



UNIVERSIDAD DE CHILE
Campus Sur

**DOCTORADO EN CIENCIAS SILVOAGROPECUARIAS
Y VETERINARIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES
ASOCIADOS A RESISTENCIA A FLUDIOXONIL EN AISLADOS
CHILENOS DE *Botrytis cinerea***

Charleen Copier Aliaga

Tesis para optar al Grado de
Doctor en Ciencias
Silvoagropecuarias y
Veterinarias

**PROFESOR GUÍA: HERMAN SILVA ASCENCIO
PROFESOR CO-GUÍA: MARCELA ESTERIO GREZ**

SANTIAGO, CHILE
Abril, 2024



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS
AGRONÓMICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



Universidad de Chile
favet
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias



UNIVERSIDAD DE CHILE
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos
Doctor Fernando Monckeberg Barros



cfcn
Facultad de
Ciencias Forestales y de la
Conservación de la Naturaleza
UNIVERSIDAD DE CHILE

DOCTORADO EN CIENCIAS SILVOAGROPECUARIAS Y VETERINARIAS

CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS A RESISTENCIA A FLUDIOXONIL EN AISLADOS CHILENOS DE *Botrytis cinerea*

Charleen Copier Aliaga

Tesis para optar al Grado de Doctor en
Ciencias Silvoagropecuarias y
Veterinarias

PROFESOR GUÍA: HERMAN SILVA ASCENCIO
PROFESOR CO-GUÍA: MARCELA ESTERIO GREZ

SANTIAGO, CHILE

Abril, 2024

**DOCTORADO EN CIENCIAS SILVOAGROPECUARIAS Y
VETERINARIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES
ASOCIADOS A RESISTENCIA A FLUDIOXONIL EN AISLADOS
CHILENOS DE *Botrytis cinerea***

Charleen Copier Aliaga

Tesis para optar al Grado de Doctor en
Ciencias Silvoagropecuarias y
Veterinarias

COMITÉ DE TESIS

	Calificación	Firma
Herman Silva A.	-----	-----
Marcela Esterio G.	-----	-----
Jaime Auger S.	-----	-----
Milena Cotorás T.	-----	-----
Rodrigo Infante E.	-----	-----
Nicola Fiore	-----	-----

SANTIAGO, CHILE

Abril, 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Mediante la presente, yo **Charleen Elizabeth Copier Aliaga** declaro que esta tesis corresponde a un trabajo original, el cual no he utilizado para la obtención de otros títulos o grados. A su vez declaro que cualquier aporte intelectual de otros autores ha sido debidamente referenciado en el texto

Este trabajo recibió financiamiento de:

Programa Becas de Doctorado Nacional ANID Folio: 21180565

Proyecto FIA PYT-2016-0243

Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile

Santiago, 12 de abril, 2024

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de esta tesis, especialmente a:

Mi profesor Guía Herman Silva, por su confianza, apoyo, colaboración y múltiples enseñanzas en la realización de este trabajo.

Mi profesora Co-Guía Marcela Esterio, por la entrega de herramientas para mi desarrollo profesional, por motivar y apoyar mi constante aprendizaje vinculado al quehacer científico.

A los profesores que participaron como comisión evaluadora de este trabajo de tesis, quienes demostraron su apoyo y aportaron conocimientos enfocados en sus diferentes áreas de experiencia.

A Claudio Osorio, por su constante ayuda en la realización de esta investigación y por la entrega de conocimientos asociados al área molecular.

A los integrantes tanto del Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular y del Laboratorio de Genómica Funcional y Bioinformática, por su ayuda, consejos y compañía a lo largo de la realización de esta investigación.

A Simón Navarrete, por darme el tiempo y la tranquilidad para la realización de la última etapa de esta investigación.

A mis padres y a Hermes, por todo el apoyo brindado en esta etapa, por su incentivo en seguir adelante, por su incondicional entrega y cariño.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Importancia del cultivo de uva de mesa en Chile.....	3
<i>Botrytis cinerea</i> , agente causal de la pudrición gris en la vid.....	4
Control de la pudrición gris en la vid.....	9
Fludioxonil, molécula clave en el control de <i>Botrytis cinerea</i>	10
Pérdida de sensibilidad a fludioxonil.....	13
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
ÍNDICE DE CAPÍTULOS.....	19
CAPITULO I. A Conservative Mutant Version of the Mrr1 Transcription Factor Correlates with Reduced Sensitivity to Fludioxonil in <i>Botrytis cinerea</i>	20
DISCUSIÓN GENERAL	44
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	52
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	75
ANEXOS.....	76

RESUMEN

La uva de mesa (*Vitis vinifera* L) es una de las principales especies del rubro frutícola del país y la “pudrición gris”, causada por el hongo *Botrytis cinerea* (*Bc*), el principal problema fitopatológico que la afecta. El manejo de esta enfermedad es integrado, considerando labores culturales en el periodo de crecimiento del racimo y control químico preventivo en los periodos críticos de infección (floración y desde envero a cosecha). Sin embargo, este manejo no siempre ha sido del todo satisfactorio, debido principalmente a la gran capacidad que presenta *Bc* de generar resistencia a los fungicidas. Tal es el caso de la pérdida de sensibilidad detectada a fludioxonil, molécula fungicida clave para el control químico de este patógeno. En base a esto, se han realizado diversos estudios para explicar cuál es el mecanismo que origina este fenómeno. Se ha postulado, que la pérdida de sensibilidad es debido a mutaciones en el gen *bos1*, el cual codifica la proteína histidina kinasa, proteína importante en la conidiación y patogénesis de *Bc*, antecedente que podría explicar la baja frecuencia de aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil detectados en condiciones de campo. Sin embargo, investigaciones realizadas en aislados chilenos de *Bc*, con pérdida de sensibilidad a fludioxonil, no mostraron alteración en su capacidad formadora de esclerocios y de esporulación, lo cual podría sugerir que la pérdida de sensibilidad a esta molécula estaría asociada a un mecanismo diferente. Algunos autores han relacionado este fenómeno con la sobreexpresión de proteínas de membranas mecanismo conocido como Resistencia Multidroga (MDR). Se ha podido determinar que este mecanismo en *Bc* se debe a un aumento del nivel de la proteína ABC transportadora AtrB (BcatrB), como consecuencia de la sobreexpresión del gen *atrB*, sin embargo, el mecanismo de la sobreexpresión de este gen aún permanece incierto. Debido a ello, en esta investigación se analizaron mediante técnicas moleculares 10 aislados sensibles y 22 con pérdida de sensibilidad a fludioxonil. Los resultados mostraron que todos los aislados con pérdida de sensibilidad presentaron mutaciones en el factor de transcripción Mrr1, encargado de regular la expresión de *atrB* y además un aumento en la expresión de este gen con respecto a los aislados sensibles. Por lo tanto, este resultado indicaría que el mecanismo de pérdida de sensibilidad a fludioxonil en aislados chilenos de *Botrytis cinerea* se asociaría a alteraciones en Mrr1, aumentando con ello el nivel de expresión de *atrB*.

Palabras Claves: Fungicida, pudrición gris, MDR, *atrB*.

ABSTRACT

Table grape (*Vitis vinifera* L) is one of the main species of fruit commodities of Chile and gray mold disease caused by *Botrytis cinerea* (*Bc*) is the most significant phytopathological threat that affects them. The integral management of this disease considers cultural tasks carried out during the growth of bunch and preventive chemical control treatments during the critical periods of infection (flowering and veraison to harvest). However, this management is not always entirely satisfactory, mainly due to the great capacity of *Bc* to generate resistance to fungicides. Such is the case of the reduced sensitivity detected to fludioxonil, a key fungicide for the control of this pathogen. Based on this, various studies have been carried out to explain what it is the mechanism that causes this phenomenon. It has been postulated, that the reduced sensitivity is due to mutations in the *bos1* gene, which codes for the histidine kinase protein, an important protein in conidiation and pathogenesis in *Bc*, a background that could explain the low frequency of isolates with reduced sensitivity to fludioxonil detected on the field. However, research conducted on Chilean *Bc* isolates, with reduced sensitivity to fludioxonil, shows that its sclerotia-forming capacity and sporulation is not altered, which could suggest that reduced sensitivity to this molecule, in these isolates, would be associated with a different mechanism. Some authors have linked this phenomenon with Multidrug Resistance (MDR) mechanism. It has been possible to determine that this mechanism in *Bc* is due to an increase in the level of the ABC transporter AtrB protein (BcatrB), as a consequence of the overexpression of the *atrB* gene. However, the mechanism of the overexpression of this gene remains uncertain. Due to this, in this investigation, 10 sensitive isolates and 22 with reduced sensitivity to fludioxonil were analyzed using molecular techniques. The results showed that all the isolates with reduced sensitivity to fludioxonil presented mutations in the Mrr1 transcription factor, responsible for regulating the expression of *atrB*, and also an increase in the level of expression of this gene with respect to the sensitive isolates. Therefore, this result would indicate that the mechanism of reduced sensitivity to fludioxonil in Chilean isolates of *Botrytis cinerea* would be associated with alterations in Mrr1, thereby increasing the expression level of *atrB*.

Keywords: fungicide, grey mold, MDR, *atrB*.

INTRODUCCIÓN

Importancia del cultivo de uva de mesa en Chile

La uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) es uno de los frutales de mayor importancia en Chile. Actualmente, la superficie plantada corresponde a 39.000 Há, abarcando principalmente desde la región de Atacama hasta la región del Maule, donde la región de O'Higgins presenta la mayor superficie con aproximadamente 11.000 Há (Odepa, 2023). Anualmente se exportan 500.000 toneladas destinadas especialmente a los mercados de Estados Unidos, Europa y Asia (Odepa, 2023). Su transporte es principalmente marítimo, debiendo permanecer hasta 60 días en almacenamiento refrigerado para llegar a los puertos de destino. Existen diferentes variedades cultivadas en nuestro país, de las cuales Red Globe, Crimson Seedless, Thompson Seedless y Flame Seedles representan alrededor del 60% del volumen total exportado (Odepa, 2023). De estas el cultivar Thompson Seedless, conocido comúnmente en Chile como uva Sultanina, se posiciona en el segundo lugar de las exportaciones, ya que posee una gran aceptación por parte del consumidor, principalmente, por sus características organolépticas (Crisosto and Gordon, 2002; Muñoz-Robredo *et al.*, 2011). Este cultivar originado en Asia Menor se distribuyó a nivel mundial con diferentes nombres, hasta que en el año 1978 fue introducido en California, Estados Unidos por William Thompson, por el cual se debe su nombre. Esta variedad a diferencia del resto no se originó por cruzamientos dirigidos como comúnmente se trabaja en programas de mejoramiento genético y destaca por las bayas de forma oval, de color verde pálido a ámbar, con ausencia de semillas, los racimos son grandes y de forma alargada con pesos promedios que varían entre 700 y 900 gramos (Torres, 2017).

A pesar de la productividad que presenta Thompson Seedless en Chile, su manejo tiende a ser dificultoso, principalmente por su gran susceptibilidad al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Uno de los factores asociados a esta susceptibilidad, se debe al sistema de conducción de parronal español con el cual se maneja esta variedad, y que aumenta la humedad y disminuye la luminosidad en el cultivo, condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad. Y, por otro lado, las características fisicoquímicas presentes principalmente en la baya, particularmente

desde envero en adelante, relacionadas con la disminución de compuestos antioxidantes y la disminución en el grosor de la cutícula, que posibilitan la germinación, la diseminación y el establecimiento del patógeno en el campo (Deytieux-Belleau *et al.*, 2009; Mlikota *et al.*, 2003). Esta problemática, junto con otros factores como la alta demanda de mano de obra, ha afectado seriamente el manejo y la producción de esta variedad en Chile, reduciendo significativamente su rendimiento través del tiempo. Ejemplo de ello es la producción obtenida en la temporada 2011-2012 correspondiente a 170 toneladas de fruta, mientras que la producción en la temporada 2019-2020 fue de 125 toneladas (Odepa, 2021).

***Botrytis cinerea*, agente causal de la pudrición gris en la vid**

B. cinerea Pers Fr. [teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel] hongo perteneciente al Phylum Ascomycota, clase Leotiomycetes y familia Sclerotiniaceae, es uno de los patógenos necrotróficos con mayor distribución a nivel mundial que presenta un amplio rango de hospederos, afectando alrededor de 500 especies distintas de plantas (Elad, 2016; Kuroyanagi *et al.*, 2022; Walker *et al.*, 2016). Sin embargo, estudios moleculares señalan la existencia de un alto grado de variabilidad genética y algún nivel de especificidad de aislados del hongo con respecto a sus hospederos (Kuroyanagi *et al.*, 2022; Muñoz *et al.*, 2002). Las pérdidas económicas asociadas a *B. cinerea* incluyen diversos cultivos frutales y hortícolas, como también plantas ornamentales. El gran daño provocado por este tipo de infección afecta seriamente la comercialización de la uva de mesa en Chile y en diversas regiones a nivel mundial, reportándose pérdidas económicas de hasta un 30% de la producción (Dean *et al.*, 2012; Hao *et al.*, 2017). Debido a estos antecedentes, en el año 2012 *B. cinerea* fue propuesto como el segundo patógeno más importante a nivel mundial superado por *Magnaporthe oryzae* (Dean *et al.*, 2012).

En la vid, este hongo es el agente causal de la “pudrición gris” caracterizada, en los estados avanzados de la enfermedad, por un crecimiento micelial profuso con abundante esporulación. En este frutal, las flores y bayas son altamente susceptibles al ataque y colonización de *B. cinerea* (Altieri *et al.*, 2023; Auger, 1981; Deytieux-Belleau *et al.*, 2009; McClellan and Hewitt,

1973; Latorre *et al.*, 2015; Mehari *et al.*, 2017; Mundy and Beresford, 2007; Pastor, 1980; Pezet *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2022; Tziros *et al.*, 2022). Las flores, al estar infectadas pueden desarrollar síntomas de necrosis (Latorre, 1986; Mehari *et al.*, 2017), sin embargo, pueden estar aparentemente sanas, ya que la infección producida por el hongo puede permanecer latente o confinada producto de la acción de los mecanismos de defensa de la planta que inhabilitan al patógeno a dispersarse en el cultivo, no obstante este fenómeno generalmente permanece hasta que las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo, permitiendo que *Botrytis* pueda vencer estos mecanismos de defensa generando una infección visible en el campo (Ciliberti *et al.*, 2015; Elmer and Michailides, 2004; González-Domínguez *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 1988). Posteriormente durante el invierno, se presentan síntomas que se caracterizan por el pardeamiento de la cutícula de la baya, el crecimiento de micelio de color grisáceo y por una abundante esporulación de color pardo grisácea (Holz *et al.*, 2003; Pastor, 1980) (Figura 1). Esta sintomatología se produce principalmente por una disminución de compuestos antifúngicos en la baya, ya que se utilizan como sustrato para la respiración, y por un aumento de sólidos solubles debido a la detención del crecimiento y al aumento de la evaporación de agua presente (Peña, 2019). Además, pueden ocurrir infecciones en postcosecha, caracterizadas por un crecimiento miceliar blanquecino con ausencia de esporas, provocadas principalmente por los estados latentes del hongo presentes en campo (Keller *et al.*, 2003; Pezet *et al.*, 2003; Sonker *et al.*, 2016; Wilcox *et al.*, 2015) (Figura 1).



Figura 1. Sintomatología característica de la infección causada por *Botrytis cinerea*. A. Síntomas producidos en campo. B. Síntomas producidos en post-cosecha. Fuente: Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular, Universidad de Chile.

Las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo y crecimiento de *B. cinerea* son temperaturas moderadas y presencia de alta humedad. El crecimiento del micelio ocurre con temperaturas que fluctúan entre los 18 y 23°C, sin embargo, su crecimiento se ha podido detectar incluso a bajas temperaturas (4°C), y humedad relativa del 80% (Auger, 1981; Fedele *et al.*, 2020; Latorre and Rioja, 2002). La producción de esporas ocurre en rangos de temperaturas fluctuantes entre 15 y 20°C y las condiciones óptimas de germinación corresponden a 20°C y humedad relativa de 90% (Agrios, 1996; Auger, 1981).

El patógeno se caracteriza por la producción de esclerocios, los cuales son estructuras de resistencia que le permiten sobrevivir bajo condiciones poco favorables para su desarrollo. Estas estructuras están formadas por micelio compactado, son de consistencia dura, de coloración negra en su exterior y blanca interiormente, y corresponden a la principal forma de reservorio del patógeno (Auger, 1987). También el hongo puede sobrevivir en forma de micelio esporulante en restos de plantas afectadas (Auger, 1981; Auger y Esterio, 1997).

La fase teleomorfa de *B. cinerea* es poco frecuente en la naturaleza, en ella produce ascosporas en apotecios (Agrios, 1996). Se estima, que por el alto grado de variabilidad que presenta el hongo y por el proceso de especiación detectado, debiera estar presente, ya que esta fase es la principal causa de variación en los organismos. Por otro lado, también es importante señalar que los esclerocios corresponden a unos de los componentes esenciales de esta fase ya que actuarían como gameto femenino, mientras que las microconidias producidas por el hongo actuarían como gameto masculino (Raposo *et al.*, 2001).

La infección provocada por *B. cinerea* consta de diferentes etapas. La primera de ellas corresponde a la germinación de esporas y a la adhesión al hospedero, dando origen al inóculo primario; la segunda ocurre cuando el hongo penetra el tejido vegetal, comúnmente por heridas o aberturas naturales, o por su degradación producto de la acción de enzimas, toxinas, y metabolitos secundarios (Choquer *et al.*, 2007; Doss, 1999); la tercera corresponde al establecimiento del patógeno, provocando la muerte de células adyacentes al punto de penetración, dando lugar a la lesión primaria producto de la reacción hipersensible (HR) (Benito *et al.*, 2000), expresada como un mecanismo de defensa de la planta para evitar la propagación

de *B. cinerea* y finalmente el hongo puede permanecer en estado de latencia para posteriormente iniciar su diseminación en el órgano vegetal, provocando rápidamente la maceración del tejido infectado, en donde se desarrollarán nuevas conidias, dando origen al inóculo secundario y a un segundo ciclo de infección (Benito *et al.*, 2000; Carisse *et al.*, 2012; Elmer *et al.*, 2007; Nassr and Bakarar, 2013) (Figura 2).

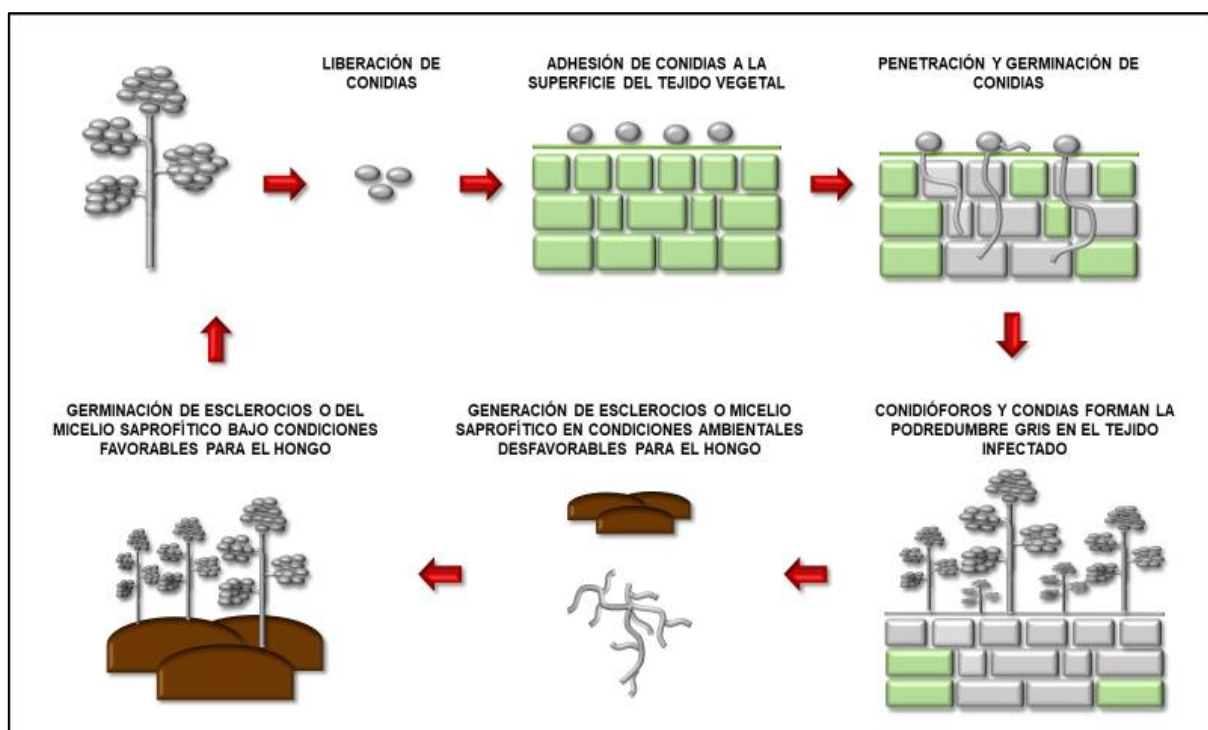


Figura 2. Ciclo infeccioso de *Botrytis cinerea*.

El patógeno, además se caracteriza por presentar una alta diversidad genética. La población de *Botrytis* en campo puede estar compuesta por dos genotipos crípticos que conviven simpátricamente en la vid, el genotipo *transposa* y el genotipo *vacuma*. Estos genotipos, inicialmente se diferenciaban entre sí por la presencia o ausencia de dos secuencias transponibles en el genoma del hongo denominados *Boty* y *Flipper* (Amselem *et al.*, 2011; Giraud *et al.*, 1997; Levis *et al.*, 1997; Notte *et al.*, 2021; Porquier *et al.*, 2021). El genotipo *transposa* está conformado por ambos transposones, mientras que el genotipo *vacuma* presenta la ausencia de ellos. Adicionalmente y en menor frecuencia, se han podido determinar otros dos genotipos en la población del patógeno, los cuales se caracterizan por la presencia de uno de los dos transposones en el genoma del hongo. Estos genotipos se denominan *boty* y *flipper*

dependiendo del transposón presente (Giraud *et al.*, 1997). El transposón *Boty* corresponde a una secuencia de 6 Kilobases (Kb) perteneciente a la familia de retrotransposones del tipo gipsy (Diolez *et al.*, 1995) y *Flipper* a un elemento de clase II de 1842 pares de bases (pb) descubierto como una inserción en el gen codificante para la enzima nitrato reductasa (Levis *et al.*, 1997).

