que las mutaciones en *sdhB* (Yin et al., 2011). En estas secuenciaciones se detectaron varios cambios nucleotídicos en ambos genes; pero no se detectó mutación alguna en el gen *sdhD* que se pudiera relacionar con una disminución de sensibilidad a boscalid; sin embargo, en el gen *sdhC*, sí se observó una nueva mutación en cuatro aislados resistentes a boscalid, G37S, en la que existe un reemplazo de una guanina (G) por una adenina (A) que da origen al cambio de una glicina por una serina en el aminoácido 37 de la proteína resultante, no se observó este polimorfismo en las secuencias del gen *sdhC* de ningún aislado sensible a boscalid por lo que se cree estaría asociado a pérdida de sensibilidad a éste fungicida.

Adicionalmente, la importancia de esta mutación radica en que el nucleótido que sufre el cambio se encuentra localizado en una zona conservada del gen, cuando es comparado con otros hongos filogenéticamente cercanos, revelando una alta identidad entre las diferentes secuencias, tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico. Esto demostraría que al tratarse de una zona conservada, ésta codifica para un dominio fundamental de la función proteica como en el caso de alteraciones en la posición 225 prolina (P) y en la posición 230 asparagina (N) del gen *sdhB* que son parte de una región altamente conservada del ADN del patógeno (Leroux et al., 2010), en las que es posible que este tipo de mutaciones presentes en regiones conservadas se transmitieran a su progenie reduciendo la eficacia de la molécula fungicida.-

De los 100 aislados en estudio, 15 aislados que presentaron leve a alta resistencia a boscalid (RSM) no presentaron mutaciones en los genes *sdhB*, *sdhC* ni *sdhD* que hubiesen sido previamente asociadas a resistencia a boscalid. Una posible explicación sería que los aislados RSM podrían presentar algún mecanismo de resistencia cruzada con un fungicida perteneciente a un grupo de diferente modo de acción, tal como lo exponen Chen et al. (2013) en su investigación sobre el mecanismo de resistencia de cepas de *Monilinia fructicola* en donde se describe la existencia de resistencia a propiconazol y a boscalid, a pesar de no presentar ninguna mutación en los genes *sdh A*, *B*, *C* y *D*. Adicionalmente, Miyamoto et al. (2010), también informaron la ausencia de mutaciones en los cuatro genes que codifican para las subunidades de la SDH de aislados de *Corynespora cassiicola* moderadamente resistentes a boscalid.

Tanto los aislados resistentes como aislados sensibles a boscalid, se comportaron como sensibles a fluopyram y a isofetamida, esto podría explicarse a que tanto fluopyram como isofetamida serían moléculas con mayor afinidad al sitio activo que boscalid, de tal manera que un cambio dado por mutaciones en los genes *sdh* afectaría más la unión boscalid-SDH que las uniones fluopyram-SDH o isofetamid-SDH (véase aislados sensibles Figura 4).

En el presente trabajo no se detectó resistencia cruzada negativa, entre los fungicidas SDHs estudiados en los aislados resistentes de *B. cinerea* analizados. No se observó resistencia

cruzada significativa entre boscalid y fluopyram en ningún aislado de *B. cinerea* siendo consistente con los resultados de Amiri et al. (2014), quienes, informaron la ausencia de resistencia cruzada entre boscalid y fluopyram en aislados de *A. alternata* en pistacho. Por otro lado Veloukas y Karaoglanidis (2012) tampoco observaron correlación entre el nivel de sensibilidad a fluopyram y a otros fungicidas, entre ellos boscalid, llegando incluso a resaltar la efectividad de fluopyram, mostrándolo como un fungicida clave en el manejo del control de *B. cinerea*. En otro estudio realizado por Amiri et al., en el 2014, se concluyó que no existía resistencia cruzada entre boscalid y fluopyram en ninguno de los aislados mutantes detectados, entre ellos los que presentaban las mutaciones H272R y H272Y. De isofetamida sólo se han reportado estudios de eficacia en el control de fitopatógenos y no han sido reportados estudios de resistencia cruzada. De acuerdo a los resultados se observa que al no existir resistencia cruzada entre boscalid y los nuevos fungicidas SDHIs (fluopyram e isofetamida) éstos últimos pueden ser utilizados en los programas de aplicación para el control de *B. cinerea*.

