

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

AISLADOS CHILENOS DE *BOTRYTIS CINEREA* RESISTENTES A
IPRODIONE: NIVELES DE VIRULENCIA Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN
bos1

MARÍA JOSÉ ARANEDA RUBIO

SANTIAGO – CHILE
2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**AISLADOS CHILENOS DE *BOTRYTIS CINEREA* RESISTENTES A IPRODIONE:
NIVELES DE VIRULENCIA Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *bos1***

**CHILEAN *BOTRYTIS CINEREA* IPRODIONE RESISTANT ISOLATES:
VIRULENCE LEVELS AND GENE *bos1* CHARACTERIZATION**

MARÍA JOSÉ ARANEDA RUBIO

Santiago, Chile
2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**AISLADOS CHILENOS DE *BOTRYTIS CINEREA* RESISTENTES A IPRODIONE:
NIVELES DE VIRULENCIA Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *bos1***

Memoria para optar al título profesional de
Ingeniero Agrónomo

MARÍA JOSÉ ARANEDA RUBIO

	Calificaciones
PROFESORES GUÍA	
Sra Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	7,0
Sr Jaime Auger S. Ingeniero Agrónomo, M. S Ph. D	7,0
PROFESORES EVALUADORES:	
Sr Nicola Fiore C. Ingeniero Agrónomo Dr. Cs.	6,0
Profesores Evaluadores Sr Marcos Mora G. Ingeniero Agrónomo Dr.	7,0

Santiago, Chile
2011

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Hipotesis	7
Objetivos	7
Materiales y método	8
Lugar de estudio	8
Origen de los aislados	8
Medios de cultivo	10
Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	10
Pruebas de virulencia	10
Caracterización genética	11
Extracción de ADN	11
Amplificación del gen <i>bos1</i>	11
Electroforesis	12
Purificación de ADN	12
Secuenciación del ADN de los aislados	13
Análisis estadístico	13
Resultados y discusión	14
Sensibilidad a iprodione	14
Pruebas de virulencia plántulas de pepino	16
Pruebas de virulencia bayas 7° Brix	17
Pruebas de virulencia bayas 14° Brix	18
Pruebas de virulencia bayas 17° Brix	19
Caracterización genética	20
Conclusiones	26
Bibliografía	27

*“Existe una fuerza motriz
más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía
atómica: la voluntad”*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Iris y Nicolás, por los valores que me han entregado, por sus infinitas muestras de amor y perseverancia que me han llevado a terminar esta etapa de mi vida.

A Juan Pablo “mi equipo”, por su incondicional apoyo e incentivo para seguir adelante, por estar siempre junto a mí con paciencia y amor.

A mis hermanos y mi familia entera por todo el cariño que me dan.

A mis profesores guías Marcela Esterio y Jaime Auger, por las herramientas y valiosos conocimientos e incalculables aportes a mi formación profesional.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular, por la ayuda y compañía en especial a Cecilia Ramos por su amistad y los aportes desinteresados de conocimientos para la realización de este estudio.

A mis amigas “las niñas” por hacer de mi vida en Antumapu una etapa inolvidable y maravillosa.

Sinceramente, a todos quienes me apoyaron y ayudaron en esta etapa.

RESUMEN

Con el fin de evaluar la virulencia y características genéticas de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* con distinta sensibilidad a iprodione, se seleccionaron nueve aislados altamente resistentes (EC_{50} : 1,35 – 2,47 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y cuatro aislados sensibles (EC_{50} : 0,26 – 0,31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

La virulencia se evaluó en plántulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) mediante inoculación de discos de agar con micelio del hongo de tres días de edad y en bayas de vid (*Vitis vinífera L.*) Thompson Seedless con distinto grado de madurez (7°, 14° y 17° Brix), mediante inoculación de una suspensión conidial (equivalente a $2\cdot 10^5$ conidias $\cdot\text{mL}^{-1}$). Posterior a la inoculación las plántulas de pepino se mantuvieron a 20-25°C y 100% de humedad relativa y las bayas de vid en cámaras de crecimiento a 20°C. La evaluación se realizó mediante medición del diámetro de la lesión en la zona de inoculación luego de 96 y 72 horas en hojas de pepino y bayas de vid, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un ANDEVA simple y en las dos pruebas de virulencia realizadas los aislados de *Botrytis cinerea* resistentes y sensibles presentaron niveles de agresividad similares.

La caracterización genética de los aislados se realizó amplificando mediante PCR el gen *bos1* asociado a resistencia de *Botrytis cinerea* a dicarboximidas, utilizando 5 pares de partidores específicos. Posteriormente los productos de PCR purificados fueron secuenciados por Macrogen USA Corp.

El análisis de las secuencias nucleotídicas de los nueve aislados resistentes detectó un cambio aminoacídico en la posición T1259A de la proteína. En ocho de éstos fueron detectadas las mutaciones I365N y R104Q y en el aislado restante un cambio en la posición I365S y una sustitución en la posición L849V. Esta última sustitución no ha sido descrita previamente desconociéndose su implicancia en el nivel de resistencia. En ninguno de los cuatro aislados sensibles secuenciados, el gen *bos1* presentó mutaciones asociadas a resistencia a dicarboximidas.

Palabras clave: dicarboximidas, histidina-quinasa, mutaciones, patogenicidad, secuenciación

ABSTRACT

In order to evaluate the virulence and genetic characteristics to Chilean isolates *Botrytis cinerea* of with different sensitivity to iprodione, were selected nine highly resistant isolates (EC_{50} : 1, 35 to $2.47 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and four susceptible isolates (EC_{50} : 0.26 to $0.31 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

The virulence was evaluated inoculating cucumber seedlings (*Cucumis sativus* L.) with three days old *Botrytis cinerea* mycelium and different ripe (7 °, 14 ° 17 ° Brix) Thompson Seedless grape berries (*Vitis vinifera* L.) with a conidial suspension ($2\cdot 10^5$ conidia $\cdot\text{mL}^{-1}$).

Cucumber seedlings were kept at 20-25°C and relative humidity 100% and grape berries in growth chambers at 20°C. The evaluation was done measuring the lesion diameter after 96 and 72 hours in cucumber leaves and grape berries, respectively. The results were subjected to a simple ANOVA and in both virulence tests carried out, the sensitive and resistant *Botrytis cinerea* isolates showed similar levels of aggressiveness.