Diferentes estudios han demostrado diferencias significativas en cuanto a frecuencia y distribución de los diferentes genotipos mencionados según región geográfica y cultivo desde donde fueron colectados. (Esterio *et al.*, 2011; Fekete *et al.*, 2012; Fournier *et al.*, 2005; Giraud *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 1999; Kretschmer and Hahn, 2008; Samuel *et al.*, 2012; Tanovic *et al.*, 2009; Tanovic *et al.*, 2015; Wessels *et al.*, 2016). En el caso de la vid, según varios estudios realizados los aislados *vacuma* se presentan en mayor frecuencia en tejidos asintomáticos en inicio de la floración, tendiendo a disminuir hacia la cosecha e incrementándose hacia el receso invernal, y son menos estables y heterogéneos. En cambio, los aislados *transposa* están asociados frecuentemente a infecciones en flores y bayas, presentan una mayor capacidad parasítica, y son más estables y uniformes (Giraud *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2005). Por otro lado, en estudios realizados en Chile se ha podido determinar que los aislados correspondientes al genotipo *transposa* presentan niveles de agresividad similar a los aislados *vacuma* y superior a los aislados *boty*. A una temperatura de incubación de 18°C *vacuma* es el más agresivo entre los cuatro genotipos y a 0°C los aislados *transposa* presentan mayor virulencia que los aislados *boty* y *vacuma* (Esterio, 2005).

Además, mediante análisis de polimorfismos del ADN utilizando marcadores específicos, se han podido detectar dos especies diferentes denominadas Grupo I y Grupo II o *Botrytis pseudocinerea* y *Botrytis cinerea sensu stricto*, respectivamente (Fournier *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2011). *Botrytis cinerea sensu stricto* es el grupo más predominante e incluye los genotipos *transposa* y *vacuma*, mientras que *Botrytis pseudocinerea* ha sido detectada en menor frecuencia e incluye sólo el genotipo *vacuma* (Vercesi *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2011).

Control de la pudrición gris en la vid

Las estrategias de control de *B. cinerea* en uva de mesa en Chile se basan principalmente en evitar o disminuir los factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad. Dentro de estos se encuentran los factores asociados a características endógenas del cultivar, como el grosor de la cutícula, compactación del racimo, concentración de antioxidantes y sólidos solubles en la baya y, por otro lado, los propios del medioambiente donde se desarrolla el cultivo, como lo son la temperatura, humedad, precipitaciones, entre otros (Deytieux-Belleau *et al.*, 2009; Fedele *et al.*, 2020; Mlikota *et al.*, 2003; Torres, 2017). En consecuencia, distintas prácticas deben ser realizadas para disminuir la cantidad de inóculo presente (presencia del patógeno) durante todo el periodo de desarrollo de la vid. Entre estas labores se encuentran, el deshoje de las plantas, para permitir la ventilación, luminosidad y la disminución de la humedad al interior del parronal (Cravero *et al.*, 2004; Evers *et al.*, 2010; Molitor *et al.*, 2011; Stapleton and Grant, 1992; Zoecklein *et al.*, 1992); el arreglo de racimo, para evitar racimos apretados y compactos, ya que al existir contacto entre bayas sanas y enfermas se facilita la propagación de la infección (Hanni *et al.*, 2013; Tardaguila *et al.*, 2012) y fertilizaciones balanceadas, para evitar un crecimiento excesivo de la planta y evitar sombreadamiento que favorece el desarrollo del patógeno.

No obstante, lo anteriormente indicado, la base fundamental para el control de Botrytis es mediante aplicaciones de fungicidas sintéticos realizadas en los periodos más críticos de infección que en la vid corresponden a floración y desde envero a cosecha (González-Dominguez *et al.*, 2019; Leroux *et al.*, 2002). Posterior a floración, *B. cinerea* puede permanecer latente en restos florales senescentes y permanecer latente en forma endógena en la baya, hasta que, con el inicio de la madurez, al disminuir los compuestos antifúngicos e incrementarse los sólidos solubles el metabolismo del hongo se activa, dando origen a infecciones en pre y postcosecha (Dean *et al.*, 2012; Jersch *et al.*, 1989; Nair and Allen, 1993; Pastor, 1980). Entre los fungicidas aplicados en esta etapa, se encuentran las mezclas compuestas por los ingredientes activos cyprodinil & fludioxonil, fluopyram & pyrimethanil y boscalid. Estas mezclas, por el óptimo control que presentan sobre *B. cinerea*, se han convertido, junto a fenhexamid y boscalid, en dos de los fungicidas base de los programas fitosanitarios aplicados en uva de mesa en Chile (Esterio *et al.*, 2017). Posteriormente, durante el periodo de crecimiento

del racimo, se realiza la aplicación de fungicidas sintéticos de distintos modos de acción, entre los que se encuentran los inhibidores de la enzima Succinato Deshidrogenasa (SDHB) como boscalid, e isofetamida; las anilino pirimidinas, como ciprodinil, mepanipirim y pirimetanil; los triazoles, como el tebuconazol y las estrobilurinas, como azoxistrobin, trifloxistrobin, entre otros. (Banno *et al.*, 2008; Esterio *et al.*, 2017; George *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2009; Leroux *et al.*, 1999; Leroux, 2004; Liu *et al.*, 2016; Rupp *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2010; Toffolatti *et al.*, 2020; Walker and Leroux, 2015; Zhao *et al.*, 2010) y de moléculas no residuales formuladas en base a cepas de *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma harzianum*, o en base de extractos vegetales de cítricos, árbol del té, entre otros. (Calvo, 2021; Calvo-Garrido *et al.*, 2019; Elmer *et al.*, 2007; Fedele *et al.*, 2020; Ligorio *et al.*, 2007; Marsico *et al.*, 2021). En precosecha, el manejo fitosanitario concluye con la aplicación de fenhexamid, molécula perteneciente a la familia de las hidroxianilidas, que es un botrycida específico y que presenta baja residualidad y amplio registro a nivel mundial (Esterio *et al.*, 2007; 2017). Finalmente, en post-cosecha la fruta es sometida a la acción de anhídrido sulfuroso mediante gasificaciones de pre-embalaje y el uso de generadores (Auger, 1981; 1987; Carter *et al.*, 2015; Latorre, 1986; Pastor, 1980; Youssef *et al.*, 2015).

Fludioxonil, molécula clave en el control de *B. cinerea*

Entre los fungicidas más utilizados para el control de *B. cinerea* se encuentran diferentes formulaciones en mezcla entre las que destacan cyprodinil & fludioxonil y fenhexamid & fludioxonil, por su alta efectividad en el control del patógeno, dada principalmente por la acción que ejerce fludioxonil sobre las poblaciones de Botrytis. Fludioxonil (4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrol-3-carbonitrilo) en su forma molecular $C_{12}H_6F_2N_2O_2$ (Figura 3) es un fungicida de contacto con una baja solubilidad en agua a 20°C (1,2), un coeficiente de reparto octanol-agua alto (4,12), baja volatilidad a 20°C (3.90×10^{-4}) y sin persistencia en el suelo ($DT_{50}=16$), además posee una baja toxicidad en mamíferos, aves y abejas (Lewis *et al.*, 2016). Pertenece a la familia de los fenilpirroles, los cuales son compuestos químicos derivados de la pirrolnitrina, un compuesto antifúngico natural producido por varias especies de bacterias, entre

ellas *Pseudomonas pyrocinia*, aislado por primera vez en el 1960 (Arima *et al.*, 1964; Diskin *et al.*, 2019; Errampalli, 2004; Nyfeler and Ackermann, 1992; Pillonel *et al.*, 2003). En una primera instancia, su utilización radicaba principalmente en el control de patógenos de suelo, por su descomposición frente a la luz (Howell and Stipanovic, 1979), sin embargo, en la década de los 80 Ciba-Geigy AG (ahora Syngenta AG) desarrolló dos análogos sintéticos resistentes a la luz entre ellos fludioxonil, para ser utilizado en el tratamiento de semillas y en aplicaciones foliares (Leadbitter *et al.*, 1994). Esta molécula fue introducida en el mercado mundial en 1993 con registro para ser utilizada tanto en pre como en post-cosecha.

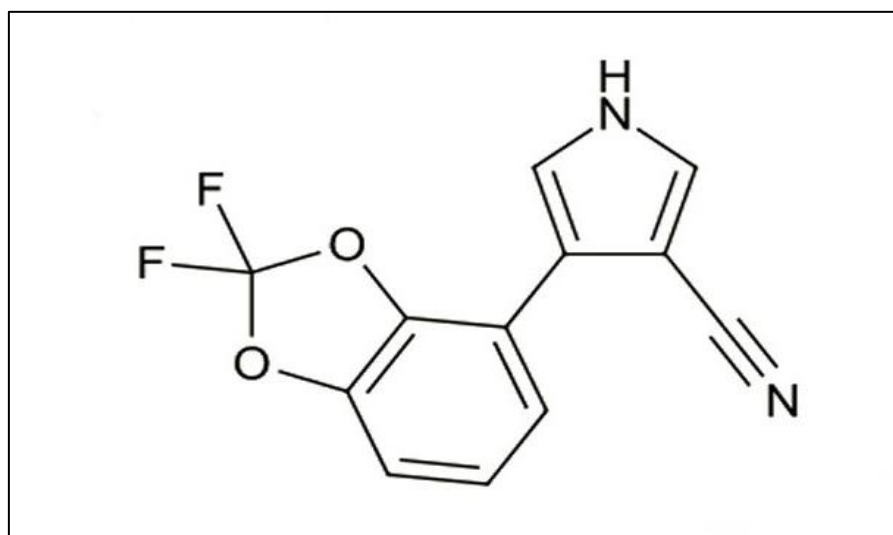


Figura 3. Estructura de fludioxonil

Este fungicida presenta un amplio espectro de acción principalmente sobre los géneros *Botrytis*, *Fusarium*, *Magnaporthe*, *Aspergillus*, *Monilinia* y *Penicillium* (Gehmann *et al.*, 1990). Puede afectar distintos estados de desarrollo de los hongos, provocando una morfología anormal de las hifas, las cuales presentan ramificaciones anormales, hinchazón y forma globosa producto de la acumulación de glicerol, generando con ello una lisis apical (Gaëlle *et al.*, 2003; Leroux *et al.*, 1992; Leroux, 1996; Leroux *et al.*, 2002; Rosslenbroich and Stuebler, 2000). Esto podría indicar que fludioxonil actuaría sobre la turgencia intra hifal y la biosíntesis de pared (Lew, 2010). Sin embargo, el modo de acción de esta molécula no está claro (Brandhorst and Klein, 2019; Jespers *et al.*, 1993; Kilani and Fillinger, 2016; Lawry *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014; Pillonel and Meyer, 1997). Estudios realizados en *Neurospora crassa* han demostrado que la exposición a fludioxonil

genera una hiperpolarización de la membrana plasmática a través de la salida de H^+ y la entrada de K^+ en la célula, permitiendo un aumento del potencial de membrana (Lew, 2010). Por otro lado, varios autores han podido observar la estimulación de la biosíntesis y la acumulación intracelular de glicerol y manitol cuando la célula es expuesta a fludioxonil (Jespers and De Waard, 1995; Pillonel and Meyer, 1997; Schrufer *et al.*, 2023). En la evaluación de aislados de *B. cinerea*, los cuales han desarrollado resistencia a fludioxonil tras ser sometidos de manera *in vitro* a concentraciones crecientes de fludioxonil, se ha podido determinar osmosensibilidad en todos ellos (Faretra and Pollastro, 1993; Leroux *et al.*, 1992; Motoyama *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2002). Adicionalmente, investigaciones posteriores, realizadas tanto en *Saccharomyces cereviceae* como en *B. cinerea*, han demostrado que la acumulación de osmolitos orgánicos está controlada por la activación de la ruta denominada HOG (por High Osmolarity Glicerol). HOG es una ruta altamente conservada del tipo MAP kinasas, que es activada por fosforilaciones seriadas en respuesta a una señal de estrés como, por ejemplo, shock osmótico, radiación ultravioleta, estrés oxidativo, por presencia de metales pesados y altas temperaturas (Bahn, 2008). Esta señal es captada por las proteínas histidinas kinasas, las cuales actúan como receptores celulares de membrana (Furukawa *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2002; O'Rourke *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 1997). Tras la cascada de señalización, se encuentra la proteína Hog1 MAPK, que corresponde a un componente final de esta ruta, que cuando es fosforilada y activada migra al núcleo y modula la actividad de distintos factores de transcripción implicados en la expresión de genes asociados a la síntesis de glicerol (Brewster *et al.*, 1993; Furukawa *et al.*, 2012; Hohman, 2002). Por lo tanto, según estos antecedentes, el posible modo de acción de fludioxonil es su unión con la proteína histidina kinasa, imitando un estrés osmótico lo que provocaría la activación de Hog1 MAPK (Gong *et al.*, 2018; Lawry *et al.*, 2017; Lew, 2010; Sang *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020). Así mismo el FRAC (Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas) clasifica este fungicida según su modo de acción como E (transducción de señales) aludiendo a la ruta Hog1 (FRAC, 2022).

Pérdida de sensibilidad a fludioxonil

Debido a la frecuente amenaza de Botrytis, los productores de uva de mesa se han visto obligados a realizar frecuentes aplicaciones de fungicidas. Muchas veces estas frecuentes aplicaciones involucran un mismo ingrediente activo, lo cual ha inducido al desarrollo de resistencia a las principales moléculas utilizadas para el control del hongo, ejemplo de esto es la resistencia desarrollada a benzimidazoles (Banno *et al.*, 2008; Lennox and Spotts, 2003; Yarden and Katan 1993; Yourman and Jeffers, 1999), a las dicarboxamidas (Banno *et al.*, 2008; Grabke *et al.*, 2014; Lennox and Spotts, 2003; Leroux, 2007; Leroux and Clerjeau, 1985; Li *et al.*, 2007; Yourman and Jeffers, 1999), a las anilino pirimidinas (Leroux and Gredt, 1995; Myresiotis *et al.*, 2007), a las hidroxianilidas (Billard *et al.*, 2012; Esterio *et al.*, 2007; Myresiotis *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2013) a las estrobilurinas (Jiang *et al.*, 2009) y a las carboxamidas (De Miccolis Angelini *et al.*, 2014). Adicionalmente, se han podido detectar aislados con la presencia de resistencias múltiples (Esterio *et al.*, 2017; Latorre and Torres, 2012; Panebianco *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2018). En cuanto a los fenilpirroles representados principalmente por fludioxonil, por la alta efectividad que presenta, es una de las moléculas fungicidas mayormente utilizadas, tanto en uva de mesa como en otros cultivos. Sin embargo, las continuas aplicaciones de este ingrediente activo han generado sobre el hongo un ambiente de presión de selección, lo cual sumado a la alta variabilidad genética, el ciclo de vida corto y la reproducción asexual que presenta Botrytis, le han permitido adaptarse a las condiciones agroecológicas presentes (Leroux *et al.*, 2002; Rosslenbroich and Stuebler, 2000), desarrollándose, en Chile, los primeros aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil (Esterio *et al.*, 2024). En el resto del mundo esta pérdida de sensibilidad ha sido detectada en aislados de *B. cinerea* en una muy baja frecuencia (Fernández-Ortuño *et al.*, 2013; 2014a; 2014b; Li *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2010).

Con el fin de poder conocer las causas de la pérdida de sensibilidad a este importante ingrediente activo en el control de *B. cinerea*, se han realizado múltiples estudios para dilucidar cuál es su mecanismo molecular. Mediante análisis genéticos, se han detectado en aislados de Botrytis resistentes a fludioxonil, como también de otros hongos fitopatógenos, distintas mutaciones presentes en el gen *bos1*, el cual codifica la proteína histidina kinasa perteneciente al grupo III (Alberoni *et al.*, 2010; Fillinger *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2018; Grabke *et al.*, 2014; Ochiai *et*

al., 2001; Qiu *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2016; Sang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021). Se ha podido observar que en aislados resistentes a fludioxonil obtenidos en laboratorio, las mutaciones están presentes en la porción C-terminal del dominio ATPasa y en la porción N-terminal del dominio HAMP de la proteína histidina kinasa, mientras que en aislados resistentes a fludioxonil obtenidos desde campo, las mutaciones sólo están presentes en la porción N-terminal del dominio HAMP de esta misma proteína (Ren *et al.*, 2016) (Figura 4). Es importante mencionar que la proteína histidina kinasa presenta un rol fundamental en la conidiación y patogénesis en *Botrytis*, es por ello que, mutaciones en esta proteína podrían explicar la baja frecuencia de aislados resistentes a fludioxonil en campo (Ajouz *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2007; Viaud *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha podido determinar que aislados de *Neurospora crassa* y de *B. cinerea* resistentes a fludioxonil presentan mutaciones en diferentes genes asociados a la vía de la osmorregulación, lo cual indicaría que no solamente el gen *bos1* estaría asociado a la pérdida de sensibilidad a fludioxonil (Fujimura *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002). Además, distintos autores han demostrado que alteraciones en los diferentes componentes de la vía de la osmorregulación en *B. cinerea*, afectan su capacidad de esporulación, su capacidad formadora de esclerocios y virulencia (Ren *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012). Estos antecedentes sostienen la idea que la resistencia a fludioxonil se asocia a modificaciones presentes en la vía de la osmorregulación, y que la baja frecuencia de aislados de *Botrytis* resistentes en campo se debe a que estas modificaciones afectan negativamente su capacidad de sobrevivencia y adaptación en el medioambiente (Avenot *et al.*, 2018; Kilani and Fillinger, 2016; Li and Xiao, 2008; Vignutelli *et al.*, 2002).

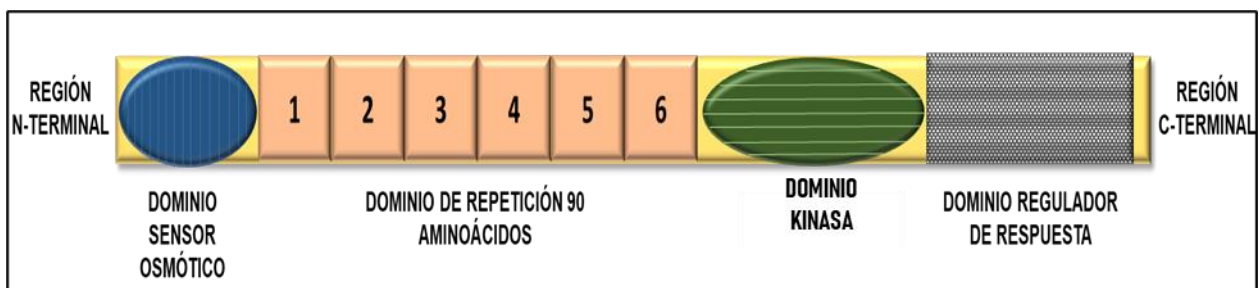


Figura 4. Representación esquemática de la proteína histidina kinasa.

Con respecto a aislados chilenos de *B. cinerea* con pérdida de sensibilidad a fludioxonil, al evaluarse su capacidad de sobrevivencia los resultados obtenidos mostraron ausencia de

diferencias en los parámetros analizados, entre los aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil y los aislados sensibles (Esterio *et al.*, 2024). Por lo tanto, esta información podría indicar que la pérdida de sensibilidad a fludioxonil en los aislados chilenos de *B. cinerea*, estaría asociada a un mecanismo diferente al planteado anteriormente.

En la literatura, algunos autores han relacionado la pérdida de sensibilidad a fludioxonil en aislados de *B. cinerea* y en otros hongos fitopatógenos con Resistencia Multidroga (MDR) (De Waard *et al.*, 2006; Fernández-Ortuño *et al.*, 2015; Kretschmer *et al.*, 2009; Leroux *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Rupp *et al.*, 2017). En términos generales, este tipo de mecanismo está asociado a la sobreexpresión de proteínas transportadoras ubicadas en la membrana plasmática, las cuales poseen una baja especificidad. De esta manera, se desencadena un incremento en la exportación de los productos químicos y, por lo tanto, una reducción en la sensibilidad por parte del hongo a una gran variedad de moléculas fungicidas que, generalmente, no están relacionadas químicamente (Kretschmer, 2012; Nikaido, 2009; Pérez-Tomás, 2006). Las proteínas implicadas en este proceso corresponden a dos familias diferentes. La primera familia corresponde al tipo ABC o ATPasas de membrana (ATP-Binding Cassete), las cuales necesitan ATP para excretar la molécula hacia el exterior de la célula (Figura 5). La sobreexpresión de esta familia de proteínas se asocia al fenotipo MDR1, presente en aislados de *B. cinerea* resistentes a fludioxonil, ciprodinil y a dicarboximidias. La segunda familia corresponde a proteínas del tipo MFS (Major Facilitators Super-family), las cuales corresponden a transportadores de membrana pasivos, por lo tanto, excretan las moléculas mediante diferencias en el gradiente de concentración entre el espacio extra e intra celular (Samaras *et al.*, 2020) (Figura 5). La sobreexpresión de esta familia se asocia al fenotipo MDR2, presente en aislados de *B. cinerea* resistentes a fenhexamid (Mernke *et al.*, 2011). Además, se ha reportado un fenotipo adicional señalado como MDR3, el cual corresponde a la combinación de los dos fenotipos anteriores (MDR1 y MDR2). En *B. cinerea* los transportadores ABC, corresponden a las proteínas de membrana BctrB, BctrD y BctrK y los transportadores MFS a las proteínas de membrana Bcmfs1 y BcmfsM. Este conjunto de transportadores han sido determinantes para definir los distintos tipos de fenotipos MDR (Kretschmer *et al.*, 2009; Leroux and Walker, 2013; Stergiopoulos *et al.*, 2002).