Junto con el estudio de resistencia cruzada por las mutaciones detectadas en los aislados, también se ha evaluado el impacto que éstas pueden tener sobre la capacidad de adaptabilidad de las poblaciones de *B. cinerea*. Al respecto es importante señalar que aunque se han realizado diferentes estudios experimentales que evalúan la relación entre la condición física y la resistencia a los fungicidas, los resultados obtenidos han sido bastante contradictorios. En el presente estudio se evidenció que aislados de *B. cinerea* con las mutaciones H272Y/R y G37S tuvieron un menor crecimiento de micelio a 20°C ($p < 0,05$), al igual que en la investigación llevada a cabo por Román (2014) en el que se indica que los aislados de *B. cinerea* de uva de mesa con mutaciones H272R sufren un costo metabólico que se traduciría en una menor capacidad de adaptabilidad, ya que presentaron menor crecimiento a 20°C. Otros estudios realizados por Miyamoto et al. (2010) en *Corynespora cassiicola*, no se han evidenciado diferencias significativas, en las tasas de crecimiento de micelio entre aislados resistentes y sensibles a boscalid.

En relación al crecimiento de micelio a 0°C los resultados señalan que no existe diferencia entre los diferentes grupos de aislados en estudio, comprobando que la temperatura afecta al desarrollo del micelio de los aislados, esto coincide con el estudio hecho por Román (2014) y por Kim and Xiao (2011), donde los aislados resistentes y sensibles presentan un comportamiento similar a 0°C.

De acuerdo a la evaluación de la capacidad de esporulación de los aislados de *B. cinerea* obtenidos desde arándanos, los resultados señalan que la presencia de mutaciones no afectan la capacidad de esporulación, lo que difiere del estudio reportado por Amiri et al. (2014) en el que los aislados que presentan mutaciones tienen una mayor capacidad de esporulación. Por otro lado, según el estudio realizado por Kim and Xiao (2011), los aislados resistentes a boscalid tendrían una menor capacidad de producción de conidias *in vitro* que los sensibles.

Adicionalmente, en otros estudios realizados en condiciones de laboratorio también se determinó una reducción de la capacidad de esporulación en aislados resistentes a fenhexamid (Billard et al., 2012) y en aislados resistentes a QoI (Markoglou et al., 2006).

Consecuentemente, al evaluar el número de esclerocios luego de 20 días posteriores a la siembra, se determinó que los aislados H272Y presentaron una formación más lenta de esclerocios, respecto de los sensibles; presentando con ello un comportamiento similar a los aislados resistentes a fenhexamid (Billard et al., 2012) y de aislados resistentes a QoI (Markoglou et al., 2006). En estudios realizados en Francia con aislados resistentes a boscalid que presentaban, la mutación H272R se determinó que no formaban esclerocios a 20°C (Lalève et al., 2013). En el presente estudio también se detectó este comportamiento en algunos de los aislados H272R.

Al evaluarse el peso de los esclerocios a los 20 días, se detectó diferencias entre los aislados con y sin mutación, presentando los esclerocios de los aislados H272Y un menor peso que los esclerocios de los aislados sin mutaciones, coincidiendo con el reporte de Amiri et al. (2014) en donde se detectó que los aislados con mutaciones en el gen *sdhB* producían menos esclerocios que los aislados sensibles. Este resultado estaría indicando que los aislados H272Y tendrían una menor capacidad de adaptabilidad frente a aislados sensibles ya que tardan más en formar sus esclerocios. Sin embargo, a los 40 días de incubación, no se evidencia diferencia alguna tanto en número como en peso de esclerocios en los diferentes grupos de aislados evaluados, lo cual indicaría que los aislados que presentan mutaciones requerirían un mayor tiempo para la formación de esclerocios, pero que no pierden la capacidad de formar esclerocios.

Los resultados obtenidos del comportamiento de los aislados H272R/Y con respecto a los aislados sin mutación de acuerdo a los parámetros de adaptabilidad evaluados; (crecimiento miceliar, capacidad formadora de esclerocios y capacidad de esporulación) permiten inferir que la presencia de las mutaciones H272Y y G37S en los aislados chilenos sí generarían en el hongo un costo metabólico. No obstante lo indicado, con el fin de corroborar estos resultados, sería importante efectuar nuevos estudios considerando un mayor número de aislados.