The genetic characterization was performed by PCR amplification of the dicarboximide resistance associated *Botrytis cinerea bos1* gene, by means of five specific primers. The purified PCR product was sequenced by Macrogen USA Corp.

By means of sequences analysis the *bos1* gene nucleotide, in all the nine resistant isolates was detected an amino acid change at the T1259A protein position. The I365N and R104Q mutations were detected in eight of the isolates and in the other isolate a change in the position I365S and a substitution at position L849V. The latter substitution has not been previously detected and its implications on resistance is unknown. The *bos1* gene showed no mutations associated to the resistance to dicarboximides in any one of the four susceptible isolates sequenced

Keywords: dicarboximide, histidine kinase, mutation, pathogenicity, sequencing.

INTRODUCCIÓN

Botrytis cinerea Pers., estado anamorfo de *Botriotynia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, agente causal de la “pudrición gris”, es un hongo patógeno de plantas de amplia distribución geográfica que causa severas pérdidas en diversos cultivos frutales, hortícolas y ornamentales. (Bulit y Dubos, 1988). Entre los frutales más afectados cabe destacar a la vid, frutillas y arándanos (Droby y Lichter, 2004). En la vid aunque todos los órganos pueden ser afectados, el mayor daño se produce sobre el racimo desde estados iniciales de su formación, en el período de floración y luego desde el envero (véraison) en adelante, coincidiendo con la disminución en las bayas de compuestos antifúngicos, tales como: ácido glicólico, taninos y fitoalexinas como el resveratrol (Pastor, 1980; Keller *et al.*, 2003).

Sin lugar a dudas la pudrición gris es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta a la vid en Chile (Auger y Esterio 1997). Es un patógeno de difícil control porque posee variados modos de ataque, diversos hospederos como fuentes de inóculo y puede sobrevivir como micelio y/o conidias, o por extensos periodos como esclerocios en restos de poda. (Williamson *et al.*, 2007); los esclerocios pueden sobrevivir durante varios años sobre brotes, sarmientos, peciolo y restos de racimos que quedan después de la cosecha (Auger y Esterio 1997).

El manejo de la enfermedad involucra tanto prácticas culturales como control químico, siendo este último la principal forma de reducir la incidencia de la enfermedad en la mayoría de los cultivos. La práctica más común consiste en asperjar la parte aérea de las plantas con fungicidas. (Gullino and Kuijpers 1994).

Los fungicidas son esenciales para el mantenimiento sano, confiable y de alta calidad de los productos agrícolas. Antes de 1970 casi todos los fungicidas utilizados para el control de fitopatógenos correspondían a inhibidores multi-sitio. A pesar de su uso generalizado, la resistencia a estos compuestos fue escasa. Sin embargo, desde la introducción de los fungicidas sitio-específico a finales de la década del 60, la resistencia a fungicidas en hongos fitopatógenos se ha convertido en un importante problema (Brent and Whollomon, 1995).

La resistencia a un fungicida corresponde a una modificación genética estable y heredable de un patógeno, otorgándole una menor sensibilidad frente a una molécula fungicida determinada (Leroux *et al.*, 1999).

Los fungicidas pertenecientes a la familia dicarboximida (procimidone, sumisclex e iprodione), se han utilizado intensamente por más de dos décadas en el control de hongos fitopatógenos y presentan efectividad en el control de diversos hongos entre los que se incluye a *B. cinerea* (Brent and Whollomon, 1995); sin embargo, el rápido desarrollo de

individuos resistentes de *B. cinerea* a este grupo de fungicidas ha afectado su efectividad en muchos países (Leroux *et al.*, 2002).

El desarrollo de resistencia a fungicidas de muchos patógenos, entre estos *B. cinerea*, puede ser explicado por el modo de acción específico que ejercen sobre el metabolismo de los hongos. La determinación de la resistencia en las poblaciones se realiza microbiológicamente. Esto involucra aislar la cepa fungosa para luego cultivarla en presencia de distintas concentraciones del fungicida, cuantificando así su nivel de resistencia. Este proceso es lento y laborioso, lo que dificulta el análisis de un gran número de muestras (Ma *et al.*, 2007).

Faretra y Pollastro (1991) identificaron niveles de resistencia a iprodione según valores EC_{50} (concentración efectiva del fungicida capaz de inhibir el crecimiento micelial del hongo en un 50%), considerándose de acuerdo a estos valores como aislados sensibles (DC^S , $EC_{50} < 2$ mg/L), levemente resistentes (DC^{LR} , EC_{50} 2-10 mg/L) y altamente resistentes (DC^{HR} , $EC_{50} > 10$ mg/L). Resultados obtenidos posteriormente por Ma *et al.* 2007, definen aún más estos valores tanto para los aislados sensibles como para los resistentes, indicando para los primeros valores EC_{50} entre 0,2 y 0,4 mg/L (D^S) y para los segundos (D^R) valores EC_{50} entre 1,12 y 2,99 mg/L, indicando además que todos los aislados resistentes presentan la capacidad de crecer sobre placas enmendadas con 5 mg/L de iprodione, en cambio, los aislados sensibles no crecen a esa concentración.

Análisis genéticos de aislados de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidas, obtenidos desde campo y en laboratorio por selección en medio de cultivo con fungicida, han demostrado que la resistencia está asociada a un único gen, el gen *DafI* (Faretra y Pollastro, 1991). De acuerdo a Cui *et al.* (2002) los genes *DafI*, *bosI* corresponden a genes homólogos, que contienen aproximadamente seis repeticiones de 90 aminoácidos seguidos por un dominio quinasa.

Las proteínas histidina quinasa de dos componentes, son sensores que median una gran cantidad de respuestas y están involucrados en varias funciones como transporte de metabolitos, quimiotaxis osmorregulación y patogenicidad (West and Stock, 2001).

Estudios recientes, han identificado mutaciones en el gen *bosI* de los aislados resistentes de *B. cinerea*. Las mutaciones detectadas en aislados resistentes provenientes de campo se han localizado en la segunda repetición de aminoácidos, en cambio, en mutantes inducidos en laboratorio las mutaciones se han presentado en la tercera, cuarta y quinta repetición de aminoácidos.