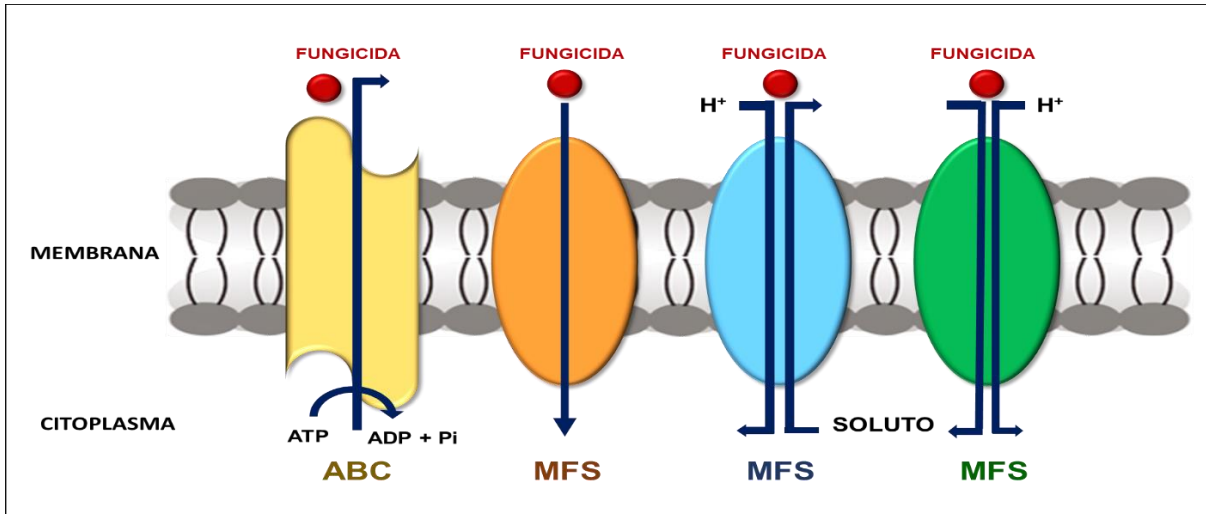


Figura 5. Representación esquemática de los transportadores de membrana involucrados en la resistencia multidroga.

La pérdida de sensibilidad a fludioxonil relacionada con resistencia MDR, en aislados de *B. cinerea*, se ha asociado a la sobreexpresión de la proteína ABC transportadora AtrB (BcatrB). Este tipo de proteínas son codificadas por el gen *artB*, donde su nivel de expresión es regulado por el factor de transcripción Mrr1, el cual es codificado por el gen *mrr1* (Kretschmer *et al.*, 2009; Leroux and Walker, 2013). En diferentes estudios se ha reportado que la sobreexpresión de las proteínas BcatrB se origina por la sobreexpresión del gen *atrB* y esto último debido a diferentes mutaciones presentes en la secuencia codificante del gen *mrr1* (Dowling *et al.*, 2021; Fernández-Ortuño *et al.*, 2015; Kretschmer *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha detectado, en algunos aislados del hongo, la presencia de una delección de 3 pares de bases en la secuencia codificante del gen *mrr1*, la cual genera un aumento en la sobreexpresión del gen *atrB*, dando origen al fenotipo MDR1h, que se caracteriza por una mayor resistencia a fludioxonil con respecto al fenotipo MDR1 (Fernández-Ortuño *et al.*, 2015; Hahn, 2014; Leroch *et al.*, 2013). Sin embargo y pese a los antecedentes expuestos, las mutaciones detectadas en el gen *mrr1*, que han sido asociadas al fenotipo MDR1, generan genotipos diferentes entre las distintas investigaciones mencionadas anteriormente, lo cual deja de manifiesto que la causa de la sobreexpresión del gen *atrB* y con ello la causa de la Resistencia Multidroga aún no se puede determinar con certeza. Es por este motivo, que es necesario continuar la investigación sobre las causas que originan la pérdida de sensibilidad a fludioxonil, ya que la sobreexpresión del

gen *atrB* podría estar asociada a cambios en regiones génicas, tanto del gen *mrr1*, como en el mismo gen *atrB*, que aún no han sido estudiadas.

HIPÓTESIS

La pérdida de sensibilidad a fludioxonil en aislados chilenos de *B. cinerea* se debe a una sobreexpresión del gen *atrB* causada por mutaciones en la secuencia codificante del gen *mrr1* y/o en la secuencia promotora del gen *atrB*, y/o por modificaciones en la proteína transportadora de membrana BcatrB, causadas por mutaciones en la secuencia codificante del gen *atrB*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la pérdida de sensibilidad a fludioxonil en aislados chilenos de *B. cinerea* se debe a la sobreexpresión del gen *atrB* causada por mutaciones en la secuencia codificante del gen *mrr1*, y/o a mutaciones en la secuencia promotora en el gen *atrB*, y/o por modificaciones en la proteína transportadora de membrana BcatrB causadas por mutaciones en la secuencia codificante del gen *atrB*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar diferencias en la producción de esclerocios y en la esporulación entre los aislados chilenos de *B. cinerea* sensibles y con pérdida de sensibilidad a fludioxonil.

Determinar el nivel de expresión del gen *atrB* en aislados chilenos de *B. cinerea* sensibles y con pérdida de sensibilidad a fludioxonil.

Detectar la presencia de mutaciones en la región codificante del gen *mrr1* y en la región promotora y codificante del gen *atrB* en aislados chilenos de *B. cinerea* con pérdida de sensibilidad a fludioxonil y determinar cambios estructurales y en la función de la proteína BcatrB.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1: A Conservative Mutant Version of the Mrr1 Transcription Factor Correlates with Reduced Sensitivity to Fludioxonil in *Botrytis cinerea*.

Este capítulo aborda los objetivos específicos 1, 2 y 3.



Article

A Conservative Mutant Version of the Mrr1 Transcription Factor Correlates with Reduced Sensitivity to Fludioxonil in *Botrytis cinerea*

Charleen Copier^{1,2}, Claudio Osorio-Navarro^{1,3}, Jonathan E. Maldonado², Jaime Auger¹, Herman Silva^{2,*} and Marcela Esterio^{1,*}

¹ Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular, Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, La Pintana, Santiago 8820808, Chile; charleencopier@uchile.cl (C.C.); anduin@ug.uchile.cl (C.O.-N.); jauger@uchile.cl (J.A.); mesterio@uchile.cl (M.E.)

² Laboratorio de Genómica Funcional y Bioinformática, Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, La Pintana, Santiago 8820808, Chile; charleencopier@uchile.cl (C.C.); jonathan.maldonado@usach.cl (J.E.M.); hesilva@uchile.cl (H.S.)

³ Plant Molecular Biology Centre, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Ñuñoa, Santiago 7800003, Chile; anduin@ug.uchile.cl (C.O.-N.)

* Correspondence: hesilva@uchile.cl (H.S.); mesterio@uchile.cl (M.E.)

Abstract: Fludioxonil is a highly effective phenylpyrrole fungicide for controlling *Botrytis cinerea*. Although the field efficacy of fludioxonil remains high, *Botrytis cinerea* isolates with reduced sensitivity have been reported globally. The molecular target of fludioxonil still remains unknown; however, a mechanism of reduced sensitivity to fludioxonil underlies the overexpression of the ATP binding cassette (ABC) transporter AtrB in a dependent pathway of the Mrr1 transcription factor. Fludioxonil is a key player in controlling *B. cinerea* infection in table grapes in Chile. However, some isolates with a reduced sensitivity to fludioxonil were detected. This study observed endogenous *atrB* overexpression in Chilean isolates with reduced sensitivity to fludioxonil ($n = 22$) compared to the sensitive isolates ($n = 10$). All isolates increased the expression of *atrB* in a growth medium supplemented with fludioxonil (0.05 $\mu\text{g/mL}$). However, sensitive isolates showed lower *atrB* expression than those with reduced fludioxonil sensitivity. Remarkably, a mutant version of the transcription factor Mrr1 carrying 21 amino acid modifications was identified in all isolates with reduced sensitivity to fludioxonil. These changes alter the protein's transcription factor domain and the C-terminal portion of the protein but not the Zn (2)-C6 fungal-type DNA-binding domain. These results suggest a direct relationship between the conserved and divergent mutant version of *mrr1* and sensitivity to fludioxonil. This study provides a new target for developing molecular diagnostic strategies to monitor *B. cinerea*'s sensitivity to fludioxonil in the field.

Keywords: grey mold; Mrr1; *atrB*; *Vitis vinifera*; table grapes; fludioxonil sensitivity

1. Introduction

Botrytis cinerea Pers.Fr., the causal agent of grey mold in table grapes, is one of the most widely distributed necrotrophic pathogens worldwide with an extensive host range, affecting more than 1400 plant species [1]. Economic losses associated with *B. cinerea* include several fruits, vegetables, and ornamental plants. The damage caused by this type of infection seriously affects the commercialization of table grapes in Chile and several other countries, resulting in economic losses of up to 30% or more in production [2]. In table grapes, the pathogen can infect different plant organs at various stages of development but is most destructive in mature or senescent tissues. Floral organs are highly susceptible to *B. cinerea* infection and often serve as the pathogen's entry point during fruit development. *B. cinerea* can remain quiescent until the environment is appropriate and the host physiology changes, after which it rapidly rots the plant tissues [3–8]. In Chile and worldwide, table grape grey mold control relies on the preventive application of synthetic fungicides in the most infection-susceptible periods: flowering, and from veraison to harvest [9,10]. Chilean table grapes receive over eight fungicide applications per season to control disease. However, in some cases, the management of *B. cinerea* has not been entirely satisfactory. Intensive application of fungicides with the same molecular target causes reduced sensitivity in fungal populations, leading to poor *B. cinerea* control [11-15].

Fludioxonil, a phenylpyrrole fungicide, is a non-systemic analog of the antibiotic pyrrolnitrin produced by various *Pseudomonas* species [16]. Fludioxonil is highly efficient in controlling plant pathogens, including *B. cinerea* [17]. In the beginning, its use was mainly in the control of soil pathogens due to their sensitivity to light [18]; however, in the 1980s, Ciba-Geigy AG (now Syngenta AG) developed two light-resistant synthetic analogs, one of them fludioxonil, to be used in seed treatment and foliar applications [19]. This molecule was introduced into the world market in 1993 to be used pre- and post-harvest. Phenylpyrroles are believed to target the High Osmolarity Glycerol (HOG) stress response signal transduction pathway, although their mode of action is not fully understood [17,20]. The HOG pathway is required to manage osmotic and other abiotic stress and has been extensively studied in the fludioxonil-insensitive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The group III hybrid histidine kinase (HHK) is considered the osmosensor in the HOG pathway and the putative molecular target of phenylpyrroles. Indeed, HHK Os-1 expression from *Neurospora crassa* can reverse sensitivity to fludioxonil in fludioxonil-insensitive yeast *S. cerevisiae* [21]. Consistently, mutations in the *os-1* gene of *N. crassa* trigger the reduced sensitivity to fludioxonil [22,23]. *B. cinerea* laboratory-generated and field strains mutant in the *os-1* homolog have reduced sensitivity to fludioxonil [24–27]. Alternatively, fludioxonil indirectly affects HHK-dependent signaling by acting on triosephosphate isomerase (TPI) in yeast [28]. However, whether TPI is the primary target in other fungal species remains to be shown. In most cases, the reduced sensitivity to fludioxonil

due to mutations in the *os-1* homolog seems to induce a substantial fitness penalty associated with decreased sporulation, sclerotia production, and pathogenicity. This phenomenon could cause low fludioxonil field resistance [29,30]. However, not all fludioxonil-resistant *B. cinerea* field isolates exhibit changes in Os-1 or other components of the HOG pathway. In addition, moderate and low resistance to fludioxonil can be achieved through a drug-efflux-based multidrug resistance (MDR) mechanism. MDR underlies the overexpression of plasma membrane transporters of low substrate specificity, reducing sensitivity to unrelated fungicide molecules [31–33]. In *B. cinerea*, MDR is related to the ATP binding cassette (ABC) transporter gene *atrB* overexpression [34]. The transcriptional regulation of *atrB* is convergent among various fungi and depends on the transcription factor Mrr1 [35]. Mutations in the *mrr1* gene result in two main phenotypes: MDR1, conferring low resistance and characterized by different point mutations in the *mrr1* gene [34,36–38], and MDR1h, conferring moderate-to-high resistance to fludioxonil and characterized by a 3-bp deletion mutation in *mrr1*, leading to an amino acid deletion of L497 [38–40].

We recently reported the first Chilean *B. cinerea* field isolates with reduced sensitivity to fludioxonil from table grapes [41]. The low frequency of these isolates is consistent with worldwide reports and correlates with the high efficacy of fludioxonil in table grape phytosanitary programs [17]. However, compared to isolates from the United States and China, Chilean isolates with low fludioxonil sensitivity exhibit little to no fitness cost [37,41–43].

The goal of this study was to characterize the molecular basis of the reduced sensitivity to fludioxonil in the *B. cinerea* Chilean isolates, comparing biological fitness parameters among *B. cinerea* sensitive and *B. cinerea* with reduced sensitivity to fludioxonil, the expression levels of the *atrB* gene, and the genomic analysis of the *mrr1* and *atrB* genes.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal Isolates, Culture Media, and Fungicide

Isolates of *B. cinerea* sensitive and with reduced sensitivity to fludioxonil were previously described [41]. All isolates were recovered from table grape cv. ‘Thompson Seedless’ naturally infected flowers, which were sampled during the 2016/2017 and 2017/2018 growing seasons from ten orchards in the Central Valley of Chile (Valparaíso, Metropolitan, and del Libertador Bernardo O’Higgins Regions) (Table 1).

Table 1. List of *Botrytis cinerea* isolates used in this study.

N° of Isolates	Nomenclature **	Region	Season	EC ₅₀ Fludioxonil (µg/mL)	Sensitivity to Fludioxonil
1 *	-	-	-	0.01	S
2	FBB7 9A3	Valparaíso	2017/2018	0.011	S
3	FCF6 41B1	Valparaíso	2016/2017	0.013	S
4	FBF7 10A2	Valparaíso	2017/2018	0.014	S
5	FBF7 10A3	Valparaíso	2017/2018	0.016	S
6	FCF7 44D1	Valparaíso	2017/2018	0.022	S
7	FCF7 44D2	Valparaíso	2017/2018	0.026	S
8	FCF7 45B1	De O'Higgins	2017/2018	0.045	S
9	FCF7 45B2	Valparaíso	2017/2018	0.048	S
10	FCF7 45B3	Metropolitan	2017/2018	0.055	S
11	FBF6 18B4	Valparaíso	2016/2017	1.08	R
12	FBF6 11B4	Valparaíso	2016/2017	1.09	R
13	FBF6 18B3	Valparaíso	2016/2017	1.10	R
14	FBF7 7B10	Valparaíso	2017/2018	1.11	R
15	FBF6 12A3	Valparaíso	2016/2017	1.14	R
16	FBF6 18B1	De O'Higgins	2016/2017	1.17	R
17	FBF6 12C1	Valparaíso	2016/2017	1.19	R
18	FDF6 33 C2	Valparaíso	2016/2017	1.22	R
19	FBF7 7B6	Valparaíso	2017/2018	1.24	R
20	FBF7 8D1	Valparaíso	2017/2018	1.25	R
21	FBF6 14C2	Valparaíso	2016/2017	1.30	R
22	FBF6 11B3	Valparaíso	2016/2017	1.37	R
23	FBF7 7B2	Valparaíso	2017/2018	1.44	R
24	FBF7 8B2	Valparaíso	2017/2018	1.46	R
25	FBF6 15B3	Valparaíso	2016/2017	1.47	R
26	FBF6 11C2	Valparaíso	2016/2017	1.50	R
27	FBF6 15B1	Valparaíso	2016/2017	1.51	R
28	FBF7 7B1	Valparaíso	2017/2018	1.68	R
29	FBF7 8B3	Valparaíso	2017/2018	2.04	R
30	FBF7 6B3	Valparaíso	2017/2018	2.21	R
31	FBF7 6A1	Valparaíso	2017/2018	2.22	R
32	FBF7 6C1	Valparaíso	2017/2018	2.37	R

* B05.10 strain used as wild-type; **: nomenclature used in previous study [41]; S: sensitive; R: resistant.

The mycelia of 10 sensitive isolates, including the wild-type strain B05.10 and 22 isolates with reduced sensitivity to fludioxonil, were grown in yeast malt agar culture medium (malt extract 20 g/L, yeast extract 5 g/L, agar 12.5 g/L) and incubated at 20 °C with 80% of humidity for six to seven days in darkness until a mycelial layer with abundant sporulation was obtained.

For gene expression analysis, the culture medium was supplemented with or without fludioxonil (Scholar® 23% SC, Syngenta S.A., Monthey, Switzerland) at a 0.05 µg/mL concentration.

2.2. Assessment of Survival Structures Development

The following fitness parameters were analyzed for the ten sensitive isolates and 12 isolates with reduced sensitivity to fludioxonil (11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 25, 26, and 27). Three replicates were performed per isolate.

Sclerotia and spore production in vitro: Petri dishes containing yeast malt agar culture medium (malt extract 20 g/L, yeast extract 5 g/L, agar 12.5 g/L) were inoculated with 20 µL of conidia suspension (10^5 spores/mL). For sclerotia production, the number of sclerotia was evaluated after 40 days of incubation in continuous darkness at 5 °C and 20 °C and with 80% humidity. For spore production, the dishes were incubated for ten days in continuous darkness at 20 °C and 80% humidity. Sporulating colonies were rinsed with 20 mL of distilled sterile water, and the conidia suspension was filtered through 34 µm nylon mesh to remove fungal mycelium. The spore concentration in the suspension was estimated using a hemacytometer.

2.3. RNA Extraction, cDNA Synthesis, and Relative Quantification of *atrB* Gene Expression

From the mycelia biomass (100 mg) obtained from the 32 *B. cinerea* isolates treated with or without fludioxonil, the RNA was extracted using the RNeasy plant mini kit protocol (QIAGEN, Germantown, MD, USA). The RNA obtained from each isolate was dissolved in 35 µL of nanopure water and 1 µL aliquot of this dilution was used for determining its concentration using an Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winoosky, VT, USA). The RNA sample was adjusted to 1000 ng and treated with DNase for 20 min at 42 °C. The cDNA was synthesized using the Quantitect® Reverse transcription kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. The program for the cDNA synthesis was 30 min at 42 °C followed by 3 min at 95 °C. For quantitative PCR analysis, two primer pairs were designed to amplify the target gene *atrB* and the reference gene *actin* (Table 2). The PCR was conducted using Brilliant III Ultra-Fast SYBR® GREEN QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The amplification programs consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 50 cycles at 95 °C for 15 s, 55 °C for 15 s, and 72 °C for 15 s. A melting curve analysis was also performed to verify the specificity of amplified products. Then, the mRNA level was determined using the $\Delta\Delta C_t$ method [44]. Values were normalized to the expression of the B05.10 strain. Three experiments with three biological replicates were conducted independently.

Table 2. List of primers for amplification of partial *atrB* cDNA and partial *actin* cDNA using qPCR.

Primer Name	Sequence 5'->3'	T° Annealing (°C)	Fragment Size (bp)
BcatrB_qPCR_F	ACGTTTGACAATTGGTGTGG	55	150
BcatrB_qPCR_R	GAGTTGAGCGGAAGGTTGAT	55	150
Bact_qPCR_F	CTGGTCGTGATTTGACTGATTA	55	100
Bact_qPCR_R	GATTGACTGGCGGTTTGG	55	100

2.4. DNA Extraction, Amplification, and Sequencing of *mrr1* Coding Region and *atrB* Intergenic and Coding Regions

From the biomass obtained from the 32 isolates of *B. cinerea*, 70–100 mg were recovered, and DNA was extracted using the DNeasy plant mini kit protocol (QIAGEN, Germantown, MD, USA). The DNA obtained from each isolate was dissolved in 50 µL of nanopure water (Promega, Madison, WI, USA) and a 1µL aliquot of this dilution was used for PCR amplification. From the sequence of the B05.10 strain (https://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/Info/Index database, accessed on 15 June 2022), a total of 15 pairs of primers were designed using the primer blast tool from NCBI (National Center for Biotechnology Information), six pairs for the amplification of the coding sequence of the *mrr1* gene and nine pairs for the amplification of the intergenic and coding sequence of *atrB* gene (Table 3). PCRs were performed in a total volume of 25 µL using the Go Taq® Green Master Mix solution (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The amplification program for the *atrB* and *mrr1* genes consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, annealing temperature according to the primer for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min and final step of 72 °C for 7 min. The amplified fragments were verified in a 2% agarose gel, stained with Red Gel® (Biotium, Fremont, WA, USA), and a 100 bp ladder DNA length marker (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was used. All PCR products were sequenced by Psomagen USA Corp. (Rockville, MD, USA), and the DNA sequence analysis was performed using the software Vector NTI suite 7 [45].

Table 3. List of PCR primers for amplifying intergenic and coding region of *atrB* gene (BcartB) and coding region of *mrr1* gene (Bcmrr1).

Primer Name	Sequence 5'→3'	T° Annealing (°C)	Fragment Size (bp)
BcartB_1F	ATGAGCTACACAGGGATCGAA	60	913
BcartB_1R	CGCAGTTTGTCAAAGCCGTC	60	913
BcartB_2F	AGTATGGATTTCGGGCGAGTG	56	1125
BcartB_2R	TGTGGTCGAACAATCGAGGA	56	1125
BcartB_3F	CATCAAGGGGTTTCCGGTT	60	978
BcartB_3R	GAAACACGCTTACGCTCACC	60	978
BcartB_4F	AGCACACCAATACCGAGGAC	51	843
BcartB_4R	CGCAAGCTTTGACTTGGGTC	51	843
BcartB_5F	CTACCACCGCCATCGCTAAA	60	782
BcartB_5R	CACAAGCTTGGAACGCCAAA	60	782
BcartB_6F	CTTGCCTATGGCTTTTCCGGC	54	779
BcartB_6R	GTCGGGGACGGTTCTTGATT	54	779
BcartB_7F	AAGCCGGGTATGTTAGGTGC	61	964
BcartB_7R	AGACCGCCGACTGAATGTTT	61	964
BcartB_8F	CTGGCTCAACTCTCCCGAAT	53	794
BcartB_8R	TACTCGCCACAAGTGCCATT	53	794
BcartB_9F	CCTCGTCTTACCAGTTGGG	63	842
BcartB_9R	TCTTGGGGATTTGCCGATGT	63	842
Bcmrr1_1F	GGATGCGGATGGTTACGGAT	60	1057
Bcmrr1_1R	TGATGGCGGATTTGACCGAA	60	1057
Bcmrr1_2F	TAATCAGGCATCTGGCACGG	62	921
Bcmrr1_2R	CGATCATGAGTGCGCATAGC	62	921
Bcmrr1_3F	GTCTCGAGGCTAGCGTGTTT	63	938
Bcmrr1_3R	AACCGCAATTACATGCCACG	63	938
Bcmrr1_4F	CTCGAGGACAATCCTTGCGT	62	867
Bcmrr1_4R	GTGCTTGCTTGAAAGTGCGA	62	867
Bcmrr1_5F	AGTTTGTAGCGATGGACCCC	60	1203
Bcmrr1_5R	CGTCAGTGTCGCCCAGAATA	60	1203
Bcmrr1_6F	ACGGAATCGATGCCTGTGAA	60	959
Bcmrr1_6R	ATATCTGCGGCAGCCTTGAG	60	959

The identification of the 5'UTR and 3'UTR sequences and the presence of introns in both genes was carried out using the sequence of the B05.10 strain from the https://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/Info/Index database (accessed on 15 June 2022).