Finalmente, en relación a los resultados obtenidos en la evaluación de virulencia, no se observó diferencia entre los grupos en estudio, sensibles y resistentes, con y sin mutación, coincidiendo con Ma et al. (2007), quienes no observaron diferencias en el nivel de agresividad entre aislados resistentes y sensibles en hojas de pepino, lo que indica que la virulencia de aislados de *B. cinerea* no está asociada con la resistencia a moléculas fungicidas SDHI.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados en este estudio y mediante la metodología utilizada los resultados obtenidos permiten concluir que:

En arándano, los aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a boscalid presentan las mutaciones H272R y H272Y en el gen *sdhB* y G37S en el gen *sdhC*, siendo H272R la mutación predominante en la población analizada (33%). Siendo este el primer reporte de las mutaciones H272R/Y en aislados recuperados en arándano en Chile y el primer reporte de la mutación G37S en el gen *sdhC* en aislados de *Botrytis cinerea* asociado a resistencia a boscalid.

La presencia de las mutaciones H272Y, H272R y G37S en los aislados de *Botryti cinerea* generan un costo metabólico que se traduce en una menor capacidad de adaptación de estos aislados en el medio (menor crecimiento miceliar a 20 °C y formación de esclerocios inicialmente más lenta en aislados H272Y).

Ninguno de los aislados de *B. cinerea* sensibles a boscalid presentó mutaciones en los genes *sdhB*, *sdhC* ni en *sdhD*.

Finalmente, se rechaza la hipótesis inicialmente planteada, ya que los aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a boscalid recuperados desde arándano que tienen las mutaciones H272Y, H272R y G37S, no presentan resistencia cruzada con fluopyram e isofetamida.

LITERATURA CITADA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- Amiri, A., S. Heath and N. Peres. 2014. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. *Plant Disease*, 98:532-539.
- Avenot, H. and T. Michailides. 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Cop Protection*, 29: 643-651.
- Billard, A., Fillinger, S., Leroux P., Lachaise H., Beffa, R., and Debieu, D. 2012. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Management Science*, 68:684-691.
- Ceponis, M. and R. Capellini. 1983. Control of postharvest decays of blueberry fruits by precooling, fungicide, and modified atmospheres. *Plant Disease Reporter*, 67: 169-171.
- Chávez, R., F. Sánchez y B. Gustavsson. 1997. Chile: Berries para el 2000. Fundación Chile, Santiago, Chile. 133 p.
- Chen, F., X. Liu, S. Chen, E. Schnabel and G. Schnabel. 2013. Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both propiconazole and boscalid. *Plant Disease*. 97:645-651.
- De Miccolis, A., W. Habia, C. Rotolo, S. Pollastro, and F. Faretra. 2010. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. *European Journal of Plant Pathology*, 128:185-199.
- De Miccolis R., M. Masiello, C. Rotolo, S. Pollastro y F. Faretra. 2014. Molecular characterization and detection of resistance to SDHI fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science*. (Doi: 10.1002/ps.3748).
- Esterio, M., C. Ramos, M. Araneda y J. Auger. 2011. Situación actual de sensibilidad a botryticidas en las principales zonas productoras de uva de mesa en Chile. XX Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Libro de Resúmenes. Eds. Montealegre, J. y Henríquez, J. L. Santiago, Chile: SOCHIFIT. 49 p.
- Esterio, M.; M. Araneda; A. Román; A. Copier; L. Pizarro y J. Auger. 2014. Nuevas mutaciones asociadas con pérdida de sensibilidad a carboxamidas en aislados chilenos de *Botrytis cinerea*. XXIII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Libro de resúmenes. Eds. Cáceres M., Lolas M., Mujica., Sandoval C. Chile. 60 p.

Gale, E. and H. Epps. 1942. The influence of the presence of glucose during growth on the enzymatic activities of *Escherichia coli*: comparison of the effect that produced by fermentation acids. *Biochemical Journal*, 36, 600 – 619.