Por otro lado, al comparar las secuencias de ADN del gen *bosI* de aislados de *B. cinerea* resistentes y sensibles a dicarboximidas, en todos los aislados resistentes se ha detectado una sustitución de isoleucina por serina en la posición 365 (I365S), lo que sugiere que esta mutación estaría relacionada con la resistencia al fungicida (Leroux *et al.* 2002; Oshima *et al.*, 2002; Cui *et al.* 2004).

Cui *et al.* (2004), amplían los estudios iniciales examinando la secuencia del gen *bos1* completo en una amplia gama de aislados, comparando las secuencias de aislados resistentes a dicarboximidas (D^R) y sensibles (D^S) colectados desde distintas plantas hospederas y distintos países, distinguiendo en todos los aislados dos variantes en la posición 1259, los que presentan alanina (Grupo 1) y los que presentan treonina (Grupo2). Además determinaron que todos los aislados resistentes presentaban cambios en la segunda repetición de aminoácidos. En base a estas diferencias fueron reconocidas cuatro clases de aislados resistentes: (Clase 1) sustitución de isoleucina por serina, (Clase 2) sustitución de isoleucina por asparragina, (Clase 3) sustitución de isoleucina por arginina, ó (Clase 4) sustitución de isoleucina por serina en la posición 365 de la proteína conjuntamente con la sustitución de glutamina por prolina en la posición 369. Los aislados de todas las clases presentan niveles similares de resistencia a iprodione.

Por otra parte, se ha observado que los aislados resistentes a dicarboximidas que tienen las mutaciones en el gen histidina quinasa presentan una sensibilidad osmótica anormal, lo cual se debería a que las dicarboximidas estimulan la producción de glicerol al interior de la célula alterando la osmosensibilidad (Ochiai *et al.*, 2001).

Sin lugar a dudas la adaptabilidad de aislados de *B. cinerea* resistentes a fungicidas es un factor importante a considerar en el manejo de la enfermedad, ya que la frecuencia de aislados resistentes disminuirá en ausencia del fungicida. Por otro lado, es importante señalar que la proporción de cepas resistentes a dicarboximidas varía mucho según la época del año. (Raposo *et al.* 2000).

Los costos de adaptabilidad de la resistencia a fungicidas en *B. cinerea* han sido ampliamente comprobados (Brent y Whollomon 1995). Existen varios estudios experimentales que evalúan la relación entre adaptabilidad y resistencia a fungicidas sin embargo algunos de los resultados obtenidos son contradictorios (Raposo *et al.*1996).

La resistencia a dicarboximidas en aislados de *B. cinerea*, está determinada por una reducción del radio de crecimiento de la lesión y el nivel de esporulación, pero existen otros estudios en donde no se han detectado diferencias fenotípicas entre aislados resistentes y sensibles a dicarboximidas (Moorman and Lease, 1992). Al respecto Peever y Milgroom (1994) señalan que estas contradicciones se deberían a que los estudios realizados involucran una pequeña cantidad de aislados probablemente provenientes de poblaciones diferentes, por lo tanto, las diferencias entre aislados de distinto nivel de sensibilidad se deberían a diferencias en el historial genético más que a costos de adaptabilidad, ya que el nivel de patogenicidad y el de otros factores de adaptabilidad tienden a declinar al aumentar el grado de resistencia.

En un estudio realizado por Raposo *et al.* (2000) se indica que la diferencia en la sobrevivencia de *B. cinerea* está correlacionada con la resistencia a dicarboximidas, lo que implica que existe una correlación negativa entre los valores de EC_{50} y factores de sobrevivencia así como de virulencia, señalando que los aislados resistentes viven menos y son menos virulentos que los aislados sensibles.

Además, los resultados obtenidos indican la existencia de diferencias genéticas entre los aislados que contribuyeron a la variación en la sobrevivencia de los mismos. Otro estudio de virulencia efectuado por Ma *et al.* (2007) en plántulas de pepino determinó que el gen *bos1* está asociado con la patogenicidad en *B. cinerea*. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Viaud *et al.* (2006), quienes realizaron una caracterización fenotípica de aislados mutantes de *B. cinerea* cuyo gen *bos1* fue inactivado con el fin de evaluar la probable función en la virulencia de éste, determinándose que en ausencia del gen *bos1*, la lesión desarrollada fue significativamente menor en todos los individuos testeados, lo que indica que *bos1* es un importante gatillante de la virulencia de este hongo.

Hipótesis:

Los aislados chilenos resistentes a iprodione presentan mutaciones en el genoma del gen *bos1* que les confiere la resistencia a este fungicida.

Objetivo general:

Evaluar la virulencia de aislados de *B. cinerea* de diferentes niveles de sensibilidad a iprodione y caracterizar genéticamente los aislados sensibles y resistentes al fungicida.

Objetivos específicos:

- Verificar el nivel de sensibilidad a iprodione de los aislados seleccionados a través de pruebas *in vitro* (crecimiento miceliar).
- Determinar el grado de virulencia de aislados sensibles y resistentes a iprodione mediante pruebas de patogenicidad realizadas en plántulas de pepino y bayas de vid.
- Secuenciar el gen *bos1* de los aislados de *Botrytis cinerea* sensibles y resistentes a iprodione, con el fin de detectar las mutaciones que confieren resistencia y compararlas con las secuencias de aislados californianos de *B. cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar del estudio

Las pruebas *in vitro*, *in vivo* y moleculares se realizaron en el laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

La secuenciación del gen *bos1* se realizó en MacroGen Corp, USA.

Origen de los aislados de *B. cinerea*

Los aislados *B. cinerea* utilizados en el estudio pertenecen al cepario del Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular de la Universidad de Chile. Estos aislados provienen de la IV Región, Región Metropolitana y VI Región y corresponden a colectas realizadas entre los años 2005 y 2007, desde *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless y Crimson Seedless, desde flores o bayas. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Aislados de *B. cinerea* utilizados en este estudio.