The functional analysis for identifying the functional domains of the Mrr1 transcription factor and the ABC transporter AtrB was performed using the InterPro tool [46].

2.5. Structural Alignment and Molecular Docking Simulations

Structural alignment was analyzed between the wild-type and mutated ABC transporter AtrB amino acid sequence and molecular docking of ATP with the wild-type and mutated ABC transporter AtrB amino acid sequence. The amino acid sequences of ABC transporter AtrB from the *B. cinerea* sequenced strain B05.10 were acquired from NCBI, and the amino acid sequences of the nine isolates (Genotype 3) with mutations in the ABC transporter AtrB were obtained using the software Vector NTI suite 7 [45].

The crystal structures for each ABC transporter AtrB amino acid sequence were obtained using the Phyre2 (Protein homology y recognition engine V 2.0) [47]. For the structural alignment between the crystal structures of wild-type and mutated isolates, the Multiseq-VMD (Visual Molecular Dynamics) was used, and the RMSD (Root Mean Square Deviation) value was calculated to determine differences between the structures [48]. The molecular docking was performed in a flexible manner of the molecule portions, which allowed the rotation around the degrees of freedom of the molecules and the calculation of free energy values between them. The setup of the structure was performed using Autodock Tools [49]; a docking area was defined by generating a box that encompassed the entire area of the protein, and Adenosine-5-triphosphate (ATP) was used as a ligand (PubChem CID 5957).

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis for sclerotia and spore production tests was conducted in InfoStat (version 2008) [50]. The evaluations were assessed using a one-way analysis of variance, and means were compared with Tukey's protected least significant difference ($p = 0.05$).

3. Results

3.1. *Botrytis* Isolates with Reduced Sensitivity to Fludioxonil Presented Unaltered Survival Structure Production

Many factors contribute to *Botrytis cinerea*'s success as a pathogen, including the prolific development of dispersal and survival structures. In contrast, isolates with reduced sensitivity to fludioxonil are infrequent within the *Botrytis* population [26]. We hypothesize defects in developing survival structures in *Botrytis* isolates with reduced sensitivity to fludioxonil, so we studied their conidia and sclerotia production. Sclerotia development was similar among all fludioxonil-sensitive isolates at a temperature of 5 °C; however, isolates with reduced sensitivity to fludioxonil showed either an equivalent (66.7%) or greater (33.3%) number of sclerotia than the sensitive population (Figure 1A). At 20 °C, two fludioxonil-sensitive isolates mostly induced sclerotia development. Isolates with reduced sensitivity to fludioxonil showed equivalent sclerotia development as 66.7% of the sensitive population (Figure 1B). However, three isolates exhibited a lower degree of sclerotia growth. Remarkably, an isolate with reduced

sensitivity to fludioxonil (number 18) presented more sclerotia at 5 °C and 20 °C (Figure 1A,B). On the other hand, there were two categories within each population based on their conidia production. The first category included isolates that produce over 5.5×10^7 conidia/mL, with 70% being sensitive to fludioxonil and 66.7% belonging to the reduced sensitivity to fludioxonil population. The remaining isolates were in the second category, characterized by a lower conidia production (Figure 1C). Our observations indicate that reduced sensitivity to fludioxonil in *Botrytis cinerea* isolates does not severely impact the development of survival structures.

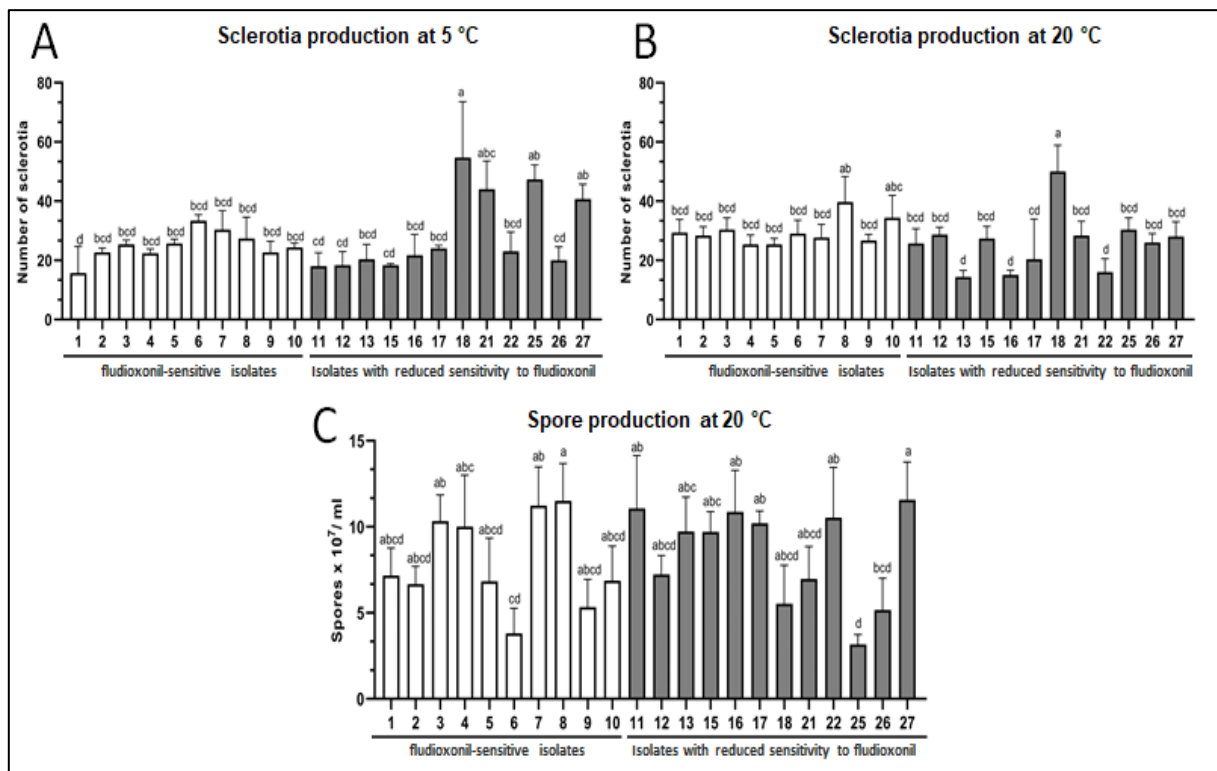


Figure 1. Survival structures in *Botrytis cinerea* isolates sensitive or with reduced sensitivity to fludioxonil. (A): Sclerotia production at 5 °C. (B): Sclerotia production at 20 °C. (C): Spore production at 20 °C. White bars: sensitive isolates. Gray bars: isolates with reduced sensitivity to fludioxonil. The bars with different letters a, b, c and d are significantly different ($p < 0.05$).

3.2. *B. cinerea* Isolates with Reduced Sensitivity to Fludioxonil Exhibit Higher Endogenous Levels of *atrB* Expression

Quantitative real-time PCR was performed to investigate the *atrB* expression level in Chilean *B. cinerea* isolates that are sensitive or have a reduced sensitivity to fludioxonil. The isolates were grown in a fludioxonil-free medium or amended with 0.05 $\mu\text{g/mL}$ of the fungicide. The experimental fungicide concentration chosen reduced mycelial growth in fludioxonil-sensitive isolates and had minimal effects on isolates with reduced sensitivity to

fludioxonil (Supplemental Figure S1). The contrasting physiological response between the populations of both *Botrytis* isolates provides a valuable window to investigate the mechanisms of reduced-fludioxonil sensitivity.

Two *atrB* expression patterns were observed in susceptible isolates in the absence of fludioxonil. Fifty percent of fludioxonil-sensitive isolates presented *atrB* levels close to the housekeeping gene expression, while the remaining fifty percent presented levels close to zero (Figure 2A). Remarkably, all isolates with reduced sensitivity to fludioxonil exhibited endogenous *atrB* overexpression (Figure 2A). Among these isolates, 23% (isolates 11, 18, 23, 30, and 32) presented the lowest *atrB* overexpression, 1.5- and 2-fold over the *atrB* expression in fludioxonil-sensitive isolates. Two isolates (9%; isolates 19 and 20) have the highest *atrB* levels, corresponding to 4-fold over the fludioxonil-sensitive isolates *atrB* expression level. The remaining 68% of the population presented intermediate overexpression levels in the range of 2.5- and 3-fold over the fludioxonil-sensitive isolates *atrB* expression level (Figure 2A). Supplementation of the growth medium with fludioxonil (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increased *atrB* expression in both sensitive isolates and isolates with reduced sensitivity to fludioxonil compared to their endogenous *atrB* levels (Figure 2A). Fludioxonil increased *atrB* expression more significantly than the reference expression value in all fludioxonil-sensitive isolates, with an average of 20-fold induction in 50% of these isolates (Figure 2B). While fludioxonil-mediated induction of *atrB* expression in *B. cinerea* isolates with reduced sensitivity to fludioxonil was 1- to 2-fold the endogenous *atrB* expression level recorded for these isolates (Figure 2B). The results indicate that the expression levels of *atrB* are higher in the *Botrytis cinerea* population with reduced sensitivity to fludioxonil compared to the sensitive population. Also, fludioxonil-mediated induction of *atrB* expression depends on the sensitivity background.

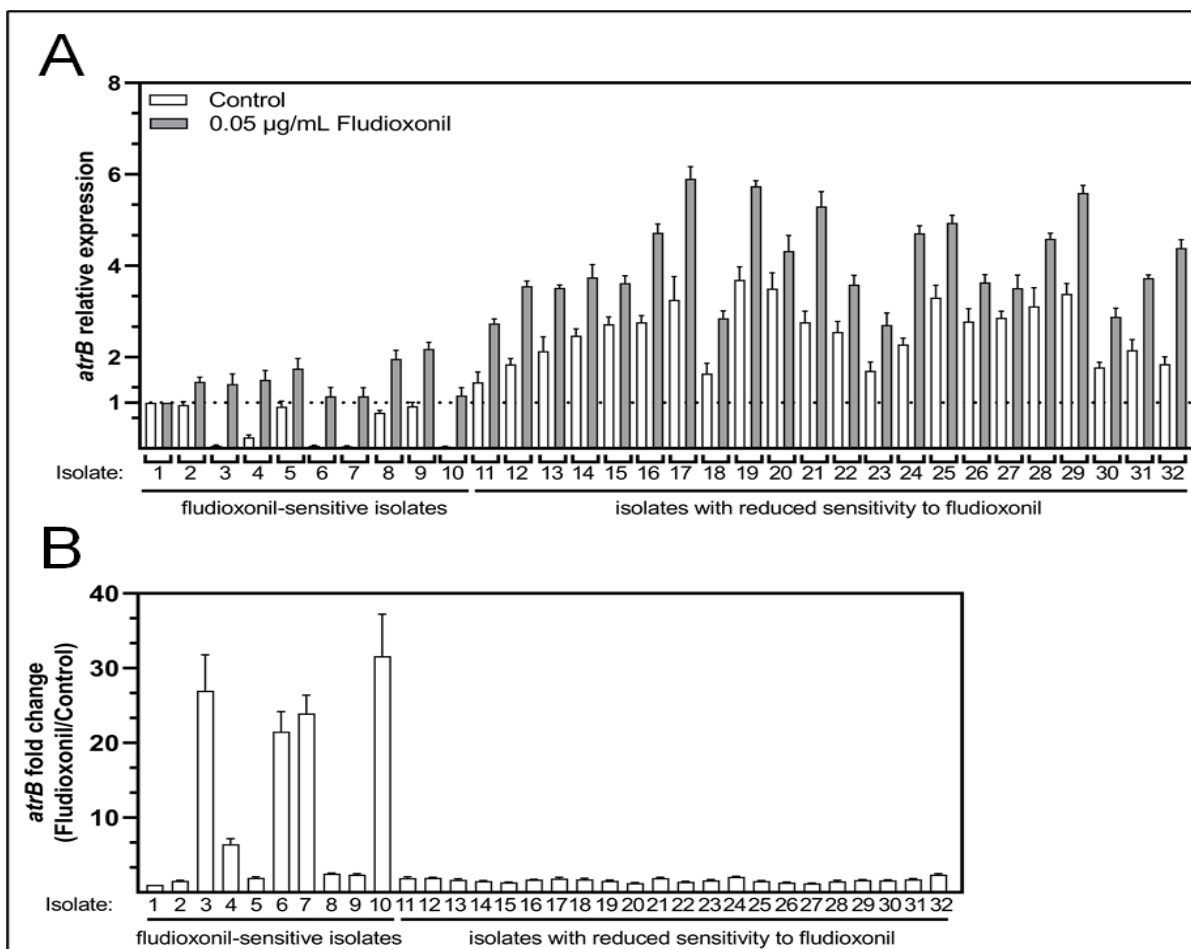


Figure 2. Relative expression of the *atrB* gene of *B. cinerea* isolates used in this study. **(A):** The *atrB* relative expression was normalized with the *actin* gene expression and then calibrated to the values of mRNA amount based on the isolate with the lowest amount of *atrB* mRNA (B05.10). White bars: sensitive and with reduced sensitivity to fludioxonil isolates without fludioxonil treatment. Gray bars: sensitive and reduced sensitivity to fludioxonil isolates with 0.05 µg/mL of fludioxonil treatment. **(B):** *atrB* fold change of sensitivity and with reduced sensitivity to fludioxonil isolates.

3.3. *B. cinerea* Isolates with Reduced Sensitivity to Fludioxonil Carry a Unique *mrr1* Version Divergent from Fludioxonil-Sensitive Isolates

The complete coding sequence of the *mrr1* gene of the 32 *B. cinerea* isolates was amplified using the primers described in Table 3. Six fragments were assembled to obtain a coding sequence of 2444 bp. Two 73 bp and 75 bp introns were identified between positions 185–258 and 1114–1190, respectively. In addition, 5'UTR and 3'UTR sequences of 366 bp and 1179 bp, respectively, were also recognized. The genomic *mrr1* region of the 32 Chilean isolates under study was compared to the B05.10 strain's reference sequence. Only two genotypes were observed. The *mrr1* sequence found in the fludioxonil-sensitive isolates was identical to that of

B05.10 (Genotype 1). In contrast, the 22 isolates with reduced sensitivity to fludioxonil presented a mutated, conserved, and divergent version of *mrr1* regarding fludioxonil-sensitive isolates (Genotype 2). Genotype 2 presented thirty-two changes in the coding region, of which two corresponded to insertions, nine to synonymous mutations, and twenty-one to non-synonymous mutations (Figure 3B). The Mrr1 transcription factor sequence has been analyzed bioinformatically, exhibiting two distinct protein domains (Figure 3A). The first domain is the Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain, which spans from residue 38 to residue 78 and presents amino acid identity between sensitive and with reduced sensitivity to fludioxonil isolates. The second domain is the transcription factor domain, which spans from residue 242 to residue 434 and has four out of the twenty-one observed non-synonymous mutations (P258S, V287S, A289S, N312Q) concentrated within it (Figure 3B). Of the remaining seventeen non-synonymous amino acid changes, three were concentrated within the N-terminus and fourteen in the C-terminus of the protein (Figure 3B).

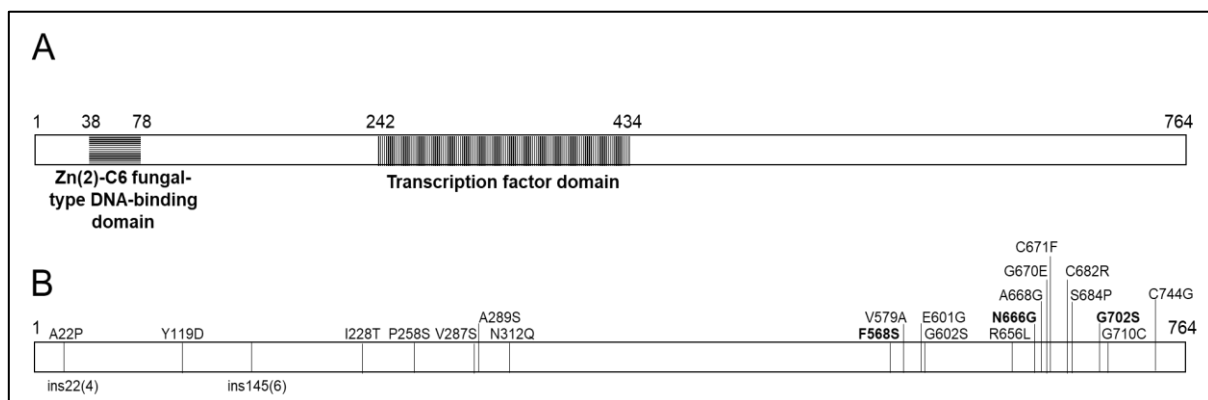


Figure 3. A: Functional domains present in the Mrr1 transcription factor: the Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain and the transcription factor domain. B: Detected amino acid changes in *B. cinerea* isolates with reduced sensitivity to fludioxonil. The mutations previously reported are indicated in bold letters.

3.4. High Variability in *atrB* Does Not Correlate with Changes in the Function of the ABC Transporter *AtrB*

The genomic sequence of the *atrB* gene from 32 isolates of *B. cinerea* was amplified employing the primers described in Table 3. After analyzing the assembled fragment, we found that all isolates have a consistent gene configuration, which includes an 1802 bp intergenic region sequence (putative promoter region) and a 4329 bp coding region sequence. An intron of 56 bp between positions 1115 and 1171 was also observed. The 5' UTR and 3'UTR sequences of 151 bp and 338 bp, respectively, were also recognized. To explore mutations in the *atrB* genomic sequence, we compared the complete *atrB* from the 32 *B. cinerea* field isolates under study with the reference *atrB* from the *B. cinerea* B05.10 strain. Four different *atrB* genotypes

were found, and they were not linked to sensitivity to fludioxonil. Five sensitive isolates and seven with reduced sensitivity to fludioxonil presented Genotype 1, characterized by six nucleotide mutations in the intergenic region and one silent mutation in the coding region. Four sensitive isolates and two with reduced sensitivity to fludioxonil presented Genotype 2, with twelve nucleotide mutations in the intergenic region and three silent mutations in the coding region of the *atrB*. Nine isolates with reduced sensitivity to fludioxonil presented Genotype 3, represented by 14 nucleotide mutations in the coding region of the *atrB* gene. Among these changes, five resulted in amino acid mutations (N715H, Y737H, A763S, S775A, and E797G), and the remaining nine were silent mutations. Finally, four isolates with reduced sensitivity to fludioxonil presented Genotype 4 with 18 nucleotide mutations in the intergenic region and 9 silent mutations in the coding region of *atrB* (Table 4).

Table 4. Nucleotide mutations in the intergenic and coding region of the *atrB* gene, aminoacidic mutations in the ABC transporter AtrB, and the genotype number of the 32 isolates of *B. cinerea*.

N° of Isolates	EC ₅₀ Fludioxonil (µg/mL)	Sensitivity to Fludioxonil	Nucleotide Changes Intergenic Region	Nucleotide Changes Coding Region	Amino acid Changes	Genotype
2	0.011	sensitive				
4	0.014	sensitive				
5	0.016	sensitive				
8	0.045	sensitive	T-490C;			
9	0.048	sensitive	A-858G;			
12	1.09	resistant	C-1259T;	C3591T	N.D.	1
16	1.17	resistant	T-1614C;			
17	1.19	resistant	A-1748G;			
19	1.24	resistant	T-1757C			
26	1.50	resistant				
28	1.68	resistant				
29	2.04	resistant				
3	0.013	sensitive	C-67T; G-68T;			
6	0.022	sensitive	G-413A; T-490C;			
7	0.026	sensitive	G-710A; A-858G;	A369G; A1200G;	N.D.	2
10	0.055	sensitive	C-1259T; T-1694G;	T3675C		
11	1.08	resistant	A-1748G; C-1756T;			
18	1.22	resistant	T-1757C; C-1779T			
13	1.10	resistant		T1149C; A1200G;		
14	1.11	resistant		A1645G; A2143C ;	N715H;	
15	1.14	resistant		C2169T; T2209C ;	Y737H;	
20	1.25	resistant		G2287T ; T2323G ;	A763S;	3
21	1.30	resistant	N.D	C2325T; C2379T;	S775A;	
22	1.37	resistant		A2390G ; C2457T;	E797G	
23	1.44	resistant		G2479A; T3675C		
24	1.46	resistant				
25	1.47	resistant				
27	1.51	resistant	A-54G; T-187G; T-252C; C-256T;			
30	2.21	resistant	G-631T; A-858G; A-1172T; C-1259T;	A684T; A921C; T1149C;		
31	2.22	resistant	A-1313G; C-1378T; A-1410C; A-1413G;	A1200G; T2316C; C2325T; T3675C;	N.D.	4
32	2.37	resistant	G-1419T; A-1603T; A-1748G; T-1757C; T-1769C; G-1782C	C3768T; A3915G		

N.D: No Detection. Mutations in bold: associated with amino acid changes.

Only Genotype 3 presented non-synonymous amino acid changes in the *atrB* coding region. Notably, Genotype 3 includes only isolates with reduced sensitivity to fludioxonil. Therefore, we explore the impact of the amino acid changes on the ABC transporter AtrB

function. Through the bioinformatics analysis of the ABC transporter AtrB, four functional domains were identified: two nucleotide-binding domains (NBDs) and two transmembrane (transporter) domains (TMDs). The five mutations of Genotype 3 localized in the NBD of the ABC transporter AtrB. Therefore, we asked whether these aminoacidic changes modified the nucleotide-binding of ABC transporter AtrB. To evaluate this hypothesis, we contrasted the crystal structures of Genotype 3 ABC transporter AtrB with the wild-type version using a structural alignment.