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

Haynes, W., L. Wickerham and C. Hesseltine. 1955. Maintenance of industrially important microorganisms. *Applied Microbiology*, 3:361-368.

Harvey, J. 1955. Decay in stored grapes reduced by field applications of fungicides. *Phytopathology*, 45: 137-140.

Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cinerea* from stored apples in Washington State. *Plant Disease*, 94: 604-612.

Kim, Y.K., and Xiao, C.L. 2011. Stability and fitness of pyraclostrobin- and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology*, 101 (11): 1385-1391.

Lalève, A., Gamet, S., Walker, A-S., Debieu, D., Toquin, V., Fillinger, S. 2013. Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environmental Microbiology*, 1462-2920.

Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch and A. Walker. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6615-6630.

Lingappa, Y. and J. Lockwood. 1960. *Phytopathology*, 50: 644.

Ma, Z., Yan, L., Luo, Y. and Michailides, T. 2007. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3): 300-306.

Markoglou, A., A. Malandrakis, A. Vitoratos, and B. Ziogas. 2006. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. *Plant Pathology*, 115:149-162.

Miyamoto T, Ishii H, Stammeler G, Koch A, Ogawara T, Tomita Y, et al. 2010. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. *Plant Pathology*, 59:873–881.

Monsanto Company. 2004. A recommended procedure for DNA extraction from plant tissues. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences [En línea]. Recuperado en:

http://www.monsanto.com/products/documents/dna-detection/dna_im.pdf. Consultado el: 29 de octubre de 2015.

Monteau, S., Abouna, S., Lambert, B., and Legendre, L. 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Fems Microbiology Ecology*, 43:359-366.

Panebianco A. 2012. Study on fungicide sensitivity and resistance in a population of *Botryotinia fuckeliana* collected from table grapes in Sicily (Southern Italy). Thesis [Ph.D.] University of Catania. 128p.

Raposo, R., V. Gomez, T. Urrutia and P. Melgarejo. 2000, nov. Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology*, 90 (11):_1246-1249.

Román, A. 2014. Caracterización genética y fenotípica de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de diferente grado de sensibilidad a boscalid. Tesis [M. Sc], Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 46h.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2d edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y. 40 p.

Stammler, G., H. Brix, A. Glättli, M. Semar, U. Schoefl, 2007. Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. In: Proceedings XVI International Plant Protection Congress. Glas gow, UK. 40- 45 p.

Stammler, G. 2008. Mode of action, biological performance and latest monitoring results of boscalid sensitivity. In: Abstr.18th Symposium Res. Committee on Fungicide Resistance. The Phytopathological Society of Japan. Matsueshi, Japan. 30-43 p.

Stammler, G., A. Wolf, A. Glaettli and K. Klappach. 2015. Mechanisms of resistance. Respiration Inhibitors: Complex II. (cap. 1, pp.104-117). En: Ishii H. and D.W. Hollomon (eds.). Fungicide resistance in plant pathogens. Japan: Springer. 490p.

Veloukas, T., M. Leroch, M. Hahn and G. Karaoglanidis. 2011. Detection and molecular characterization of boscalid resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. Thessaloniki, Greece. *Plant Disease*, 95:1302-1307.

Veloukas, T. and G. Karaoglanidis. 2012. Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. *Pest Management Science*, 68: 858-864.

Veloukas, T., P. Kalogeropoulou, A. N. Markoglou, and G. S. Karaoglanidis. 2014. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations. *Phytopathology*, 104(4): 347-356.

Yin, Y., K. Kim and C. Xiao. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology*, 101:986-995.

APÉNDICES

Apéndice 1. Alineamiento de secuencias del gen *sdhC* con mutación G37S de los aislados de *B. cinerea* resistentes a boscalid con la secuencia de referencia de *B. cinerea* B05.10, *Sclerotinia borealis*, *Monilinia fructicola* y *Oidiodendron maius*. Se muestra la constancia en la repetición de aminoácidos alrededor del codón que presenta la mutación.