AI SLADO Y *CATEGORÍA DE RESISTENCIA	COLECTA	% GERMINACIÓN CONIDIAL	CULTIVAR	REGIÓN	LOCALIDAD	ÓRGANO
A2-AR	2006-2007	39,5	Thompson Seedless	Región de Coquimbo	Coquimbo	Flor
LGA1-AR	2006-2007	29,3	Thompson Seedless	Región de Coquimbo	Coquimbo	Flor
SP8C-AR	2006-2007	28,0	Thompson Seedless	Región Metropolitana	San Pedro	Flor
SP8D-AR	2006-2007	40,2	Thompson Seedless	Región Metropolitana	San Pedro	Flor
SPP6-S	2006-2007	0,0	Thompson Seedless	Región Metropolitana	San Pedro	Flor
SP8A-AR	2006-2007	41,7	Thompson Seedless	Región Metropolitana	San Pedro	Flor

(Continúa)

Cuadro 1 (Continuación)

AIKLADO Y *CATEGORÍA DE RESISTENCIA	COLECTA	% GERMINACIÓN CONIDIAL	CULTIVAR	REGIÓN	LOCALIDAD	ÓRGANO
28-S	2005-2006	0,3	Crimson Seedless	Región del Lib. Gral. B. O'Higgins	Rancagua	Baya
53-S	2005-2006	0,5	Crimson Seedless	Región del Lib. Gral. B. O'Higgins	Rancagua	Baya
ANP2C-AR	2006-2007	84,5	Thompson Seedless	Región del Lib. Gral. B. O'Higgins	Olivar alto	Flor
33-AR	2005-2006	83,4	Crimson Seedless	Región del Lib. Gral. B. O'Higgins	Rancagua	Baya
67-S	2005-2006	0,0	Crimson Seedless	Región del Lib. Gral. B. O'Higgins	Rancagua	Baya
61-AR	2005-2006	57,8	Crimson Seedless	Región del Lib. Gral. B. O'Higgins	Rancagua	Baya
29-AR	2005-2006	91,6	Crimson Seedless	Región del Lib. Gral. B. O'Higgins	Rancagua	Baya

*Categoría de resistencia de acuerdo a la clasificación de Cuadro 2.

Los aislados fueron seleccionados según nivel de sensibilidad a iprodione. Este nivel fue determinado previamente de acuerdo al porcentaje de germinación conidial de cada aislado en medio enmendado con 10 mg/L de fungicida (Leroux y Gredt, 1981) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Categoría de resistencia a iprodione según germinación conidial.

% DE GERMINACIÓN CONIDIAL (10 mg i.a./ L)	NIVEL DE RESISTENCIA	CATEGORÍA
0 - 1 %	Sensible	S
1 -5 %	Leve Resistencia	LR
> 5 – 20 %	Moderada Resistencia	MR
> 20 %	Alta Resistencia	AR

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en el presente estudio fueron.

- Agar-Malta-Levadura (AML): reactivación e incremento de aislados.
- Agar-Papa-Dextrosa (APD): pruebas *in vitro* de sensibilidad a iprodione (Leroux y Gredt, 1981; Ma *et al.* 2007)
- Agar-Papa-Dextrosa (APD): incremento de inóculo para pruebas de virulencia (Viaud *et al.* 2006)
- Medio líquido a base de glucosa (10 g glucosa 1L⁻¹): obtención de biomasa de los aislados para la extracción de ADN (Bainbridge *et al.* 1990)

Pruebas de sensibilidad *in vitro*

En este estudio las cepas de *B. cinerea* fueron sometidas a pruebas de sensibilidad *in vitro* a iprodione, mediante la metodología propuesta por Leroux y Gredt, 1981, de crecimiento miceliar en medio APD (Agar-Papa-Dextrosa). Las concentraciones de iprodione utilizadas, de acuerdo al trabajo de Ma *et al.*, 2007, fueron: 0; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 y 5 mg / L, considerándose para cada aislado tres repeticiones por concentración.

Con este propósito y a partir de aislados del hongo con 3 días de crecimiento en medio APD, en cámara de cultivo a 20°C, se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro, los que fueron depositados sobre medio APD enmendado con las 7 concentraciones de iprodione indicadas anteriormente. Las placas sembradas fueron incubadas durante 5 días en oscuridad a 20°C. Las evaluaciones fueron realizadas midiendo el diámetro longitudinal de crecimiento miceliar a las distintas concentraciones del fungicida. Luego se determinó el valor EC₅₀ para cada aislado.

Se consideraron como aislados sensibles (D^S), a aquellos aislados que presentaron valores EC₅₀ menores a 0,4 mg/L. Los aislados resistentes (D^R) alcanzaron EC₅₀ de 2,99 mg/L. y además fueron capaces de crecer en medio APD enmendado con 5 mg/L de iprodione (Ma *et al.* 2007).

Pruebas de virulencia

Las pruebas de virulencia fueron realizadas en plántulas de pepino y bayas de vid Thompson Seedless, de acuerdo a la metodología descrita por Ma *et al.* (2007).

Plántulas: La producción de las plántulas de pepino fue realizada en bandejas almacigueras a partir de semilla certificada y sustrato estéril. Transcurrida una semana las plántulas fueron seleccionadas y trasplantadas a contenedores individuales, manteniéndolas en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura (20-25°C), humedad (90% HR) y luz (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad).

En total se utilizaron 8 plántulas de pepino (repeticiones) por cada uno de los 13 aislados en estudio, 9 altamente resistentes a iprodione y 4 sensibles (Cuadro 4), inoculándose las 2 primeras hojas verdaderas de cada plántula (submuestras).

El inóculo correspondió a un disco de 5mm de diámetro de AM con crecimiento de *B. cinerea* de 3 días de edad. Una vez realizada la inoculación las plantas se mantuvieron a 25°C y 100% HR.

Las mediciones de los diámetros de lesión se realizaron cada 24 horas desde la inoculación en las 2 hojas de cada plántula. La prueba se realizó 2 veces.

Bayas: Previamente a la inoculación las bayas de vid fueron lavadas, secadas y luego dispuestas en cámara húmeda. La inoculación se realizó utilizando una suspensión conidial equivalente a 200.000 conidias / mL, determinada mediante un hemacitómetro. Sobre cada baya se depositó una gota de 10 µL de la suspensión. Por cada aislado se inocularon 12 bayas de vid con 4 repeticiones.

El ensayo de inoculación en bayas fue realizado en tres oportunidades en bayas del mismo cultivar pero con distinto grado de madurez para cada aislado (7°, 14° y 17° Brix). Las mediciones del diámetro de lesión fueron realizadas luego de 72 horas desde la inoculación.