The results showed an RMSD value of 0.58234 Å; this low value suggests the absence of a conformational change associated with the detected mutations. This result was confirmed by performing molecular docking, where the efficiency parameters obtained were identical between the wild-type protein-ATP and the mutated protein-ATP (Table 5).

Table 5. Efficiency parameters obtained from molecular docking ABC transporter AtrB-ATP. WTP-ATP: Wild-type Protein-ATP. MP-ATP: Mutated Protein-ATP.

		Efficiency Parameters (Kcal/mol)				
	Binding Energy	Ligand Efficiency	Intermolar Energy	Electrostatic Energy	Torsional Energy	Free Energy
WTP-ATP	0.97	0.03	3.5	1.97	4.47	7.13
MP-ATP	0.97	0.03	3.5	1.97	4.47	7.13

4. Discussion

Fludioxonil has been widely used pre- and post-harvest in Chile since the 1990s. It has been characterized for its high effectiveness in controlling *B. cinerea* populations in several crops. However, during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons, the first isolates with reduced sensitivity to the molecule were detected in Chilean table grape fields with a history of fludioxonil application associated with the cyprodinil & fludioxonil mixture [41]. The Chilean isolates with fludioxonil EC₅₀ values up to 2.4 µg/mL were categorized as low to moderately resistant [38]. This result is consistent with worldwide reports, indicating the absence of isolates recovered from the field highly resistant to fludioxonil (EC₅₀ > 5 µg/mL) [34,37,39]. However, unique isolates highly resistant to fludioxonil have been detected in some cases, from strawberries, pumpkins, tomatoes, and cut flowers grown in greenhouses, where favorable conditions exist for fungus development [26,27,51,52]. The frequency of isolates with some level of fludioxonil resistance, detected in Chile and other parts of the world, remains low [26,37,41]. Alterations on the Group III hybrid histidine kinase signaling support fludioxonil resistance. These histidine kinases are involved in adaptation to adverse environmental conditions such as osmotic and fungicide stresses and, in addition, play an essential role in the

development and pathogenesis [53–55]. In contrast, Chilean isolates with reduced sensitivity to fludioxonil did not present fitness cost or aggressiveness alterations regarding sensitive isolates to the fungicide [41]. The survival structures evaluation in this study indicated a similar propagation potential for the *B. cinerea* population with reduced sensitivity to fludioxonil relative to sensitive isolates. Based on the available data, there appears to be a mechanism of fludioxonil tolerance unrelated to energy overuse in Chilean isolates. Alternatively, the overexpression of Multidrug Resistance transporters such as ABC transporter AtrB may explain fludioxonil tolerance without affecting the overall *B. cinerea* fitness [34]. Our analysis revealed higher *atrB* endogenous levels in isolates with reduced sensitivity to fludioxonil and lower induction of *atrB* expression triggered by the fungicide regarding sensitive isolates. The fludioxonil-induced induction of *atrB* is significantly more abrupt in fludioxonil-sensitive isolates. In 50% of the sensitive population, fludioxonil induces 20-fold higher levels than the control, while isolates with reduced sensitivity show a maximum of 3-fold induction levels. This suggests that the energetic cost makes it impossible for sensitive isolates to survive over time. In addition, the highest level of transcripts obtained by isolates with reduced sensitivity to fludioxonil are consistent with different reports [37,38]. Also, the *atrB* expression levels did not correlate with the mutations detected in its regulatory region, as isolates with the same mutations displayed inconsistent sensitivity to fludioxonil. Therefore, it is possible that *B. cinerea* isolates from Chile exhibit reduced sensitivity to fludioxonil due to additional cellular bases independent of *atrB* regulation.

The *atrB* regulation depends on the transcription factor Mrr1. Different authors have indicated that isolates with mutant versions of Mrr1 present alterations in sensitivity to fludioxonil, giving rise to isolates that are low and moderately resistant to the molecule [34,36–38]. Chilean isolates with reduced sensitivity to fludioxonil consistently presented a divergent version of Mrr1 compared to the wild-type protein. We found over thirty coding sequence changes, of which three have been previously detected by other authors (F568S, N666G, and G702S) [37,38]. The quantity of mutations is surprisingly elevated and mainly focused on the protein's C-terminal region and the transcription factor domain. Therefore, this suggests that the mutations present in the transcription factor domain could be associated with the increase in the level of *atrB* transcripts in isolates with reduced sensitivity to fludioxonil without ruling out the hypothesis that there may be other relevant transcriptional targets or protein partners that account, for example, for their survival capacity. Remarkably, there is no clear correlation between the overexpression of *atrB* and the absence of mutations in Mrr1 in *Botrytis fragariae*, suggesting alternative mechanisms may be involved in regulation of *atrB* expression [56]. In addition, this study did not detect the deletion of three base pairs, which led to the deletion of L497 in Mrr1. This deletion is associated with the MDR1h phenotype, and it is found in isolates with higher levels of fludioxonil resistance [38,39]. The significant variation in Mrr1 could be

attributed to the high fungicide selection pressure on the *B. cinerea* populations because various fungicides employed in the phytosanitary programs are detoxified by the ABC transporter AtrB, including anilinoypyrimidines, dicarboxamides, benzimidazoles, and other fungicide families [34].

Finally, we determined that direct changes in the ABC transporter AtrB amino acid sequence are unrelated to modifications in sensitivity to fludioxonil. Only a subset of isolates with reduced sensitivity to fludioxonil exhibited non-synonymous alterations in the ABC transporter AtrB. We compared the crystal wild-type and mutated ABC transporter AtrB and calculated the RMSD value to determine whether the mutations altered the protein structure. RMSD value is considered a reliable indicator of variability when applied to similar proteins, like alternative conformations of the same protein. The RMSD is 0 for identical structures, which increases as the two structures become more different [57]. In this study, the RMSD value was approximately 0.5 Å, a value categorized as low, suggesting that the five mutations detected in the ABC transporter AtrB of isolates with reduced sensitivity to fludioxonil did not alter the structural conformation of the protein. Therefore, we improved our analysis by studying the docking of ATP with both wild-type and mutant versions of the protein. We performed two molecular dockings: wild-type NBDs protein and mutated NBDs protein, with ATP molecules as ligands. The NBDs consist of a RecA-type ATP-binding core that is supplemented with an ABC-specific three-stranded antiparallel β -sheet (ABC β) and a α -helical subdomain (ABC α) [58]. The result showed the same efficiency parameters in both conditions evaluated, demonstrating that the physicochemical properties of the mutated amino acids present in the NBD do not alter the ATP union. According to our evaluation parameters, no changes were observed in the ABC transporter AtrB. This suggests that the mutations did not affect its functionality and the required energy produced to excrete the fungicide outside the cell.

5. Conclusions

Botrytis cinerea isolates with reduced sensitivity to fludioxonil are emerging in table grapes in Chilean Central Valley fields. However, fludioxonil is still a valuable tool for effective grey mold control. This study found that all Chilean isolates with reduced sensitivity to fludioxonil consistently carry a version of the Mrr1 transcription factor with 21 non-synonymous changes and two deletions. Furthermore, the isolates exhibit a significant level of *atrB* expression, which is the specific target of Mrr1. The C-terminal portion of the protein harbors most of the changes in Mrr1, indicating modifications in its regulation or transcriptional partners may have occurred for isolates with reduced sensitivity to fludioxonil. Reduced sensitivity to fludioxonil may be due to changes in the regulation of Mrr1 transcriptional targets, resulting in low to no

fitness cost for isolates. Although isolates with reduced sensitivity to fludioxonil are infrequent, it is essential to implement anti-resistance measures in the field due to their high efficacy and the development of new mixtures that include this molecule as an active ingredient.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens13050374/s1>, Figure S1: Mycelial growth of Botrytis isolates subjected to different concentrations of fludioxonil. The graph shows the mycelial growth of three representative isolates sensitive to fludioxonil (green lines) and three isolates presenting reduced sensitivity to fludioxonil (red lines). The concentrations of fludioxonil correspond to those used to calculate the EC₅₀ value.

Author Contributions: Conceptualization, C.C., C.O.-N., J.A., and M.E.; methodology, C.C. and C.O.-N.; software, C.C. and J.E.M.; validation, C.C., C.O.-N., J.A., H.S., and M.E.; formal analysis, C.C., C.O.-N., H.S., and M.E.; investigation, C.C. and C.O.-N.; data curation, C.C. and C.O.-N.; writing—original draft preparation, C.C.; writing—review and editing, C.C., C.O.-N., H.S., and M.E.; supervision, H.S. and M.E.; project administration, M.E.; funding acquisition, C.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FIA (Foundation for Agrarian Innovation) Project PYT-2016-0243 and scholarship ANID (National Research and Development Agency) National Doctorate 21180565 to C.C. Publication funded by the Institutional Excellence Stimulus Program (PEEI) of the Faculty of Agronomic Sciences, University of Chile and by the Laboratory of Fruit and Molecular Phytopathology of Faculty of Agronomic Sciences, University of Chile.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are the property of the Laboratory of Fruit and Molecular Phytopathology of Faculty of Agronomic Sciences, University of Chile. Any requests should be directed to Marcela Esterio (Principal Investigator).

Acknowledgments: The authors thank Verónica Estrada and Madelaine Azócar for facilitating the realization of the methodology of this study. And the PEEI for funded part of the payment for this publication.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Elad, Y.; Pertot, I.; Cotes, A.M.; Stewart, A. Plant hosts of *Botrytis* spp. In *Botrytis—The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*; Fillinger, S., Elad, Y., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016, pp. 413–486. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_20.
2. Hao, Y.; Cao, X.; Ma, C.; Zhang, Z.; Zhao, N.; Ali, A.; Hou, T.; Xiang, Z.; Zhuang, J.; Wu, S.; et al. Potential applications and antifungal activities of engineered nanomaterials against gray mold disease agent *Botrytis cinerea* on rose petals. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1332. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01332>.
3. McClellan, W.; Hewitt, W. Early Botrytis rot of grapes: Time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. In *Vitis vinifera* L. *Phytopatology* **1973**, *63*, 1151–1157. <https://doi.org/10.1094/Phyto-63-1151>.
4. Pezet, R.; Viret, O.; Perret, C.; Tabacchi, R. Latency of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to grey mould. *J. Phytopathol.* **2003**, *151*, 208–214. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00707.x>.
5. Keller, M.; Viret, O.; Cole, F.M. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* **2003**, *93*, 316–322. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.316>.
6. Viret, O.; Keller, M.; Jaudzems, V.G.; Cole, F.M. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: Light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology* **2004**, *94*, 850–857. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.8.850>.
7. Mehari, Z.H.; Pilati, S.; Sonogo, P.; Malacarne, G.; Vrhovsek, U.; Engelen, K.; Tudzunsky, P.; Zottini, M.; Baraldi, E.; Moser, C. Molecular analysis of the early interaction between the grapevine flower and *Botrytis cinerea* reveals that prompt activation of specific host pathways leads to fungus quiescence. *Plant Cell Environ.* **2017**, *40*, 1409–1428. <https://doi.org/10.1111/pce.12937>.
8. Emmanuel, C.J.; van Kan, J.A.L.; Shaw, M.W. Differences in the gene transcription state of *Botrytis cinerea* between necrotic and symptom- less infections of lettuce and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Pathol.* **2018**, *67*, 1865–1873. <https://doi.org/10.1111/ppa.12907>.
9. Elmer, P.A.G.; Michailides, T.J. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*; Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007, pp. 243–272. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_14.
10. Esterio, M.; Copier, C.; Román, A.; Araneda, M.J.; Rubilar, M.; Pérez, I.; Auger, J. Frequency of fungicide-resistant *Botrytis cinerea* populations isolated from ‘Thompson Seedless’ table grapes in the Central Valley of Chile. *Cienc. Investig. Agrar.* **2017**, *44*, 295–306. <https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1721>.

11. Esterio, M.; Auger, J.; Ramos, C.; García, H. First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* Pers. on grapevine in Chile. *Plant Dis.* **2007**, *91*, 768. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0768C>.
12. Esterio, M.; Ramos, C.; Walker, A.S.; Fillinger, S.; Leroux, P.; Auger, J. Phenotypic and genetic characterization of *B. cinerea* Chilean isolates of different levels of fenhexamid sensitivity. *Phytopathol. Mediterr.* **2011**, *50*, 414–420. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8958.
13. Esterio, M.; Araneda, M.J.; Roman, A.; Pizzaro, L.; Copier, C.; Auger, J. First report of boscalid resistant *Botrytis cinerea* isolates carrying the mutations H272R, H272Y, P225L, and P225H from table grape in Chile. *Plant Dis.* **2015**, *99*, 891. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-14-1257-PDN>.
14. Latorre, B.; Spadaro, I.; Rioja, M. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Prot.* **2002**, *21*, 957–961. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00074-1](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00074-1).
15. Piqueras, C.; Latorre, B.; Torres, R. Effectiveness of isofetamid, a new succinate dehydrogenase inhibitor fungicide, in the control of grapevine gray mold. *Cienc. Investig. Agrar.* **2014**, *41*, 365–374. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202014000300009>.
16. Arima, K.; Imanaka, H.; Kousaka, M.; Fukuta, A.; Tamura, G. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **1964**, *28*, 575–576. <https://doi.org/10.1080/00021369.1964.10858275>.
17. Kilani, J.; Fillinger, S. Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02014>.
18. Howell, C.R.; Stipanovic, R.D. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* **1979**, *69*, 480–482. <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-480>.
19. Leadbitter, N.J.; Nyfeler, R.; Elmsheuser, H. The phenylpyrroles: The history of their development at Ciba. In Proceedings of the Symposium Held at the University of Kent, Canterbury, UK, 5–7 January 1994; pp. 129–134.
20. Pillonel, C.; Meyer, T. Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pestic. Sci.* **1997**, *49*, 229–236. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199703\)49:3<229::AID-PS525>3.0.CO;2T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199703)49:3<229::AID-PS525>3.0.CO;2T).
21. Motoyama, T.; Ohira, T.; Kadokura, K.; Ichiishi, A.; Fujimura, M.; Yamaguchi, I.; Kudo, T. An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast. *Curr. Genet.* **2005**, *47*, 298–306. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0572-6>.
22. Fujimura, M.; Ochiai, N.; Ichiichi, A.; Usami, R.; Horikoshi, K.; Yamaguchi, I. Sensitivity to phenylpyrrole fungicides and abnormal glycerol accumulation in os and cut mutant strains of *Neurospora crassa*. *J. Pestic. Sci.* **2000**, *25*, 31–36. <http://doi.org/10.1584/jpestics.25.31>.

23. Ochiai, N.; Fujimura, M.; Motoyama, T.; Ichiishi, A.; Usami, R.; Horikoshi, K.; Yamaguchi, I. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag. Sci.* **2001**, *57*, 437–442. <https://doi.org/10.1002/ps.302>.
24. Oshima, M.; Fujimura, M.; Banno, S.; Hashimoto, C.; Motoyama, T.; Ichiishi, A.; Yamaguchi, I.; Fujimura, M. A point mutation in the two-component histidine kinase BcOS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **2002**, *92*, 75–80. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.75>.
25. Fillinger, S.; Ajouz, S.; Nicot, P.C.; Leroux, P.; Bardin, M. Functional and structural comparison of pyrrolnitrin and iprodione induced modifications in the class III histidine-kinase Bos1 of *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 42520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042520>.
26. Ren, W.; Shao, W.; Han, X.; Zhou, M.; Chen, C. Molecular and biochemical characterization of laboratory and field mutants of *Botrytis cinerea* resistant to fludioxonil. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 1414–1423. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1290-RE>.
27. Zhou, F.; Hu, H.Y.; Song, Y.L.; Gao, Y.Q.; Liu, Q.L.; Song, P.W.; Chen, E.; Yu, Y.; Li, D.; Li, C. Biological characteristics and molecular mechanism of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from Henan Province of China. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 1041–1047. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1722-RE>.
28. Brandhorst, T.T.; Kean, I.R.L.; Lawry, S.M.; Wiesner, D.L.; Klein, B.S. Phenylpyrrole fungicides act on triosephosphate isomerase to induce methylglyoxal stress and alter hybrid histidine kinase activity. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5047. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41564-9>.
29. Ajouz, S.; Bardin, M.; Nicot, P.C.; El Maataoui, M. Comparison of the development in planta of a pyrrolnitrin-resistant mutant of *Botrytis cinerea* and its sensitive wild-type parent isolate. *Eur. J. Plant Pathol.* **2011**, *129*, 31–42. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9638-5>.
30. Malandrakis, A.A.; Apostolidou, Z.A.; Markoglou, A.; Flouri, F. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. *Eur. J. Plant Pathol.* **2015**, *142*, 489–499. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0628-5>.
31. Pérez-Tomás, R. Multidrug resistance: Retrospect and prospects in anticancer drug treatment. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1859–1876. <https://doi.org/10.2174/092986706777585077>.
32. Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 119–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>.
33. Kretschmer, M. Emergence of multi-drug resistance in fungal pathogens: A potential threat to fungicide performance in agriculture. In *Fungicide Resistance in Crop Protection*:

- Risk and Management*; Thind, T.S., Ed.; CABI: Oxfordshire, UK, 2012, pp. 251–267. <https://doi.org/10.1079/9781845939052.0251>.
34. Kretschmer, M.; Leroch, M.; Mosbach, A.; Walker, A.S.; Fillinger, S.; Mernke, D.; Schoonbeek, H.J.; Pradier, J.M.; Leroux, P.; de Waard, M.A.; et al. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in the field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000696. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>.
 35. Paul, S.; Moye-Rowley, W.S. Multidrug resistance in fungi: Regulation of transporter-encoding gene expression. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 143. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00143>.
 36. Sofianos, G.; Samaras, A.; Karaoglanidis, G. Multiple and multidrug resistance in *Botrytis cinerea*: molecular mechanisms of LR/MDR strains in Greece and effects of co-existence of different resistance mechanisms on fungicide sensitivity. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, 1273193. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1273193>.
 37. Li, X.; Fernández-Ortuño, D.; Grabke, A.; Schnabel, G. Resistance to fludioxonil in *Botrytis cinerea* isolates from blackberry and strawberry. *Phytopathology* **2014**, *104*, 724–732. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-13-0308-R>.
 38. Fernández-Ortuño, D.; Grabke, A.; Li, X.; Schnabel, G. Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **2015**, *105*, 424–432. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0161-R>.
 39. Leroch, M.; Plesken, C.; Weber, R.W.S.; Kauff, F.; Scalliet, G.; Hahn, M. Gray mold populations in German strawberry fields show multiple fungicide resistance and are dominated by a novel clade close to *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 159–167. <https://doi.org/10.1128/AEM.02655-12>.
 40. Hahn, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *J. Chem. Biol.* **2014**, *7*, 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>.
 41. Esterio, M.; Osorio-Navarro, C.; Rodríguez, D.; Copier, C.; Azócar, M.; Rubilar, M.; Estrada, V.; Auger, J. Chilean *Botrytis cinerea* isolates with reduced sensitivity to fludioxonil exhibit low to null fitness penalties. *Plant Dis.* **2024**. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-23-2015-SC>.
 42. Wang, Y.F.; Hao, F.M.; Zhou, H.H.; Chen, J.B.; Su, H.C.; Yang, F.; Cai, Y.Y.; Li, G.L.; Zhang, M.; Zhou, F. Exploring potential mechanisms of fludioxonil resistance in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *J. Fungi* **2022**, *8*, 839. <https://doi.org/10.3390/jof8080839>
 43. Wang, W.; Fang, Y.; Imran, M.; Hu, Z.; Zhang, S.; Huang, Z.; Liu, X. Characterization of the field fludioxonil resistance and its molecular basis in *Botrytis cinerea* from Shanghai province in China. *Microorganisms* **2021**, *9*, 266. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020266>.

44. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
45. Lu, G.; Moriyama, E.N. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform.* **2005**, *5*, 378–388. <https://doi.org/10.1093/bib/5.4.378>.
46. Paysan-Lafosse, T.; Blum, M.; Chuguransky, S.; Grego, T.; Pinto, B.L.; Salazar, G.A.; Bileschi, M.L.; Bork, P.; Bridge, A.; Colwell, L.; et al. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *51*, D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>.
47. Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
48. Roberts, E.; Eargle, J.; Wright, D.; Luthey-Schulten, Z. Multiseq: Unifying sequence and structure data for evolutionary analysis. *BMC Bioinform.* **2006**, *7*, 382. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-382>.
49. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.;Goodsell, D.S.; Olson, D.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
50. Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat: Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2008. Available online: <https://www.infostat.com.ar/> (accessed on 20 March 2022).
51. Dowling, M.; Gelain, J.; De Mio, L.; Schnabel, G. Characterization of high fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from calibrachoa flowers. *Phytopathology* **2021**, *111*, 478–484. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0268-R>.
52. Sang, C.; Ren, W.; Wang, J.; Xu, H.; Zhang, Z.; Zhou, M.; Chen, C.; Wang, K. Detection and fitness comparison of target-based highly fludioxonil-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from strawberry and cucumber in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2018**, *147*, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.01.012>.
53. Viaud, M.; Fillinger, S.; Lui, W.; Polepalli, J.S.; Le Pêcheur, P.; Kunduru, A.R.; Leroux, P.; Legendre, L. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2006**, *19*, 1042–1050. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1042>.
54. Ma, Z.; Yan, L.; Luo, Y.; Michailides, T.J. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2007**, *88*, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.01.005>.
55. Liu, W.; Leroux, P.; Fillinger, S. The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole- resistance. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 1062–1074. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.04.003>.

56. Hu, M.; Cosseboom, S.; Schnabel, G. atrB-Associated fludioxonil resistance in *Botrytis fragariae* not linked to mutations in transcription factor Mrr1. *Phytopathology* **2019**, *109*, 839–846. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-18-0341-R>.
57. Carugo, O.; Pongor, S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1470–1473. <https://doi.org/10.1110/ps.690101>.
58. Smith, P.C.; Karpowich, N.; Millen, L.; Moody, J.E.; Rosen, J.; Thomas, P.J.; Hunt, J.F. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 139–149. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00576-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00576-2).