	10	20	30	40	50
Oidiodendron maius Z	ATQQSLRRLAAGQP	PAMISQFVMKRAL	APAAV	GAFVQTRPVATQ	KMTAESSYDIL
Monilinia fructicola	ATQQSLRRLAAGR	PSSLISQLATRRLA	APTAV	GASMQTRPVTE	EKLTPKDSYNIL
Sclerotinia borealis	ATQQSLRRLAAGQP	SSLISQLAMRR	IAAPAAI	GASMQTRPVTE	EKLTPKDSYNIL
B05.10	ATQQSLRRLAAGQP	SSLISQLAMR	KLAAPAAI	GASMQTRPVATQ	KLTPKDSYNIL
D2-4C	ATQQSLRRLAAGQP	SSLISQLAMR	KLAAPAAI	GASMQTRPVATQ	KLTPKDSYNIL
DB2-7B	ATQQSLRRLAAGQP	SSLISQLAMR	KLAAPAAI	SASMQTRPVATQ	KLTPKDSYNIL
DB2-7C	ATQQSLRRLAAGQP	SSLISQLAMR	KLAAPAAI	SASMQTRPVATQ	KLTPKDSYNIL
DB2-11B	ATQQSLRRLAAGQP	SSLISQLAMR	KLAAPAAI	SASMQTRPVATQ	KLTPKDSYNIL
DB2-16C	ATQQSLRRLAAGQP	SSLISQLAMR	KLAAPAAI	SASMQTRPVATQ	KLTPKDSYNIL

Apéndice 2. Código, mutaciones y niveles de sensibilidad a boscalid, fluopyram e isofetamida de aislados de *Botrytis cinerea* utilizados en el estudio.

n	Aislados	Mutaciones <i>sdh</i>	Nivel de sensibilidad a boscalid	Sensibilidad (EC ₅₀ µg.mL ⁻¹)		
				Boscalid	Fluopyram	Isofetamida
1	D2-5A	H272Y	AR	1,E+4	0,02	0,07
2	D2-5B	H272Y	AR	5,E+1	0,28	0,10
3	F2-10B	H272Y	AR	7,E+6	0,85	0,16
4	F2-20A	H272Y	AR	1,E+29	1,60	0,16
5	FB2-7A	H272Y	AR	2,E+20	0,04	0,07
6	FB4-11A	H272Y	AR	2,E+6	0,28	0,11
7	D3-6B	H272R	AR	2,E+20	2,13	0,91
8	D3-16A	H272R	AR	6,E+6	1,59	0,68
9	D3-16B	H272R	AR	3,E+6	2,32	0,74
10	D3-24A	H272R	AR	1,E+2	2,65	1,53
11	DB2-15C	H272R	AR	4,E+4	1,58	0,64
12	DB2-16A	H272R	AR	2,E+8	1,48	0,60
13	DB2-17C	H272R	AR	8,E+12	1,73	0,36
14	DB2-18C	H272R	AR	1,E+13	2,08	0,42
15	DB2-19A	H272R	AR	8,E+3	3,32	1,99
16	E3-2B	H272R	AR	5,E+8	2,05	0,84
17	E3-2C	H272R	AR	1,E+5	1,77	1,07
18	E3-3C	H272R	AR	4,E+12	1,93	1,61
19	E3-3D	H272R	AR	1,E+16	1,47	0,47
20	E3-3E	H272R	AR	6,E+5	0,46	0,96
21	E3-6A	H272R	AR	3,E+7	0,21	0,68
22	E3-6C	H272R	AR	4,E+9	0,21	0,72
23	E3-16A	H272R	AR	8,E+3	0,84	0,21
24	E3-16C	H272R	AR	3,E+6	2,09	0,42
25	E3-18B	H272R	AR	2,E+7	0,12	0,56
26	F3-2B	H272R	AR	4,E+9	3,18	0,38
27	F3-2C	H272R	AR	7,E+10	1,85	0,18
28	F3-23C	H272R	AR	4,E+10	0,94	0,87
29	FB2-4A	H272R	AR	6,E+6	1,40	0,22
30	FB2-7B	H272R	AR	1,E+14	2,12	0,87
31	FB2-8A	H272R	AR	5,E+5	1,94	2,05
32	FB2-10A	H272R	AR	5,E+2	0,19	0,08
33	FB2-19C	H272R	AR	8,E+19	2,37	0,37
34	FB4-5B	H272R	AR	1,E+29	1,91	0,45
35	FB4-5C	H272R	AR	6,E+3	2,06	1,72
36	FB4-11B	H272R	AR	3,E+4	0,86	2,01

Continúa...