Caracterización genética

Extracción de ADN

- Obtención de biomasa: Se realizó el cultivo de los aislados seleccionados de *B. cinerea* en medio líquido a base de glucosa, obteniéndose luego de 4 a 5 días de incubación a 20°C una capa superficial de crecimiento miceliar. El material preparado fue congelado durante 24 horas a -80°C y posteriormente liofilizado y molido.
- Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo descrito por Bainbridge B. W. *et al.* (1990) modificado por Muñoz *et al.* (2002).

Amplificación del gen *bos1*

La amplificación total del gen *bos1* se realizó mediante PCR, utilizando la metodología y los partidores descritos por Ma *et al.* 2007 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Partidores utilizados para la reacción de PCR.

PARTIDOR	POSICIÓN NUCLEOTIDICA	SECUENCIA (5-3')
BF1 (promotor)	<u>115 to 95</u> (95bp después del codón de término ATG)	T A C C G A T C G A A A A A C C C A A C
BR1 (reverso)	1066-1085	T G G G C T G G T C T C T C A A T C T T
BF2 (promotor)	981-1033	C A A C G T T A T G G C A C A A A A T C T C A
BR2 (reverso)	1808-1829	A A G T T T C T G G C C A T G G T G T T C A
BF3 (promotor)	1728-1747	G G T C G G A A C T G A T G G A A C T C
BR3 (reverso)	2789-2808	C G C G G T A A G T G A G G T C T A G G
BF4 (promotor)	2694-2713	G C A A A C C G T A T G A T C A T G G A
BR4 (reverso)	3595-3614	A G C T C G A T T C T C C A A A G C A G
BF5 (promotor)	3494-3514	T C C C G T T A T T C A T G T C A G C T T
BR5 (reverso)	4482-4501 (95bp después del codón de término TAG)	A A G T A C T C G C A G T C G G T G G T

La reacción de PCR se realizó en un termociclador Swift Maxi Thermal Cycler ESCO de 96 pocillos.

Electroforesis

La detección de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y la tinción Gel Red marca Biotium, utilizándose como carga 30 μ L de producto de PCR por aislado adicionando 1 μ L de tampón de carga 6X por cada 5 μ L de producto PCR. Finalmente, los productos amplificados fueron visualizados utilizando un transiluminador de luz UV marca Vilber Lourmat (Sambrook *et al.* 1989).

Purificación de ADN

Una vez visualizado en el producto de PCR esperado, las bandas obtenidas fueron cortadas con un bisturí desde el gel de agarosa y luego depositadas en un tubo eppendorf de 1,5 mL y el ADN obtenido purificado de acuerdo al protocolo del Ultraclean 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories Inc.)

Secuenciación del ADN de los aislados

La secuenciación de ADN a partir del producto de PCR purificado, fue realizada por MACROGEN CORP USA. El alineamiento de cada secuencia del gen *bos1* fue realizada con el programa Vector NTI suite 7.

Análisis estadístico

Análisis de sensibilidad *in vitro*:

La determinación de los valores EC_{50} de crecimiento miceliar de cada aislado, se realizó mediante análisis PROBIT, utilizando el programa MINITAB V.12.

Análisis de virulencia *in vivo*:

- a) Plántulas: Consistió en un diseño completamente al azar, compuesto por 8 plántulas de pepino (repeticiones) con 2 hojas verdaderas cada una (sub muestras) por aislado de *B. cinerea*.
- b) Bayas: Fue utilizado un diseño experimental completamente al azar, considerando 12 bayas de vid de igual nivel de madurez (°Brix) y 4 repeticiones por aislado de *B. cinerea*.

Los resultados obtenidos en las evaluaciones del nivel de virulencia (diámetro de la lesión) efectuadas luego de 96 y 72 horas (hojas de plántulas de pepino y bayas de vid cv. Thompson Seedless, respectivamente) se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y en el caso de detectar diferencias se utilizó la Prueba de Comparaciones Múltiples de TUKEY con un nivel de significancia de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sensibilidad a iprodione: crecimiento miceliar

Al realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* mediante la metodología de crecimiento miceliar, se corroboró el nivel de sensibilidad de los 13 aislados, determinado previamente a este estudio mediante germinación conidial.

Los valores EC_{50} de los 9 aislados altamente resistentes fluctuaron entre 1,35 y 2,47 mg/L, siendo además capaces de crecer a 5 mg/L. Los EC_{50} de los 4 aislados sensibles fluctuaron entre 0,26 y 0,31 mg/L y no crecieron a 5 mg/L (Cuadro 4), coincidiendo con los resultados obtenidos por Ma *et al.* 2007.

Cuadro 4. Clasificación de aislados de *B. cinerea* de acuerdo al diámetro de crecimiento miceliar.

AISLADO y CGC*	% GERMINACIÓN CONIDIAL	EC_{50} IPRODIONE	CATEGORÍA CRECIMIENTO MICELIAR
33 AR	83,4	1,48	R
ANP2C AR	84,5	1,84	R
SP8D AR	40,2	2,47	R
61 AR	57,8	1,91	R
A2 AR	39,5	1,35	R
LGA1 AR	29,3	1,82	R
29 AR	91,6	1,57	R
SP8C AR	28,0	2,04	R
SP8A AR	41,7	1,97	R
67 S	0	0,29	S
SPP6 S	0	0,26	S
28 S	0,3	0,28	S
53 S	0,5	0,31	S

*CGC: Categoría de Germinación Conidial

Tanto en el caso de los análisis de germinación conidial como en los realizados en base a crecimiento miceliar (Cuadro 4), fueron coincidentes en un 100% para todos los aislados respecto al nivel de sensibilidad a iprodione.

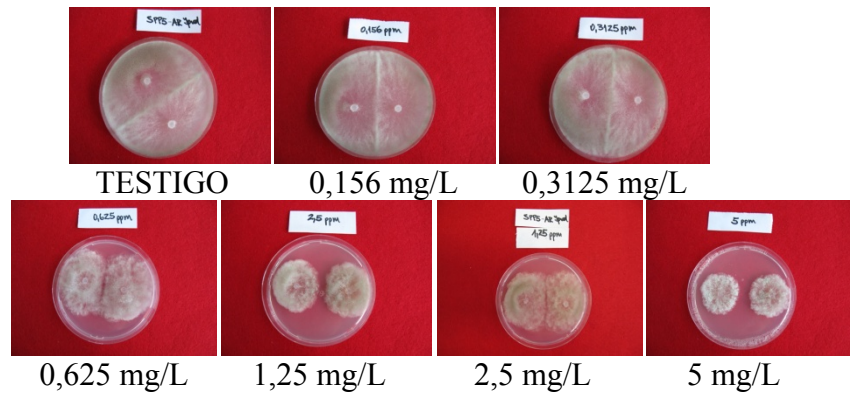


Figura 1a. Comportamiento de aislados de *B. cinerea* resistentes a iprodione.