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

DISCUSIÓN GENERAL

Fludioxonil es un fungicida que posee un amplio espectro de acción y es una de las moléculas clave en el control de la pudrición gris en la vid. La pérdida de sensibilidad a fludioxonil en aislados de *B. cinerea* ha sido detectada en diversas partes del mundo, clasificándose los aislados mayoritariamente como leve o moderadamente resistentes a la molécula. En casos puntuales se han podido detectar aislados altamente resistentes, cuando las condiciones ambientales han sido favorables para el desarrollo del hongo (Dowling *et al.*, 2021; Ren *et al.*, 2016; Sang *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020). A nivel mundial, se han descrito dos mecanismos principales asociados a resistencia a fludioxonil. El primero de ellos corresponde a mutaciones localizadas en el dominio ATPasa del extremo C-terminal y en el dominio HAMP del extremo N-terminal de la proteína histidina kinasa presente en la vía HOG. Estas mutaciones provocan un moderado y alto nivel de resistencia (Ren *et al.*, 2016). El otro mecanismo asociado, corresponde a Resistencia Multidroga, el cual se caracteriza por una sobreexpresión de proteínas de membrana, encargadas de detoxificar compuestos químicamente no relacionados, dando origen a aislados con una moderada resistencia a fludioxonil (Kretschmer, 2012; Nikaido, 2009; Pérez-Tomás, 2006). En Chile, fludioxonil ha destacado por su alta efectividad, sin embargo, por primera vez desde su introducción, en las temporadas 2016-2017 y 2017-2018, de un total de 2400 aislados de *B. cinerea* recuperados desde campos de uva de mesa se pudieron detectar 22 con pérdida de sensibilidad a la molécula. Como hipótesis se planteó que el mecanismo de resistencia de estos aislados estaría asociado a MDR, ya que, en estudios previos, según pruebas *in vitro* de crecimiento miceliar, fueron categorizados como moderadamente resistentes a fludioxonil y por no poseer alteraciones en su capacidad de sobrevivencia y en la agresividad con respecto a aislados sensibles a la molécula (Esterio *et al.*, 2024). En el presente estudio, además, se pudo determinar que, si bien la formación y desarrollo de las estructuras de sobrevivencia fueron distintas entre algunos aislados del hongo, estos parámetros no se vieron alterados según la sensibilidad del aislado. Este aspecto cobra mucha importancia ya que, a nivel mundial como a nivel nacional existe una baja frecuencia de aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil, asumiendo con ello que estos aislados son menos competitivos que los aislados sensibles en campo, este fenómeno se ha podido esclarecer mediante la relación positiva entre la presencia de mutaciones en el gen *bos1*, primer mecanismo de resistencia descrito anteriormente, y la

alteración en la capacidad de sobrevivencia del hongo (Ajouz *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2007; Viaud *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2020). Así mismo, Ren *et al.*, (2019) pudo establecer que deleciones de la proteína histidina kinasa provocaría una disminución en la esporulación y alteraciones en el tamaño y forma de las conidias con respecto a las cepas silvestres, como también alteraciones en el desarrollo de esclerocios. Por lo tanto, se ha podría determinar que esta proteína estaría relacionada con la detección de estímulos externos asociados a la formación de estas estructuras en *B. cinerea*. Por otro lado, aislados altamente resistentes a fludioxonil obtenidos desde frutilla presentaron mayor tasa de esporulación y de producción de esclerocios con respecto a aislados altamente resistentes a fludioxonil obtenidos desde pepino. Este resultado muestra que la diferencia en la capacidad de sobrevivencia puede estar dada por las distintas mutaciones detectadas en el gen *bos 1* y por la presión de selección ejercida en los diferentes cultivos (Sang *et al.*, 2018). También se ha podido determinar una estrecha relación entre la enzima peroxidasa (POD) y la patogénesis de *B. cinerea*. Distintos estudios han podido dilucidar una actividad mayor de POD en aislados resistentes a fludioxonil, los cuales presentan una menor capacidad de sobrevivencia, con respecto a los aislados sensibles. Por lo tanto, este hallazgo supone que esta enzima sería otro factor involucrado en el potencial de desarrollo, crecimiento y propagación del patógeno (Zhou *et al.*, 2020). Otro parámetro importante evaluado en este estudio fue el nivel de sobreexpresión del gen *atrB*. Este gen codifica proteínas de membrana de la familia ABC encargadas de expulsar a fludioxonil desde el interior de la célula hacia el exterior (Kretschmer *et al.*, 2009). Los resultados mostraron que en la condición sin fungicida los aislados sensibles presentaron menores niveles de transcritos con respecto a los con pérdida de sensibilidad a fludioxonil, sin embargo, el nivel de expresión de ambos tipos de aislados fue variable. Cuando los aislados fueron sometidos al fungicida ambos tipos de aislados aumentaron sus niveles de transcritos también de manera variable, manteniéndose mayores los de los aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil. Sin embargo, la tasa de cambio fue mayor en la mitad de los aislados sensibles que en los aislados con pérdida de sensibilidad. Este resultado fue bastante interesante, ya que los aislados fueron sometidos a una dosis mínima de fludioxonil (0,05 µg/mL), en comparación con las altas dosis utilizadas por otros autores donde el análisis se realizó sobre conidias que una vez germinadas fueron sometidas a 1 µg/mL del ingrediente activo, lo cual provocó su inhibición completa (Leroch *et al.*, 2013). En el caso del presente estudio, la dosis utilizada permitió el análisis del hongo en activo crecimiento, simulando con

ello su biología en campo y además provocando una respuesta fisiológica tanto en los aislados sensibles como en los con pérdida de sensibilidad a la molécula. Por otro lado, se ha podido determinar que la sobreexpresión de genes que codifican proteínas transportadoras de membrana ha sido uno de los mecanismos que confieren resistencia en distintos hongos fitopatógenos (Hu *et al.*, 2019). En la mayoría de los casos esta sobreexpresión es causada por modificaciones en las secuencias promotoras de los genes sobreexpresados o por mutaciones en factores de transcripción responsables de la regulación de la expresión de estos genes (Kretschmer *et al.*, 2009). Al realizar el análisis de la secuencia codificante del gen *mrr1*, los resultados indicaron que la sobreexpresión del gen *atrB* podría estar dada por las mutaciones identificadas, ya que estas mutaciones estuvieron presentes en todos los aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil, contrariamente a lo detectado en los aislados sensibles, los cuales presentaron un genotipo silvestre (con ausencia de mutaciones con respecto a la secuencia de la cepa silvestre B05.10). Basado en la identificación del mismo genotipo presente en todos los aislados sensibles y del mismo genotipo detectado en los aislados con pérdida de sensibilidad, surgió la duda de la causa de la alta variabilidad en los niveles de expresión del gen *atrB* en ambos tipos de aislados y en las dos condiciones analizadas (con y sin el fungicida). Al realizar el análisis las mutaciones presentes en la secuencia reguladora del gen *atrB*, no se pudo determinar una asociación entre los niveles de expresión en los cuales se clasificaron los aislados y las mutaciones detectadas en esta región. Por otro lado, tampoco se pudo asociar positivamente el nivel de expresión del gen *atrB* con el nivel de pérdida de sensibilidad a fludioxonil (basado en los valores EC_{50}), contrariamente a lo detectado por Li *et al.*, (2014). Este resultado podría suponer, que la regulación de la expresión del gen *atrB*, en los aislados chilenos de *B. cinerea*, no solamente está comandada por el factor de transcripción Mrr1, sino que por otros mecanismos celulares. Como, por ejemplo, amplificación y duplicación génica, mecanismo adaptativo detectado en bacterias frente a la presencia de antibióticos (Sandegren and Andersson, 2009), por un incremento en el número de copias del gen, mecanismo evolutivo de resistencia en plantas a diferentes herbicidas (Koo *et al.*, 2018) o por mutaciones presentes en factores de transcripción diferentes al Mrr1. Estos ejemplos no han sido determinados como mecanismos asociados a resistencia en hongos fitopatógenos y por lo tanto debieran ser evaluados en estudios posteriores. Por otro lado, al realizar el análisis de la secuencia completa del gen *atrB*, se pudieron identificar 4 genotipos distintos según las mutaciones detectadas. Sin

embargo, algunos de estos genotipos no presentaron una correlación directa con la pérdida de sensibilidad a fludioxonil. Por ejemplo, los genotipos 1 y 2 estuvieron conformados por aislados sensibles y con pérdida de sensibilidad a fludioxonil. Ahora bien, el genotipo 4 estuvo conformado sólo por aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil, además es importante mencionar que la mayoría de estos aislados presentaron los mayores niveles de pérdida de sensibilidad a la molécula. Según este resultado, podría existir algún tipo asociación entre las mutaciones detectadas en la secuencia regulatoria del gen *atrB* en los aislados pertenecientes a este genotipo y su alto valor EC_{50} . Con respecto al genotipo 3, al estar conformado solamente por aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil y por ser el único que presentó mutaciones a nivel de proteína, se evaluó si estas alteraciones podrían provocar un cambio en la estructura y con ello en la función de la proteína transportadora BcatrB. Las proteínas transportadoras de membrana del tipo ABC presentan cuatro dominios funcionales, dos de ellos denominados dominios transmembrana (dominio TM), los cuales corresponden a la porción de la proteína con características hidrofóbicas que atraviesa la bicapa lipídica de la membrana celular, donde su principal función es el paso de moléculas para la detoxificación celular, y dos dominios denominados dominios de unión al nucleótido (dominio NB) ubicados en la región citoplasmática de la célula, donde ocurre la unión e hidrólisis del ATP. El mecanismo de transporte de este tipo de proteínas ocurre cuando el ATP se une al dominio NB, donde ocurre su hidrólisis (Higgins and Linton, 2004; Rees *et al.*, 2009). En este sentido, las mutaciones fueron detectadas en el dominio NB, y por lo tanto podría existir un posible cambio estructural en este dominio producido por estas mutaciones, lo cual podría alterar la hidrólisis del ATP y con ello la detoxificación de fludioxonil. Sin embargo, al realizar el alineamiento estructural entre la estructura de la proteína silvestre y de la proteína mutada, el valor RMSD fue bajo 2 Å. Este resultado indica que ambas estructuras proteicas tienen una igual orientación cristalográfica (Ramírez and Caballero, 2018) y, por lo tanto, no se podría establecer un cambio en la estructura de la proteína mutada. Este resultado fue confirmado mediante el acoplamiento molecular realizado entre ambas estructuras y la molécula de ATP. En este caso, en las dos condiciones evaluadas, los parámetros de eficiencia obtenidos fueron los mismos. No obstante, es importante señalar que por las diferentes características del aminoácido mutado con respecto al silvestre se hubiera esperado un cambio conformacional en la estructura de la proteína. Por ejemplo, la mutación N715H corresponde al cambio de asparagina por histidina, en este caso asparagina es

un aminoácido polar neutro, mientras que histidina es un aminoácido cargado positivamente (básico); la mutación Y737H corresponde al cambio de tirosina por histidina, en este caso tirosina es un aminoácido polar neutro mientras que histidina es un aminoácido cargado positivamente como se mencionó anteriormente; la mutación A763S corresponde al cambio de alanina por serina, en este caso alanina es un aminoácido no polar neutro, mientras que serina es un aminoácido polar neutro; la mutación S775A corresponde al cambio de serina por alanina, en este caso y tal como se ya se mencionó serina es un aminoácido polar neutro mientras que alanina es un aminoácido no polar neutro y la mutación E797G corresponde al cambio de ácido glutámico por glicina, en este caso, el ácido glutámico es un aminoácido cargado negativamente (ácido), mientras que glicina es un aminoácido polar neutro (Garrett *et al.*, 2010). Como se puede apreciar, según la descripción detallada anteriormente, ninguno de los aminoácidos presentes en la proteína mutada presenta las mismas características físico-químicas que el aminoácido presente en la proteína silvestre. En este sentido, es importante destacar que existen diferentes factores asociados a la carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad, tamaño y tipo de grupo funcional que se asocian a la estructura y a la función de la proteína (Creighton, 1993). Por lo tanto, se podría estipular que las diferencias entre cada uno de los aminoácidos no fueron suficientes para originar algún cambio conformacional en el dominio de unión al nucleótido donde se pudieron detectar las mutaciones como se mencionó anteriormente.

Los resultados, obtenidos en este estudio, sugieren el importante rol que posee el factor de transcripción Mrr1 en la pérdida de sensibilidad a fludioxonil en aislados chilenos de *B. cinerea* y su asociación con el mecanismo de resistencia conocido como Resistencia Multidroga. Este mecanismo posee entre otras características la expulsión de moléculas químicamente no relacionadas a través de proteínas presentes en la membrana plasmática. El rango de compuestos que pueden ser expulsados por este tipo de proteínas es bastante amplio, comprendiendo distintas familias de fungicidas, como por ejemplo anilino pirimidinas, dicarboxamidas, benzimidazoles y fenilpirroles para el caso del fenotipo MDR1 (Kretschmer *et al.*, 2009) y las familias de hidroxianilidas y triazoles para el caso del fenotipo MDR2 (Kretschmer *et al.*, 2009; Mernke *et al.*, 2011). También se ha podido determinar que la sobreexpresión de estas proteínas de membrana produce la excreción al exterior de la célula del hongo compuestos con propiedades antifúngicas producidos por la planta, entre ellos compuestos aromáticos como el

eugenol y el resveratrol, como también la excreción de ciertos antibióticos (Schoonbeek *et al.*, 2001; 2002; 2003). Por lo tanto, este fenómeno de Resistencia Multidroga no solo afecta la sensibilidad del hongo frente a diferentes moléculas fungicidas, disminuyendo la eficacia de cada una de ellas y con ello limitando las alternativas de control para *Botrytis* disponibles en el mercado, sino también limita las capacidades que posee la planta para defenderse del ataque de hongos y bacterias. Ante este escenario, se pone nuevamente de manifiesto la necesidad de integrar en los programas fitosanitarios estrategias antiresistencia. Como norma general y enfocado a la mayoría de las moléculas químicas actualmente en uso, se deben tener presentes los siguientes aspectos: aplicación de manera alternada moléculas con un mismo modo de acción, no exceder de tres aplicaciones de una misma molécula durante la temporada y no utilizar subdosis. Particularmente en el caso de fludioxonil, se recomiendan 2 aplicaciones si el programa fitosanitario contempla entre 2 a 5 aplicaciones de fungicidas botryticidas durante la temporada o 3 aplicaciones si el programa fitosanitario contempla 6 o más aplicaciones de fungicidas botryticidas durante la temporada y si fludioxonil está formulado en mezcla con otro fungicida botryticida de diferente modo de acción, se pueden realizar dos aplicaciones consecutivas de esta mezcla (FRAC, 2020). Estas medidas deben ser implementadas indiscutidamente para la aplicación de fludioxonil, ya que por la alta efectividad que presenta y por el desarrollo de nuevas mezclas fungicidas que lo incluyen como ingrediente activo es y será una molécula frecuentemente utilizada en uva de mesa en Chile, tanto para el control de *Botrytis* como para el control de otros hongos fitopatógenos presentes en este cultivo.

CONCLUSIONES

1. Los aislados de *Botrytis cinerea* con pérdida de sensibilidad a fludioxonil no presentaron diferencias en su esporulación y producción de esclerocios con respecto a los aislados sensibles. Este resultado se asociaría a Resistencia Multidroga como mecanismo de pérdida de sensibilidad.
2. Los niveles de transcritos del gen *atrB* fueron mayores en los aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil con respecto a los aislados sensibles en las dos condiciones evaluadas (con y sin fungicida). Al ser sometidos al fungicida todos los aislados, sensibles y con pérdida de sensibilidad a fludioxonil aumentaron el nivel de expresión del gen *atrB*.
3. Los 32 aislados de *B. cinerea* presentaron dos genotipos diferentes según las mutaciones detectadas en la secuencia codificante del gen *mrr1*, un genotipo silvestre y un genotipo mutado. El genotipo silvestre fue detectado en todos los aislados sensibles, mientras que el genotipo mutado fue detectado en todos los aislados con pérdida de sensibilidad a fludioxonil. Este último genotipo presentó 32 cambios en la región codificante del gen.
4. Los 32 aislados de *B. cinerea* presentaron cuatro genotipos diferentes según las mutaciones detectadas en la secuencia promotora y codificante del gen *atrB*. Los genotipos detectados no se asociaron a la pérdida de sensibilidad a fludioxonil, ya que tanto aislados sensibles como con pérdida de sensibilidad presentaron un mismo genotipo, ni tampoco se asociaron con las diferencias en los niveles de expresión de *atrB* detectadas en aislados sensibles como con pérdida de sensibilidad a fludioxonil.
5. Las 5 mutaciones detectadas en la proteína transportadora BcartB no provocaron un cambio conformacional en ella, por lo tanto, no se afectó la unión del ATP con el Dominio de Unión del Nucleótido (NBD). Este resultado indicaría que estas mutaciones no presentarían una relación con la pérdida de sensibilidad a fludioxonil asociado a una alteración en la función de la proteína.

6. Finalmente, y de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se podría establecer que el mecanismo asociado a la pérdida de sensibilidad a fludioxonil en aislados chilenos de *B. cinerea* sería la sobreexpresión del gen *artB*. Esta sobreexpresión estaría provocada por mutaciones en el gen que *mrr1*, que codifica al factor de transcripción Mrr1, encargado de regular la expresión del gen *artB* y con ello el nivel de la proteína transportadora BcatrB, la cual tiene como función expulsar el fungicida hacia el exterior de la célula. Por lo tanto y basado en lo señalado anteriormente se acepta la hipótesis propuesta en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. Fitopatología. 2ª ed. México D. F: Limusa S.A.; 1996.

Ajouz S, Nicot PC, Bardin M. Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathol.* 2010; 59:556–566.

Alberoni G, Collina M, Lanen C, Leroux P, Brunelli A. Field strains of *Stemphylium vesicarium* with a resistance to dicarboximide fungicides correlated with changes in a two-component histidine kinase. *Eur J Plant Pathol.* 2010; 128:171–184.

Altieri V, Rossi V, Fedele G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* as influenced by grapevine growth stages and environmental conditions. *Plants.* 2023; 12:3430.

Amselem J, Cuomo CA, van Kan JAL, Viaud M, Benito EP, Couloux A, *et al.* Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.* 2011; 7(8):e1002230.

Arima K, Imanaka H, Kousaka M, Fukuta A, Tamura G. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric Biol Chem.* 1964; 28:575 – 576.

Auger J. La pudrición gris de la vid. *Revista Frutícola.* 1981; 2(2):7-9.

Auger J. La Botrytis o pudrición gris, permanente amenaza para la uva de mesa de exportación. *Norte Agrofrutícola.* 1987; 1(2):4-6.

Auger J. Esterio M. Botrytis en vides en Chile: Epidemiología y resistencia a fungicidas. In: Esterio, M y Auger, J. Botrytis: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago, Chile. 1997.

Avenot H, Quattrini J, Puckett R, Michailides TJ. Different levels of resistance to cyprodinil and iprodione and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates collected from pistachio, grape, and pomegranate fields in California. *Crop Prot.* 2018; 112:274–281.

Bahn YS. Master and commander in fungal pathogens: The two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot Cell.* 2008; 7: 2017–2036.

Banno S, Fukumori F, Ichiishi A, Okada K, Uekusa H, Kimura M, *et al.* Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology.* 2008; 98:397–404.

Benito E, Arranz M, Eslava, A. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17:S43-S46.

Billard A, Fillinger S, Leroux P, Lachaise H, Befar R, Debieu D. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Manag Sci.* 2012; 68:684–691.

Brandhorst T, Klein, B. Uncertainty surrounding the mechanism and safety of the post-harvest fungicide fludioxonil. *Food Chem Toxicol.* 2019; 123:561-565.

Brewster JL, De-Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science.* 1993; 59:1760–1763.

Calvo H, Roudet J, Gracia AP, Venturini ME, Fermaud M. Comparison of efficacy and modes of action of two high-potential biocontrol *Bacillus* strains and commercial biocontrol products against *Botrytis cinerea* in table grapes. *OENO One.* 2021; 3:229-243.

Calvo-Garrido C, Roudet J, Aveline N, Davidou L, Dupin S, Fermaud M. Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Front Plant Sci.* 2019; 10:105.

Carisse O, Levasseur A, Van der Heyden H. A new risk indicator for botrytis leaf blight of onion caused by *Botrytis squamosa* based on infection efficiency of airborne inoculum. *Plant Pathol.* 2012; 61:1154-1164.

Carter MQ, Chapman MH, Gabler F, Brandl MT. Effect of sulfur dioxide fumigation on survival of foodborne pathogens on table grapes under standard storage temperature. *Food Microbiol.* 2015; 49:189–196.

Choquer M, Fournier E, Kunz C, Levis C, Pradier JM, Simon A, *et al.* *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 277(1):1–10.

Ciliberti N, Fermaud M, Languasco L, Rossi V. Influence of fungal strain, temperature, and wetness duration on infection of grapevine inflorescences and young berry clusters by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 2015; 105:325–333.

Cravero S, Valle D, Rabino M. Manual and mechanical grapevine leaf removal: effects on grey mould, sour rot and other grape diseases, comparison with chemical control. *Gior Fitopatolog.* 2004; 227-234.

Creighton TH. "Chapter 1". *Proteins: structures and molecular properties.* San Francisco: W. H. Freeman; 1993.

Crisosto C, Gordon F. Postharvest handling systems: small fruits, table grapes. En: *Postharvest Technology of Horticultural Crops.* A. Kader (Ed). Agricultural and Natural Resources, University of California, Davis, California. 2002; 357-363.

Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack K, di Pietro A, Spanu P, *et al.* The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2012; 13(4):414–430.

De Miccolis Angelini RM, Masiello M, Rotolo C, Pollastro S, Faretra F. Molecular characterisation and detection of resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Manag. Sci.* 2014; 70:1884–1893.

Deytieux-Belleau C, Geny L, Roudet J, Mayet V, Doneche B, Fermaud M. Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol.* 2009; 125:551-563.

De-Waard MA, Andrade AC, Hayashi K, Schoonbeek HJ, Stergiopoulos I, Zwiers LH. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Manag Sci.* 2006; 62:195–207.

Diolez A, Marches F, Fortini D, Brygoo Y. *Boty*, a long-terminal repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61:103-108.