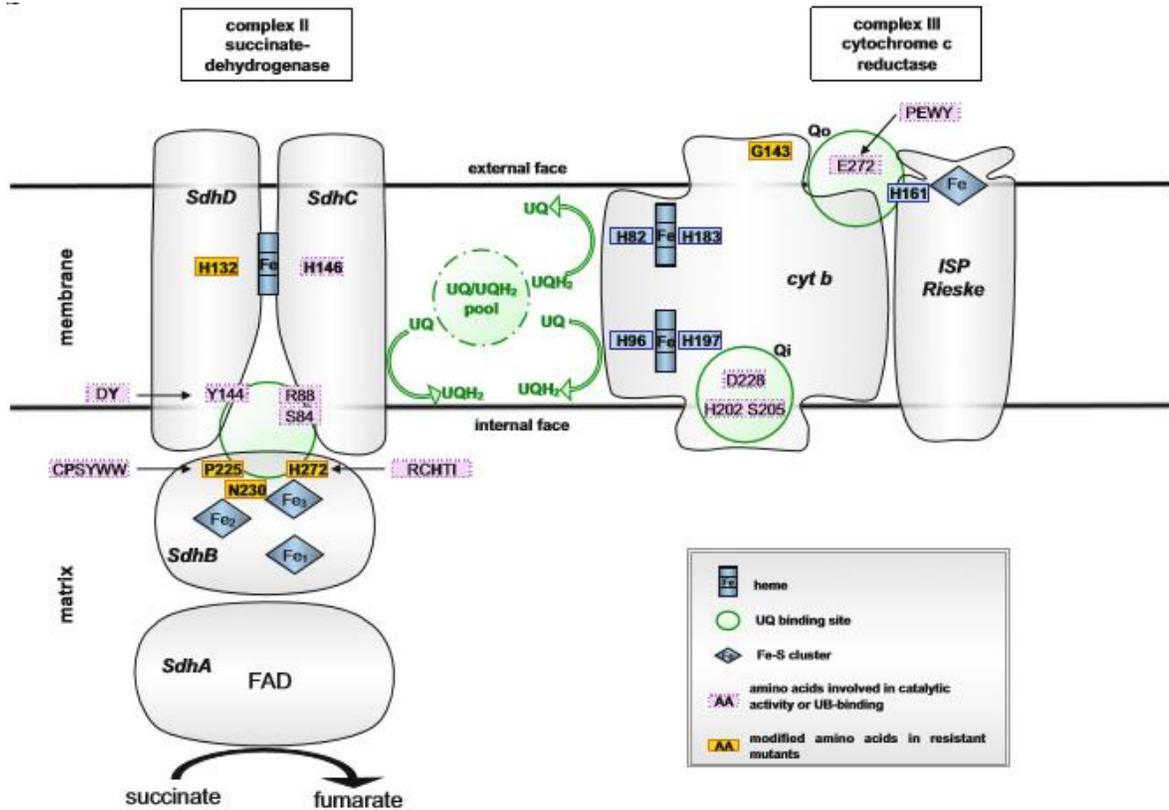
37	FB4-12A	H272R	AR	3,E+5	2,62	1,62
38	FB4-9B1	H272R	AR	3,E+6	2,74	0,53
39	FB4-6C	H272R	AR	3,E+4	1,63	0,23
40	DB2-7B	G37S	LR	2,E+1	2,81	1,93
41	DB2-7C	G37S	LR	2,E+1	2,03	1,63
42	DB2-11B	G37S	LR	2,E+1	2,09	1,23
43	DB2-16C	H272Y/G37S	AR	4,E+23	2,68	0,63
44	D2-11C	RSM	LR	2,E+1	2,48	1,06
45	D3-13A	RSM	AR	1,E+2	2,39	0,58
46	D3-13B	RSM	AR	1,E+2	3,89	2,22
47	D3-15B	RSM	AR	2,E+5	0,77	0,70
48	D3-17B	RSM	MR	3,E+1	2,75	1,84
49	DB2-5C	RSM	AR	6,E+1	3,71	2,30
50	DB2-6B	RSM	AR	4,E+4	6,26	2,06
51	DB2-8C	RSM	LR	3,E+1	4,50	1,97
52	DB2-13C	RSM	AR	9,E+5	0,47	0,07
53	E2-5C	RSM	AR	8,E+3	0,64	0,55
54	E2-15B	RSM	LR	2,E+1	2,41	2,18
55	E3-3B	RSM	LR	2,E+1	2,54	0,80
56	E3-6B	RSM	AR	1,E+6	3,97	1,32
57	E3-20B	RSM	LR	2,E+1	2,37	2,19
58	EB2-16C	RSM	LR	2,E+1	3,32	1,98
59	D2-1A	Sensible	S	3,61	2,25	1,08
60	D2-2A	Sensible	S	3,61	1,94	1,52
61	D2-2B	Sensible	S	2,08	2,78	0,69
62	D2-3C	Sensible	S	4,08	2,66	0,69
63	D2-4C	Sensible	S	0,47	0,11	0,30
64	D2-5C	Sensible	S	10,52	2,39	1,80
65	D2-6A	Sensible	S	0,56	0,66	0,23
66	D2-6B	Sensible	S	1,04	1,36	1,21
67	D2-6C	Sensible	S	0,27	0,86	0,56
68	D2-20A	Sensible	S	2,13	2,33	1,32
69	D3-3B	Sensible	S	1,11	2,20	0,66
70	D3-3BB	Sensible	S	1,35	2,67	1,04
71	D3-4A	Sensible	S	0,41	1,00	1,11
72	D3-11B	Sensible	S	7,64	2,98	2,01
73	D3-22B	Sensible	S	0,46	1,63	0,62
74	D3-23B	Sensible	S	2,70	1,47	0,57
75	DB2-11C	Sensible	S	12,99	4,59	1,83
76	E2-3A	Sensible	S	14,08	1,96	2,06