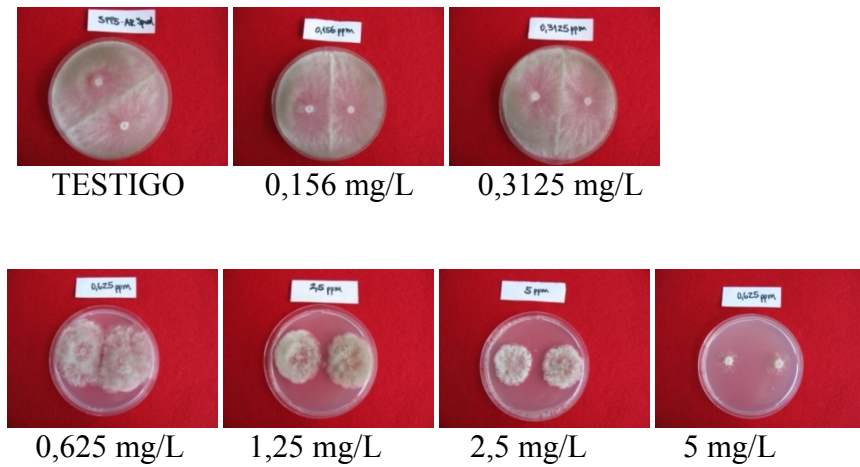


Figura 1b. Comportamiento aislados de *B. cinerea* sensibles a iprodione.

Pruebas de virulencia: Plántulas de pepino

Al inocular los aislados de diferente nivel de sensibilidad a iprodione (9 resistentes y 4 sensibles), sobre hojas de plántulas de pepino, no se obtuvo resultados que pudieran determinar diferencias entre ambos tipos de aislados, los resistentes presentaron diámetros de lesión similares a los sensibles (Figuras 2 y 3). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ma *et al* (2007), quienes no observaron diferencias en el nivel de agresividad entre aislados resistentes y sensibles en hojas de pepino, lo que indica que la virulencia de aislados de *B. cinerea* no está asociada con la resistencia a iprodione.



Figura 2. Prueba de virulencia (patogenicidad) sobre hojas primarias de plántulas de pepino, evolución de la lesión, en plántulas mantenidas en cámara a 25°C y 100% HR.

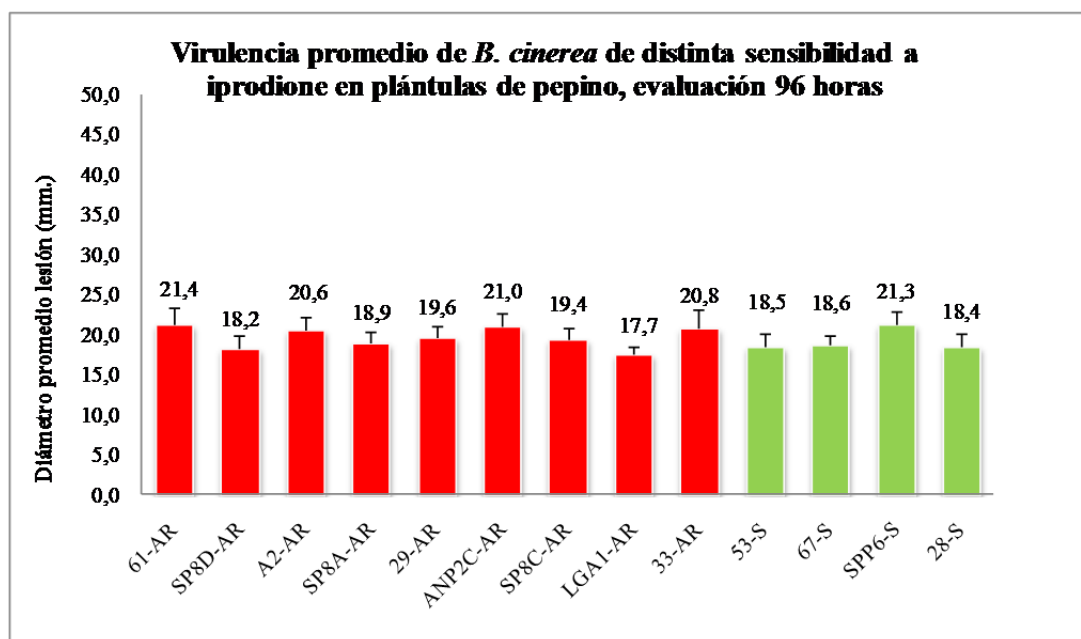


Figura 3. Grado de virulencia en hojas de plántulas de pepino presentadas por aislados resistentes y sensibles a iprodione. Barras rojas: aislados resistentes a iprodione; barras verdes: aislados sensibles a iprodione. (diferencias no significativas ($p \geq 0,05$)).

Pruebas de virulencia: Bayas, 7° Brix

Las pruebas de virulencia en bayas de vid cv. Thompson Seedless con 7° Brix, determinaron diferencias entre los aislados inoculados sensibles de *B. cinerea* (diámetro promedio de lesión = 3,25 milímetros) y resistentes. (diámetro promedio de lesión = 2,42 milímetros).

Sin embargo, también fue posible detectar un comportamiento diferente en algunos aislados, como en el caso de el aislado resistente 33-AR que resultó con un un diámetro promedio de lesión similar a los aislados sensibles 67-S y SPP6-S; así también, el aislado resistente ANP2C-AR presenta un promedio de diámetro de lesión similar a los aislados sensibles 53-S y 28-S (Figura 4).