Diskin S, Sharir T, Feygenberg O, Maurer D, Alkan N. Fludioxonil—A potential alternative for postharvest disease control in mango fruit. *Crop Prot.* 2019; 124:104855.

Doss RP. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(2):404–408.

Dowling M, Gelain J, De Mio L, Schnabel G. Characterization of high fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from calibrachoa flowers. *Phytopathology.* 2021; 111:478-484.

Elad Y, Pertot I, Cotes Prado A, Stewart A. Plant hosts of *Botrytis* spp. In: *Botrytis– the Fungus, the pathogen and its management in agricultural systems.* eds. S. Fillinger & Y. Elad. Springer International Publishing. 2016; 413-486.

Elmer PAG, Michailides TJ. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds). *Botrytis: Biology, Pathology and control.* Dordrecht, the Netherlands: Kluwer academic publishers. 2004; 243-272.

Elmer PAG, Reglinski T, Wurms K, Wood PN. Enabling technologies: the practical integration of biological and natural products to disease control. En: Butcher, M. R., Walker, J. T. S. and Zydenbos, S. M. (eds). Proceedings of the Future changes in crop protection: Repositioning NZ's Primary Industries. Napier, New Zealand. 2007; 109-116.

Errampalli D. Effect of fludioxonil on germination and growth of *Penicillium expansum* and decay in apple cvs. Empire and Gala. Crop Prot. 2004; 23:811–817.

Esterio M. 2005. Tesis. Caracterización genotípica y fenotípica de la forma esclerocial de *Botrytis cinerea* Pers. en cv. Thompson Seedless (*Vitis vinifera* L.) en dos localidades del valle central de Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias agronómicas.

Esterio M, Osorio-Navarro C, Rodríguez D, Copier C, Azócar M, Rubilar M, *et al.* Chilean *Botrytis cinerea* isolates with reduced sensitivity to fludioxonil exhibit low to null fitness penalties. Plant Dis. 2024.

Esterio M, Auger J, Ramos C, García H. First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* Pers. on grapevine in Chile. Plant Dis. 2007; 91(6):768.

Esterio M, Copier C, Román A, Araneda MJ, Rubilar M, Pérez, I, *et al.* Frecuencia de poblaciones de *Botrytis cinerea* resistentes a fungicidas en uva de mesa ‘Thompson Seedless’ en el Valle Central de Chile. Cienc Inv Agrar. 2017; 44(3):295-306.

Esterio M, Muñoz G, Ramos C, Cofré G, Estévez R, Salinas A, *et al.* Characterization of *Botrytis cinerea* isolates present in Thompson seedless table grapes in the Central Valley of Chile. Plant Dis. 2011; 95:683-690.

Evers D, Molitor D, Rothmeier M, Behr M, Fischer S, Hoffmann, L. Efficiency of different strategies for the control of grey mold on grapes including gibberellic acid (Gibb3), leaf removal and/or botrycide treatments. J Int Sci Vigne Vin. 2010; 44:151-159.

Faretra F, Pollastro S. Isolation, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycol Res.* 1993; 97:620–624.

Fedele G, Brischetto C, Rossi V. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grape berries as influenced by temperature and humidity. *Front Plant Sci.* 2020; 11:1232.

Fekete E, Irinyi L, Karaffa L, Arnyasi M, Asadollahi M, Sandor E. Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. *Microbiol Res.* 2012; 167(5):283–291.

Fernández-Ortuño D, Bryson PK, Grabke A, Schnabel G. First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from a strawberry field in Virginia. *Plant Dis.* 2013; 97:848.

Fernández-Ortuño D, Grabke A, Bryson PK, Beasley ED, Fall LA, Brannen PM, *et al.* First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from a blackberry field in Georgia. *Plant Dis.* 2014a; 98:848.

Fernández-Ortuño D, Grabke A, Bryson PK, Rouse RJ, Rollins P, Schnabel G. First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold, from strawberry fields in Maryland and South Carolina. *Plant Dis.* 2014b; 98:692.

Fernández-Ortuño D, Grabke A, Li X, Schnabel G. Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 2015; 105:424-432.

Fillinger S, Ajouz S, Nicot PC, Leroux P, Bardin M. Functional and structural comparison of pyrrolnitrin and iprodione induced modifications in the class III histidine-kinase Bos1 of *Botrytis cinerea*. *Plos One.* 2012; 7:42520.

Fournier E, Giraud T, Albertini C, Brygoo Y. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia.* 2005; 97:1251–1267.

Fournier E, Levis C, Fortini D, Leroux P, Giraud T, Brygoo Y. Characterization of Bc-*hch*, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* *het-c* vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia*. 2003; 95(2):251–261.

FRAC. Resistance management recommendations and proposals for fungicides not included in current working groups. 2020. Disponible en: [https://www.frac.info/docs/default-source/modes-of-action-without-recommendations-by-frac/group-12-\(e2\)---phenylpyrrole-\(fludioxonil\)-recommendations-22nd-of-july-2020.pdf?sfvrsn=e3a1499a_2](https://www.frac.info/docs/default-source/modes-of-action-without-recommendations-by-frac/group-12-(e2)---phenylpyrrole-(fludioxonil)-recommendations-22nd-of-july-2020.pdf?sfvrsn=e3a1499a_2). [Citado en julio 2022].

FRAC. FRAC Code List © 2022: Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). 2022. Disponible en: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a_2. [Citado en julio 2022].

Fujimura M, Ochiai N, Oshima M, Motoyama T, Ichiishi A, Usami R, *et al.* Putative homologs of SSK22 MAPKK kinase and PBS2 MAPK kinase of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by *os-4* and *os-5* genes for osmotic sensitivity and fungicide resistance in *Neurospora crassa*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003; 67:186–191.

Furukawa K, Randhawa A, Kaur H, Mondal AK, Hohmann S. Fungal fludioxonil sensitivity is diminished by a constitutively active form of the group III histidine kinase. *FEBS Lett*. 2012; 586:2417–2422.

Gaëlle S, Christian M, Christophe C. Physiological stress responses of *Vitis vinifera* L. to the fungicides fludioxonil and pyrimethanil. *Pestic Biochem Phys*. 2003; 77(3):125-137.

Garrett RH, Grisham CM. *Biochemistry*. 4th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning; 2010.

Gehmann K, Nyfeler R, Leadbeater AJ, Nevill D, Sozzi D. A new phenylpyrrole fungicide for broad-spectrum disease control. *British Crop Protection Conference Pests Disease*. 1990; 2:369-376.

George AB, Thomas V, Olga K, George SK. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Manag Sci*. 2010; 66:967–973.

Giraud T, Fortini D, Levis C, Lamarque C, Leroux P, LoBuglio K, *et al*. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatric on numerous host plants. *Phytopathology*. 1999; 89:976-973.

Giraud T, Fortini D, Levis C, Leroux P, Brygoo Y. RFLP Markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Mol Biol Evol*. 1997; 14(11):1177-1185.

Gong C, Qin Y, Qu J, Wang X. Resistance detection and mechanism of strawberry *Botrytis cinerea* to fludioxonil in Sichuan province. *Sci Agric Sin*. 2018; 51:4277–4287.

González-Domínguez E, Caffi T, Ciliberti N, Rossi V. A mechanistic model of *Botrytis cinerea* on grapevines that includes weather, vine growth stage, and the main infection pathways. *PLoS One*. 2015; 10:e0140444.

González-Domínguez E, Fedele G, Languasco L, Rossi, V. Interactions among fungicides applied at different timings for the control of *Botrytis* bunch rot in grapevine. *Crop Prot*. 2019; 120:30-33.

Grabke A, Fernández-Ortuño D, Amiri A, Li X, Peres NA, Smith P, *et al*. Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology*. 2014; 104:396–402.

Hahn M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *J Chem Biol.* 2014; 7:133–141.

Hanni E, Lardschneider E, Kelderer, M. Alternatives to the use of gibberellins for bunch thinning and bunch compactness reduction on grapevine. *Acta Hortic.* 2013; 978:335-345.

Hao Y, Cao X, Ma C, Zhang Z, Zhao N, Ali A, *et al.* Potential applications and antifungal activities of engineered nanomaterials against gray mold disease agent *Botrytis cinerea* on rose petals. *Front Plant Sci.* 2017; 8:1332.

Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol.* 2004; 11(10):918-926.

Hohman S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 62:300-372.

Holtz G, Gütschow M, Coertze S. Occurrence of *B. cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunch grape. *Plant Dis.* 2003; 87(4):351-358.

Howell CR, Stipanovic RD. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology.* 1979; 69:480–482.

Hu M, Cosseboom S, Schnabel G. atrB-Associated Fludioxonil Resistance in *Botrytis fragariae* Not Linked to Mutations in Transcription Factor Mrr1. *Phytopathology.* 2019; 109:839-846.

Jersch S, Scherer C, Huth G, Schlosser E. Proanthocyanidins as basis for quiescence of *Botrytis cinerea* in immature strawberry fruits. *J Plant Dis Prot.* 1989; 96:365-378.

Jespers ABK, Davidse LC, de Waard MA. Biochemical effects of the phenylpyrrole fungicide fenpiclonil in *Fusarium sulphureum* (Schlecht). *Pestic Biochem Physiol.* 1993; 45:116–129.

Jespers ABK, De Waard MA. Effect of fenpiclonil on phosphorylation of glucose in *Fusarium sulphureum*. Pestic Sci. 1995; 44:167–175.

Jiang JH, Ding LS, Michailides TJ, Li HY, Ma ZH. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Pestic Biochem Physiol. 2009; 93:72–76.

Keller M, Viret O, Cole M. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. Phytopathology. 2003; 93(3):316-322.

Kilani J, Fillinger S. Phenylpyrroles: 30 years, two molecules and (nearly) no resistance. Front Microbiol. 2016; 7:1-10.

Koo DH, Jugulam M, Putta K, Cuvaca IB, Peterson D, Currie RS, *et al.* Gene duplication and aneuploidy trigger rapid evolution of herbicide resistance in common waterhemp. Plant Physiol. 2018; 176:1932-1938.

Kretschmer M. Emergence of multi-drug resistance in fungal pathogens: a potential threat to fungicide performance in agriculture. In: TS Thind (ed) Fungicide resistance in crop protection: risk and management. CABI, Oxfordshire. 2012; 251-267.

Kretschmer M, Hahn M. Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. J Plant Dis Prot. 2008; 115(5):214–219.

Kretschmer M, Leroch M, Mosbach A, Walker AS, Fillinger S, Mernke D, *et al.* Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in the field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. PLoS Pathog. 2009; 5:e1000696.

Kuroyanagi T, Bulasag AS, Fukushima K, Ashida A, Suzuki T, Tanaka A, *et al.* *Botrytis cinerea* identifies host plants via the recognition of antifungal capsidiol to induce expression of a specific detoxification gene. PNAS Nexus. 2022; 1:1–12.

Latorre, B. Manejo de *Botrytis cinerea* en uva de mesa. Revista Frutícola. 1986; 7(3):75-83.

Latorre BA, Elfar K, Ferrada EE. Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. Cien Inv Agr. 2015; 42(3):305-330.

Latorre B, Rioja M. Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. Cienc Inv Agr. 2002; 29(2):67-72.

Latorre BA, Torres R. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. Crop Prot. 2012; 40:49–52.

Lawry S, Tebbets B, Kean I, Stewart D, Hetelle J, Klein B. Fludioxonil induces a fungal group III hybrid histidine kinase, to dephosphorylate its downstream target, Ypd1. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61:e01414-16.

Leadbitter NJ, Nyfeler R, Elmsheuser H. The phenylpyrroles: the history of their development at Ciba, in Proceedings of a Symposium held at the University of Kent, Canterbury. 1994; 129–134.

Lennox CL, Spotts RA. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. Plant Dis. 2003; 87:645-649.

Leroch M, Plesken C, Weber RWS, Kauff F, Scalliet G, Hahn M. Gray mold populations in German strawberry fields show multiple fungicide resistance and are dominated by a novel clade close to *Botrytis cinerea*. Appl Environ Microbiol. 2013; 79:159-167.

Leroux P. Recent developments in the mode of action of fungicides. Pestic Sci. 1996; 47:191–197.

Leroux P. Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., (eds). Botrytis: biology, pathology and control. Dordrecht, the Netherlands: Kuwer academic publishers. 2004; 195-222.

Leroux P. Chemical Control of Botrytis and Its Resistance to Chemical Fungicides. In: Elad, Y., P. Williamson, and N. Delen (eds). Botrytis: Biology, Pathology and Control. The Netherlands Springer. 2007; 195-223.

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

Leroux P, Clerjeau, M. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berl. and de Toni) to fungicides in French vineyards. Crop Prot. 1985; 4:137–160.

Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Lanen C, Bach J, *et al.* Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. Pest Manag Sci. 2002; 58:876–888.

Leroux P, Gredt M. Étude *in vitro* de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fungicides anilinopyrimidines. Agronomie. 1995; 15:367–370.

Leroux P, Lanen C, Fritz R. Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale*. Pestic Sci. 1992; 36:255–261.

Leroux P, Walker A. Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance. Eur J Plant Pathol. 2013; 135(4):683-693.

Levis C, Fortini D, Brygoo Y. *Flipper*, a mobile *Fot1*-like transposable element in *Botrytis cinerea*. Mol Gen Genet. 1997; 254:674-680.

Lew R. Turgor and net ion flux responses to activation of the osmotic MAP kinase cascade by fludioxonil in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 2010; 47:721–726.

Lewis KA, Tzilivakis J, Warner D, Green A. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum Ecol Risk Assess.* 2016; 22(4):1050-1064.

Li X, Fernández-Ortuño D, Grabke A, Schnabel G. Resistance to fludioxonil in *Botrytis cinerea* isolates from blackberry and strawberry. *Phytopathology.* 2014; 104:724–732.

Li Q, Yan LY, Tong LYF, Kong ZL, Hong WY, Li HY. Occurrence of iprodione-resistant *Botrytis cinerea* strain from strawberry in Zhejiang and possible molecular mechanism. *J. Fruit Sci.* 2007; 24:344–348.

Li X, Xiao CL. Characterization of fludioxonil-resistant and pyrimethanil-resistant phenotypes of *Penicillium expansum* from apple. *Phytopathology.* 2008; 98:427–435.

Ligorio A, Platania G, Schena L, Castiglione V, Pentimone I, Nigro F, *et al.* Control of table grape storage rots by combined applications of antagonistic yeasts, salts and natural substances. *Proceedings of the International Congress Novel approaches for the control of postharvest diseases and disorders.* Bologna, Italy. 2007; 124-128.

Liu SM, Che ZP, Chen GQ. Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. *Crop Prot.* 2016; 84:56–61.

Ma Z, Yan L, Luo Y, Michailides TJ. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pestic Biochem Physiol.* 2007; 88:300-306.

Marsico AD, Velenosi M, Perniola R, Bergamini C, Sinonin S, David-Vaizant V, *et al.* Native Vineyard Non-Saccharomyces Yeasts Used for Biological Control of *Botrytis cinerea* in Stored Table Grape. *Microorganisms*. 2021; 9:457.

Martinez F, Blancard D, Lecomte P, Levis C, Dubos B, Fermaud M. Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol*. 2003; 109(5):479–488.

Martinez F, Dubos B, Fermaud M. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* 2005; 95(6):692–700.

McClellan W, Hewitt W. Early Botrytis rot of grapes: time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. *Phytopathology*. 1973; 63:1151-1157.

Mehari ZH, Pilati S, Sonogo P, Malacarne G, Vrhovsek U, Engelen K, *et al.* Molecular analysis of the early interaction between the grapevine flower and *Botrytis cinerea* reveals that prompt activation of specific host pathways leads to fungus quiescence. *Plant Cell Environ*. 2017; 40:1409–1428.

Mernke D, Dahm S, Walker AS, Lalève A, Fillinger S, Leroch M, *et al.* Two promoter rearrangements in a drug efflux transporter gene are responsible for the appearance and spread of multi-drug resistance phenotype MDR2 in *Botrytis cinerea* isolates in French and German vineyards. *Phytopathology*. 2011; 101:1176–1183.

Miller TK, Renault S, Selitrennikoff CP. Molecular dissection of alleles of the osmotic-1 locus of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol*. 2002; 35:147–155.

Mlikota F, Smilanick JL, Mansour M, Ramming DW, Mackey BE. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grapes berries with resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 2003; 93:1263-1273.

Molitor D, Behr M, Fischer S, Hoffmann, Evers D. Timing of cluster-zone leaf removal and its impact on canopy morphology, cluster structure and bunch rot susceptibility of grapes. *J Int Sci Vigne Vin*. 2011; 45:149-159.

Motoyama T, Ohira T, Kadokura K, Ichiishi A, Fujimura M, Yamaguchi I, *et al.* An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast. *Curr Genet*. 2005; 47:298–306.

Mundy DC, Beresford RM. Susceptibility of grapes to *Botrytis cinerea* in relation to berry nitrogen and sugar concentration. *NZ Plant Prot*. 2007; 60:123-127.

Muñoz G, Hinrichsen P, Bryngoo Y, Giraud T. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycol Res*. 2002; 106(5):594-601.

Muñoz-Robredo P, Robledo P, Manríquez D, Molina R, Defilippi BG. Characterization of sugars and organic acids in commercial varieties of table grapes. *Chil J Agric Res*. 2011; 71:3.

Myresiotis CK, Karaoglanidis GS, Tzavella-Klonari K. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Dis*. 2007; 91:407–413.

Nair NG, Allen RN. Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Mycol Res*. 1993; 97:1012-1014.

Nair NG, Emmett RW, Parker FE. Some factors predisposing grape berries to infection by *Botrytis cinerea*. *New Zael J Exp Agr*. 1988; 16:257-263.

Nassr S, Barakat RM. Effect of factors on conidium germination of *Botrytis cinerea in vitro*. *Int J Plant Soil Sci*. 2013; 2(1):41-54.

Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*. 2009; 78:119-146.

Notte AM, Plaza V, Marambio-Alvarado B, Olivares-Urbina L, Poblete-Morales M, Silva-Moreno E, *et al.* Molecular identification and characterization of *Botrytis cinerea* associated to the endemic flora of semi-desert climate in Chile. *Curr Res Microb Sci.* 2021; 2:100049.

Nyfelner R, Ackermann P. Phenylpyrroles, a new class of agricultural fungicides related to the natural antibiotic pyrrolnitrin. *ACS Symp Ser.* 1992; 504:395– 404.

Odepa (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). 2021. Ficha Comercio Exterior 2020. Disponible en: <https://www.odepa.gob.cl>. [Citado en junio 2023].

Odepa (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). 2023. Ficha nacional 2023. Disponible en: <https://www.odepa.gob.cl>. [Citado en junio 2023].

O'Rourke SM, Herskowitz I, O'Shea EK. Yeast go the Whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet.* 2002; 18:405-412.

Ochiai N, Fujimura M, Motoyama T, Ichiishi A, Usami R, Horikoshi K, *et al.* Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag Sci.* 2001; 57:437–442.

Panebianco A, Castello I, Cirvilleri G, Perrone G, Epifani F, Ferrara M, *et al.* Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Prot.* 2015; 77:65-73.

Pastor E. 1980. Memoria. Período de infección y latencia de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. en *Vitis vinifera* L. cv Sultanina. Universidad de Chile. Facultad de Agronomía.

Peña A. Cambios composicionales de la baya durante el proceso de maduración y su importancia en la calidad de la uva y el vino. Grupo de Investigación Enológica (GIE). Departamento de

Agroindustria y Enología. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 2019. Disponible en: <http://www.gie.uchile.cl>. [Citado en marzo de 2021].

Pérez-Tomás R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anticancer drug treatment. *Curr Med Chem*. 2006; 13:1859-1876.

Pezet R, Viret O, Perret C, Tabacchi R. Latency of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to grey mould. *J Phytopathol*. 2003; 151:208-214.

Pillonel C, Knauf-Beiter G, Steinemann A. Fungicides, phenylpyrroles, encyclopedia of agrochemicals. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.; 2003.

Pillonel C, Meyer T. Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pestic Sci*. 1997; 49:229–236.

Porquier A, Tisserant C, Salinas F, Glassl C, Wange L, Enard W, *et al*. Retrotransposons as pathogenicity factors of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Genome Biol*. 2021; 22(1):225.

Qiu J, Yu M, Yin Q, Xu J, Shi J. Molecular characterization, fitness, and mycotoxin production of *Fusarium asiaticum* strains resistant to fludioxonil. *Plant Dis*. 2018; 102:1759–1765.

Ramírez D, Caballero J. Is it reliable to take the molecular docking top scoring position as the best solution without considering available structural data?. *Molecules*. 2018; 23:1038.

Raposo R, Gomez T, Melgarejo P. Survival of *Botrytis cinerea* in Southeastern Spanish greenhouses. *Eur J Plant Pathol*. 2001; 107:229-236.

Ren W, Liu N, Yang Y, Yang Q, Chen C, Gao Q. The sensor proteins BcSho1 and BcSln1 are involved in, though not essential to, vegetative differentiation, pathogenicity and osmotic stress tolerance in *Botrytis cinerea*. *Front Microbiol.* 2019; 10:328.

Ren W, Shao W, Han X, Zhou M, Chen C. Molecular and biochemical characterization of laboratory and field mutants of *Botrytis cinerea* resistant to fludioxonil. *Plant Dis.* 2016; 100:1414–1423.

Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10(3):218-227.

Rosslenbroich HJ, Stuebler D. *Botrytis cinerea*—History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Prot.* 2000; 19:557–561.

Rupp S, Weber RWS, Rieger D, Detzel P, Hahn M. Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Front Microbiol.* 2017; 7:2075.

Samaras A, Ntasiou P, Myresiotis C, Karaoglanidis G. Multidrug resistance of *Penicillium expansum* to fungicides: Whole transcriptome analysis of MDR strains reveals overexpression of efflux transporter genes. *Int J Food Microbiol.* 2020; 335:108896.

Samuel S, Veloukas T, Papavasileiou A, Karaoglanidis GS. Differences in frequency of transposable elements presence in *Botrytis cinerea* populations from several hosts in Greece. *Plant Dis.* 2012; 96(9):1286–1290.

Sandergren L, Andersson DI. Bacterial gene amplification: Implications for the evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7:578-588.