Continúa...

77	E2-6A	Sensible	S	9,72	2,70	1,82
78	E2-6C	Sensible	S	2,99	1,60	1,58
79	E2-10B	Sensible	S	1,20	2,07	0,50
80	E2-12A	Sensible	S	0,87	1,29	0,42
81	E2-12B	Sensible	S	0,79	0,78	0,63
82	E2-15A	Sensible	S	1,83	1,56	1,18
83	E2-16B	Sensible	S	0,99	1,34	0,38
84	E2-18A	Sensible	S	0,99	1,37	0,38
85	E2-23A	Sensible	S	5,97	2,69	1,41
86	E3-7CA	Sensible	S	4,52	1,09	1,32
87	EB2-12B	Sensible	S	2,22	1,57	1,28
88	EB2-20A	Sensible	S	0,82	1,56	1,04
89	F2-1C	Sensible	S	9,92	2,82	1,86
90	F2-6A	Sensible	S	5,91	3,44	1,08
91	F2-7B	Sensible	S	4,20	1,68	1,13
92	F2-8A	Sensible	S	1,10	1,82	1,19
93	F2-9C	Sensible	S	1,92	1,72	0,76
94	F2-11A	Sensible	S	4,40	1,98	1,04
95	F2-11B	Sensible	S	1,67	1,67	0,81
96	F2-12B	Sensible	S	8,66	2,88	1,85
97	F2-13A	Sensible	S	0,49	0,09	0,71
98	F2-23B	Sensible	S	1,20	2,18	1,67
99	FB4-7C	Sensible	S	0,50	1,12	0,70
100	FB4-11C	Sensible	S	1,50	1,14	0,73

ANEXO

Anexo 1. Estructura esquemática del complejo mitocondrial II (SDH), se indica los principales aminoácidos de las diferentes subunidades implicados en la unión de los inhibidores y el número de codón donde hay presencia de resistencias. El complejo II contiene cuatro subunidades SDHA, SDHB, SDHC y SDHD.



Fuente: Leroux et al. (2010)

Anexo 2. Simulación de la estructura y conformación de la subunidad SDHC en la membrana mitocondrial mediante el uso del programa Phyre 2.0. La flecha indica la posición en la que se encontraría el codón 37 en donde se lleva a cabo el cambio nucleotídico que da lugar a la mutación G37S.