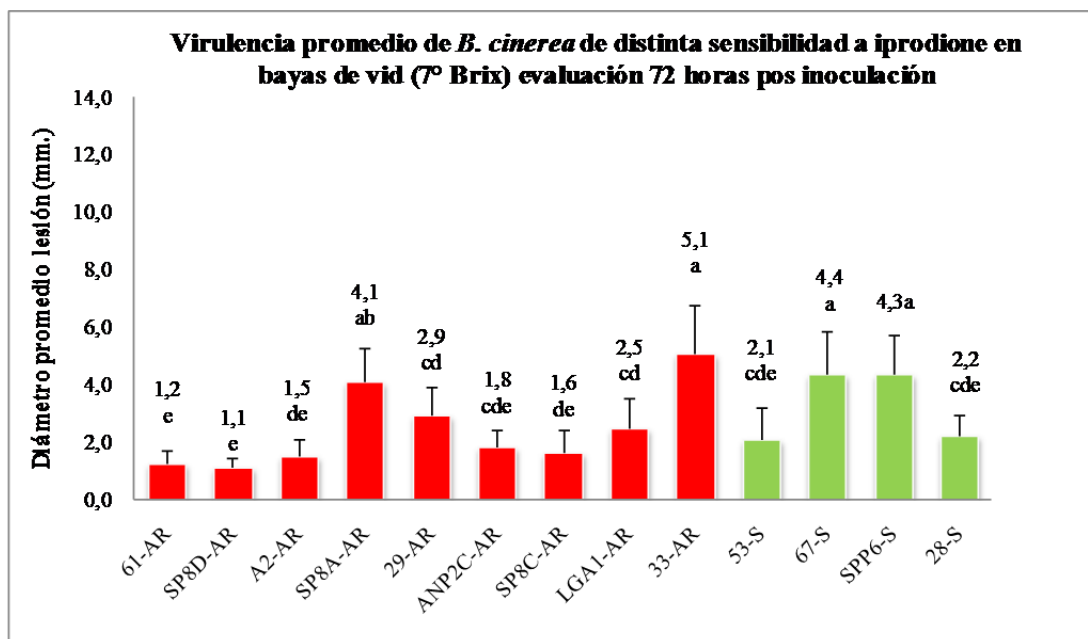


Figura 4. Comportamiento de virulencia presentado por aislados resistentes y sensibles de *B. cinerea* a iprodione inoculados en bayas de vid cv. Thompson Seedless con 7° Brix. Junto a las barras se indica valor promedio de la lesión. Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Pruebas de virulencia: Bayas, 14° Brix

En bayas de vid cv. Thompson Seedless con 14° Brix, aunque se obtuvieron diferencias significativas entre algunos aislados no se observó un patrón de comportamiento que permita establecer diferencias entre aislados de distinto nivel de sensibilidad. Los aislados resistentes presentaron los mayores y menores valores de diámetro promedio de lesión (29-AR y ANP2C-AR, respectivamente).

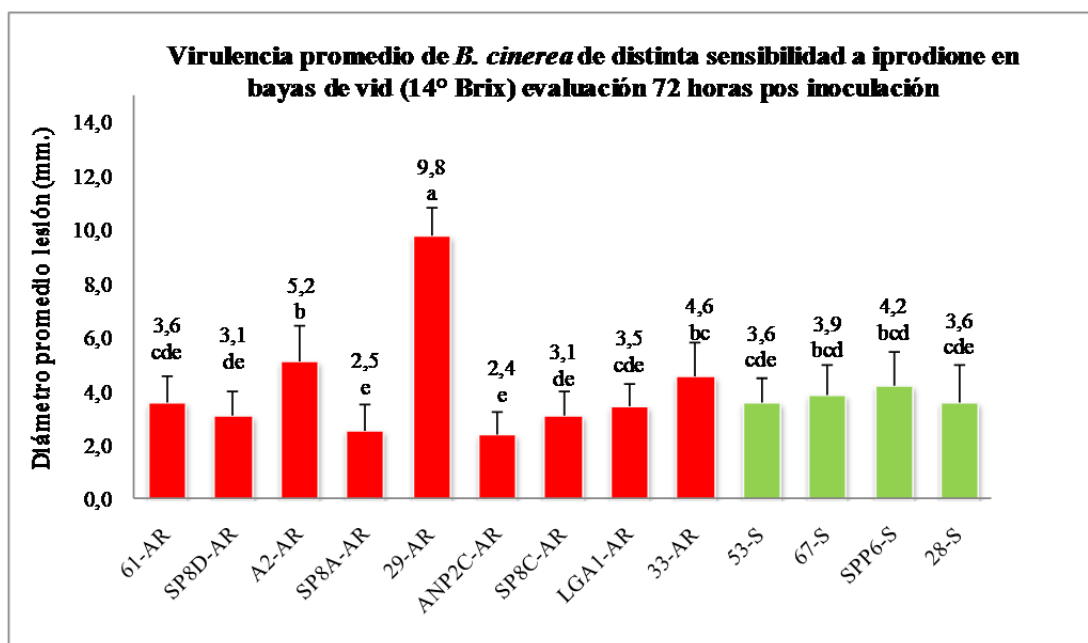


Figura 5. Comportamiento de virulencia presentado por aislados de *B. cinerea* resistentes y sensibles a iprodione en bayas de vid cv. Thompson Seedless con 14° Brix, luego de 72 horas de incubación. Resultados señalan diámetros promedios de lesión en milímetros. Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Pruebas de virulencia: Bayas, 17° Brix

Transcurridas las 72 horas de la inoculación en bayas de vid cv. Thompson Seedless con 17° Brix, los aislados resistentes 61-AR, SP8A-AR, SP8C-AR y LGA1-AR obtuvieron diámetros promedio de lesión similares al aislado sensible SPP6-S. El aislado resistente A2-AR presentó un diámetro promedio similar al aislado sensible 28-S; así también, los aislados resistentes SP8D-AR, 29-AR y 33-AR fueron similares al aislado sensible 53-S y el aislado resistente ANP2C-AR presentó un promedio de diámetro de lesión similar al aislado sensible 67-S.

En general, los diámetros promedio de lesión determinados para los aislados evaluados 72 horas pos inoculación, fueron similares en aislados de distinta sensibilidad, lo que no permitió determinar diferencias entre aislados resistentes y sensibles. Esto difiere con lo obtenido por otros autores como Raposo *et al.* (2000), quienes indican la existencia de una correlación negativa entre los valores de EC_{50} y los factores de sobrevivencia y virulencia, señalando que los aislados resistentes viven menos y son menos virulentos que los aislados sensibles.