Sang H, Popko JT, Chang T, Jung G. Genetics and resistance molecular mechanisms involved in qualitative and quantitative resistance to the dicarboximide fungicide iprodione in *Sclerotinia homoeocarpa* field isolates. *Phytopathology.* 2017; 107:198–207.

Sang C, Ren W, Wang J, Xu H, Zhang Z, Zhou M, *et al.* Detection and fitness comparison of target-based highly fludioxonil-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from strawberry and cucumber in China. *Pestic Biochem Physiol.* 2018; 147:110–118.

Schoonbeek H, Del Sorbo G, De Waard MA. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001; 14:562–571.

Schoonbeek H, Raaijmakers JM, De Waard MA. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Mol Plant Microbe Interact.* 2002; 15:1165–1172.

Schoonbeek H, Van Nistelrooy J, Waard MA. Functional analysis of ABC transporter genes from *Botrytis cinerea* identifies BcatrB as a transporter of eugenol. *Eur J Plant Pathol.* 2003; 109:1003–1011.

Schrufer S, Pschibul A, Wah Wong S, Sae-Ong T, Wolf T, Schäuble S, *et al.* Distinct transcriptional responses to fludioxonil in *Aspergillus fumigatus* and its Δ tcsC and Δ skn7 mutants reveal a crucial role for Skn7 in the cell wall reorganizations triggered by this antifungal. *BMC Genomics.* 2023; 24:684.

Schumacher MM, Enderlin CS, Selitrennikoff CP. The osmotic-1 locus of *Neurospora crassa* encodes a putative histidine kinase similar to osmosensors of bacteria and yeast. *Curr Microbiol.* 1997; 34:340–347.

Soares F, Pimentel D, Erban A, Neves C, Reis P, Pereira M, *et al.* Virulence-related metabolism is activated in *Botrytis cinerea* mostly in the interaction with tolerant green grapes that remain largely unaffected in contrast with susceptible green grapes. *Hortic Res.* 2022; 9: uhac217.

Sonker N, Pandey AK, Singh P. Strategies to control post-harvest diseases of table grape: a review. *J Wine Res.* 2016; 27:105–122.

Stapleton JJ, Grant RS. Leaf removal for nonchemical control of the summer bunch rot complex of wine grapes in the San Joaquin valley. *Plant Dis.* 1992; 76:205-208.

Stergiopoulos I, Suviers L, De Waard M. Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP binding cassette and major facilitator superfamily. *Eur J Plant Pathol.* 2002; 108:719-734.

Sun HY, Wang HC, Chen Y, Li HX, Chen CJ, Zhou MG. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. *Plant Dis.* 2010; 94:551–556.

Tanovic B, Delibasic G, Milivojevic J, Nikolic M. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. *Arch Biol Sci.* 2009; 61.

Tanovic B, Hrustic J, Mihajlovic M, Grahovac M, Delibasic G. *Botrytis cinerea* in raspberry in Serbia II: Growth rate and virulence of isolates. *Pestic Fitomed.* 2015; 30:9–16.

Tardaguila J, Blanco JA, Poni S, Diago P. Mechanical yield regulation in winegrapes: comparison of early defoliation and crop thinning. *Aust J Grape Wine Res.* 2012; 18:344-352.

Toffolatti SL, Bezza D, Bianco PA, Massi F, Marcianò D, Maddalena G. Characterization of fungicide sensitivity profiles of *Botrytis cinerea* populations sampled in Lombardy (northern Italy) and implications for resistance management. *Pest Manag Sci.* 2020; 76:2198–2207.

Torres A. Manual del cultivo de Uva de Mesa: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 383. Santiago, Chile. 2017. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6714>. [Citado en marzo 2021].

Tziros GT, Ainalidou A, Samaras A, Kollaros M, Karamanoli K, Menkissoglu-Spiroudi U, *et al.* Differences in defence-related gene expression and metabolite accumulation reveal insights

into the resistance of Greek grape wine cultivars to *Botrytis* bunch rot. *OENO One*. 2022; 56-2:5451.

Vercesi A, Toffolatti SL, Venturini G, Campia P, Scagnelli S. Characterization of *Botrytis cinerea* populations associated with treated and untreated cv. Moscato vineyards. *Phytopathol Mediterr*. 2014; 53:108–123.

Viaud M, Fillinger S, Lui W, Polepalli JS, Le Pêcheur P, Kunduru AR, *et al*. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2006; 19:1042-1050.

Vignutelli A, Hilber-Bodmer M, Hilber U. Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycol Res*. 2002; 106(3):329–335.

Walker AS, Gautier AL, Confais J, Martinho D, Viaud M, Le PCP, *et al*. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 2011; 101(12):1433–1445.

Walker AS, Leroux P. Management of resistance in grapevine gray mold in France. In “Fungicide Resistance in Plant Pathogens – Principles and a Guide to Practical Management”. Ed. H. Ishii & D. W. Hollomon. Springer; 2015.

Walker AS, Mercier A, Cuel M, Pradier JM, Simon A, Viaud M. Population structure and host specialization in *Botrytis cinerea*. XVII International Botrytis Symposium, Santa Cruz, Chile. 2016.

Walker AS, Micoud A, Florent Rémuson F, Grosman J, Gredta M, Leroux P. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (gray mold). *Pest Manag Sci*. 2013; 69:667–678.

Wang W, Fang Y, Imran M, Hu Z, Zhang S, Huang Z, *et al.* Characterization of the field fludioxonil resistance and its molecular basis in *Botrytis cinerea* from Shanghai province in China. *Microorganisms*. 2021; 9:266.

Wessels B, Linde C, Fourie P, Mostert L. Genetic population structure and fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in pear orchards in the Western Cape of South Africa. *Plant Pathol*. 2016; 65.

Wilcox WF, Gubler WD, Uyemoto JK. *Compendium of grape diseases, disorders, and pests*. St. Paul, MN: APS Press; 2015.

Yan L, Yang Q, Jiang J, Michailides J, Ma M. Involvement of a putative response regulator Brrg-1 in the regulation of sporulation, sensitivity to fungicides, and osmotic stress in *Botrytis cinerea*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 90:215–226.

Yang Q, Yan L, Gu G, Ma Z. The mitogen-activated protein kinase kinase kinase BcOs4 is required for vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012; 96:481–492.

Yarden O, Katan T. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 1993; 83:1478–148.

Yin W, Adnan M, Shang Y, Lin Y, Luo C. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from nectarine/cherry in China to six fungicides and characterization of resistant isolates. *Plant Dis*. 2018; 102:2578-2585.

Yourman LF, Jeffers SN. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Dis*. 1999; 83:569-575.

Youssef K, Roberto SR, Chiarotti F, Koyama R, Hussain I, de Souza RT. Control of Botrytis mold of the new seedless grape 'BRS Vitoria' during cold storage. *Sci. Hortic.* 2015; 193:316–321.

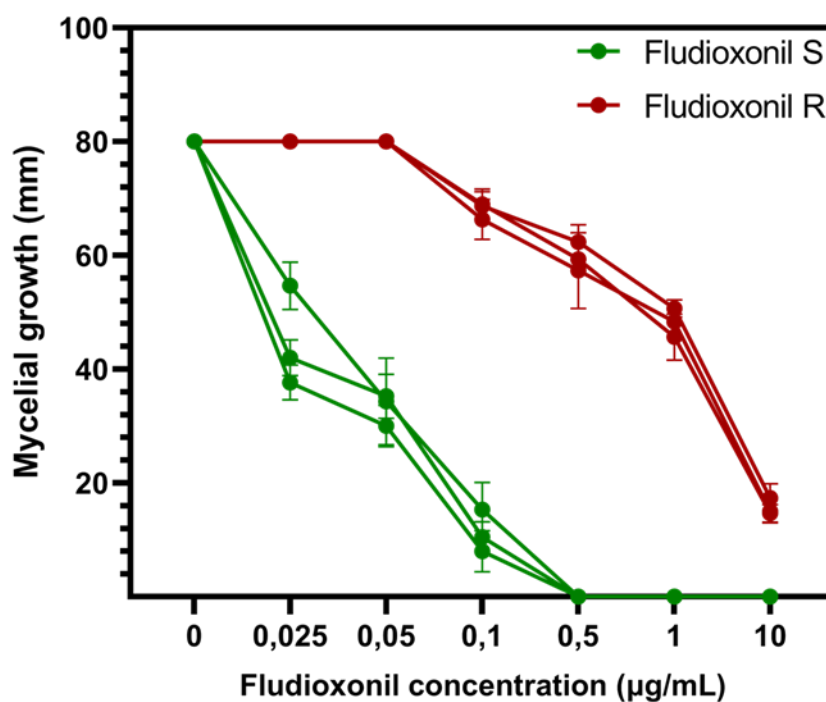
Zhang Y, Lamm R, Pillonel C, Lam S, Xu JR. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa os-2* gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:532–538.

Zhao H, Kim YK, Huang L, Xiao CL. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biol Technol.* 2010; 56:12-18.

Zhou F, Hu HY, Song YL, Gao YQ, Liu QL, Song PW, *et al.* Biological characteristics and molecular mechanism of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from Henan Province of China. *Plant Dis.* 2020; 104:1041–1047.

Zoecklein BW, Wolf TK, Duncan NW, Judge JM, Cook MK. Effects of fruit zone leaf removal on yield, fruit composition, and fruit rot incidence of Chardonnay and white Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes. *Am J Enol Vitic.* 1992; 43:139-148.

MATERIAL SUPLEMENTARIO



Supplemental Figure 1. Mycelial growth of *Botrytis* isolates subjected to different concentrations of fludioxonil. The graph shows the mycelial growth of three representative isolates sensitive to fludioxonil (green lines) and three isolates presenting loss of sensitivity to fludioxonil (red lines). The concentrations of fludioxonil correspond to those used to calculate the EC₅₀ value.

ANEXOS

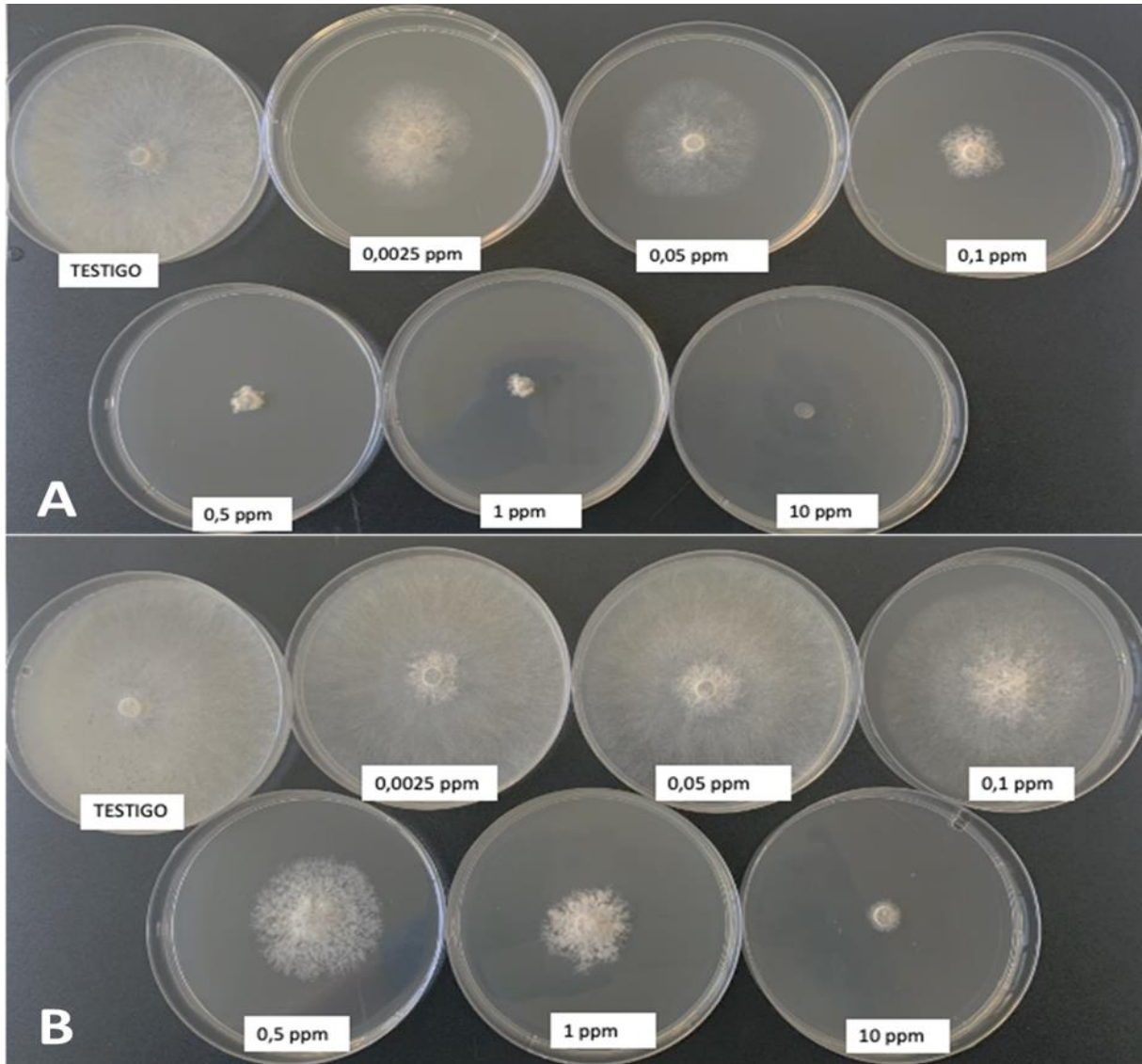


Figura 1. Comportamiento *in vitro* asociado a pruebas de sensibilidad de crecimiento miceliar. A) Aislado sensible a fludioxonil. B) Aislado con pérdida de sensibilidad a fludioxonil.

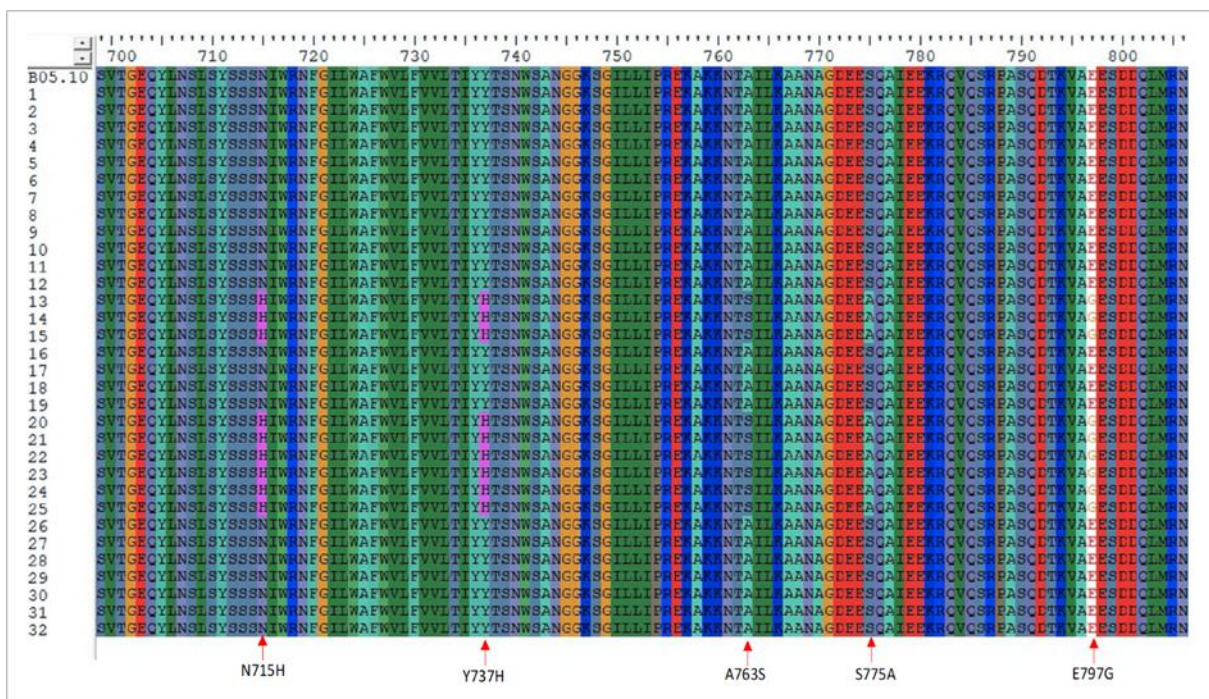


Figura 2. Alineamiento realizado para la identificación de mutaciones en la secuencia aminoacídica de la proteína BcatrB de los 32 aislados de *Botrytis cinerea* utilizados en el estudio. Mutación N715H: cambio de asparagina por histidina en la posición 715; mutación Y737H: cambio de tirosina por histidina en la posición 737; mutación A763S: cambio de alanina por serina en la posición 763; mutación S775A: cambio de serina por alanina en la posición 775; mutación E797G: cambio de ácido glutámico por glicina en la posición 797.

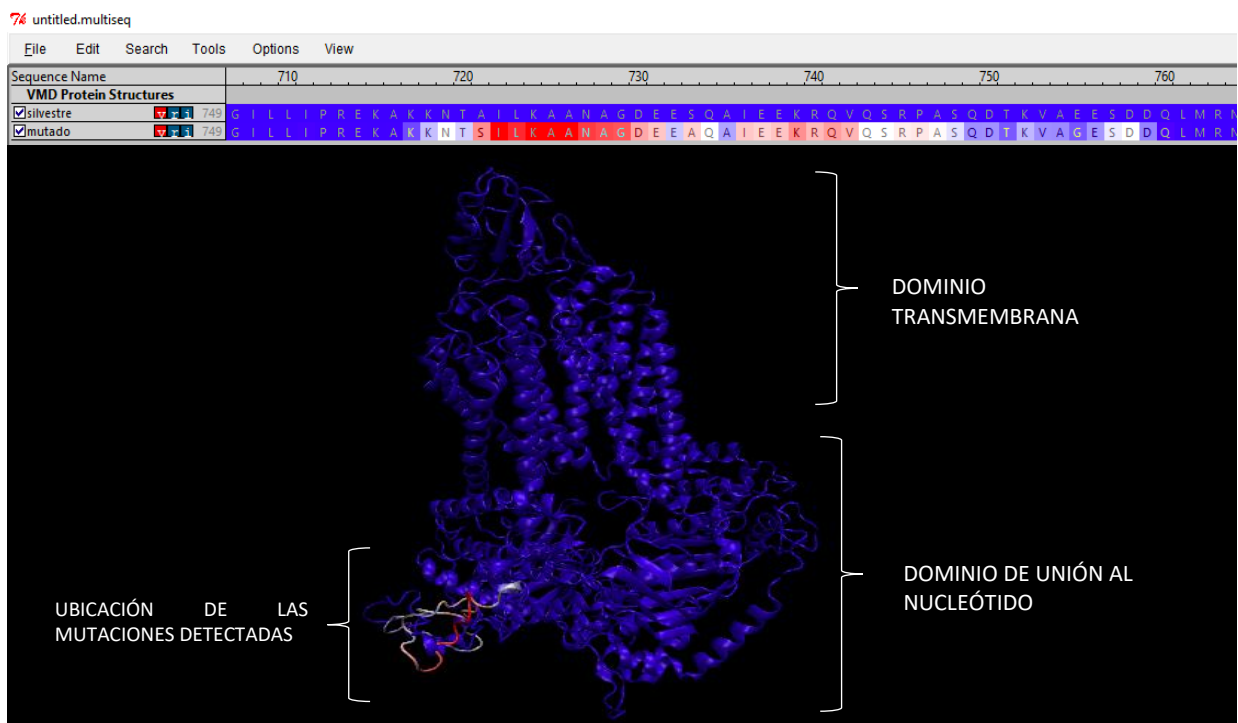


Figura 3. Alineamiento estructural de la proteína BcatrB entre aislados de *Botrytis cinerea* sensibles y con pérdida de sensibilidad a fludioxonil.

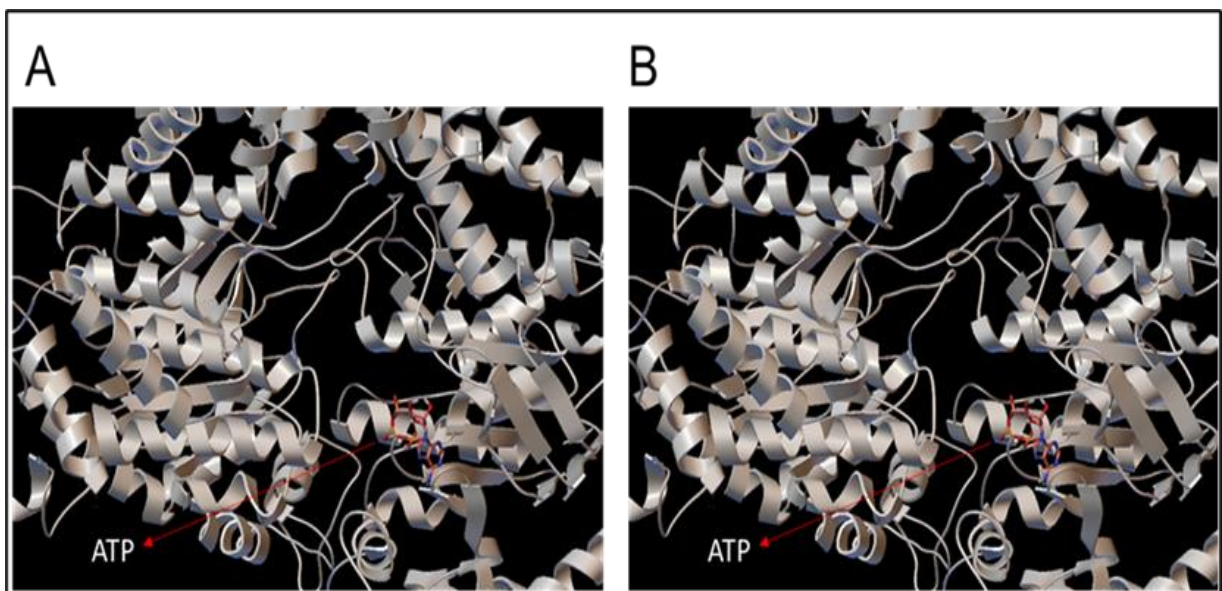


Figura 4. Acoplamiento molecular realizado entre la proteína BcatrB y la molécula de ATP. A: Proteína silvestre-ATP B: Proteína mutada-ATP.