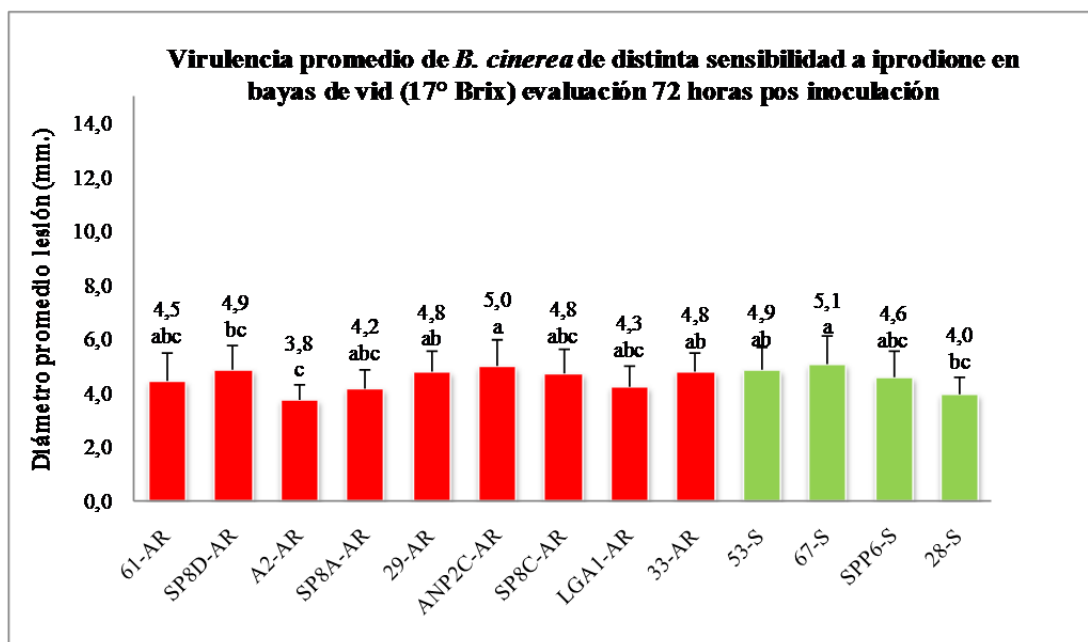


Figura 6. Comportamiento de virulencia presentado por aislados resistentes y sensibles a iprodione inoculados sobre bayas de vid cv. Thompson Seedless con 17°Brix. Junto a las barras se indica valor promedio de la lesión 72 horas post inoculación. Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Caracterización genética

La totalidad del gen *bos1* fue secuenciado en los 13 aislados analizados, utilizando los partidores BF1-BR1; BF2-BR2; BF3-BR3; BF4-BR4 y BF5-BR5.

Para realizar la comparación de las secuencias de los aislados de distinta sensibilidad, se utilizó la secuencia genómica del gen transcrito *bos1* obtenida desde el NCBI, (n° de acceso AF396827).

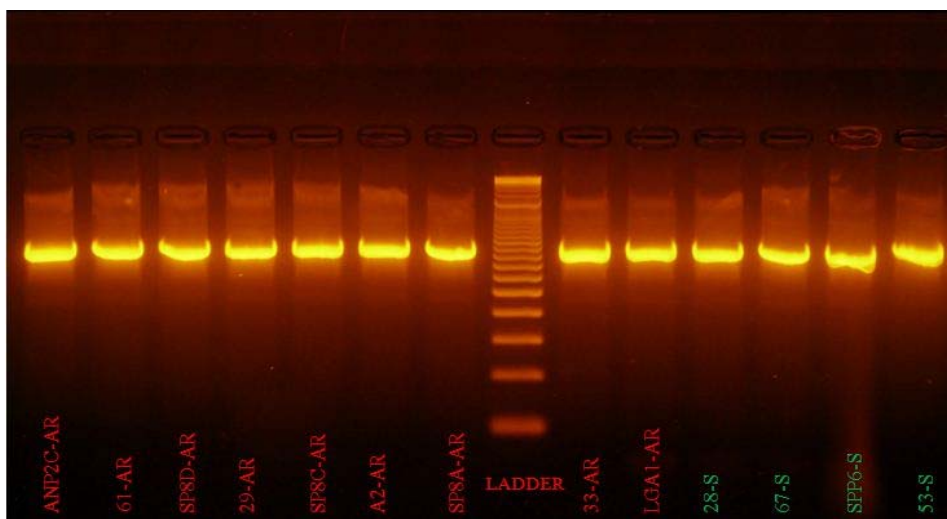


Figura 7. Visualización de los productos generados mediante PCR y uso de partidores BF2 y BR2 del gen *bos1* en los aislados de *B. cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a iprodione (peso de banda fluctuó entre 850-1200 pares de bases). Al centro de la figura ladder o marcador de peso molecular.

El análisis genético de las secuencias los 4 aislados sensibles presentaron una secuencia aminoacídica idéntica a la secuencia de referencia (AF396827) y en ninguno de los aislados sensibles secuenciados el gen *bos1* presentó cambios aminoacídicos o mutaciones asociadas a resistencia a dicarboximidas.

La totalidad de los aislados resistentes (n=9), presentaron un cambio aminoacídico en la posición 1259 de la proteína, detectándose una sustitución de treonina por alanina (T1259A).

En 8 de los aislados resistentes 33-AR, SP8D-AR, 61-AR, A2-AR, LGA1-AR, 29-AR, SP8C-AR y SP8A-AR, se detectó una mutación en la posición 365 de la proteína correspondiente a un cambio aminoacídico de isoleucina por asparragina (I365N) y en la posición 104 de la proteína de arginina por glutamina (R104Q). Estas mutaciones han sido previamente descritas por Cui *et al.*, 2004. El aislado resistente restante ANP2C-AR,

también presentó un cambio en la posición 365 de la proteína, isoleucina por serina (I365S) y en la posición 104 no presentó mutación de la proteína. (Leroux *et al.*, 2002; Oshima *et al.* 2002 y Cui *et al.*, 2004), (Cuadro 5).

Cuadro 5. Mutaciones presentes en el gen *bos1* de aislados chilenos de *B. cinerea* resistentes y sensibles a iprodione.

AISLADO	R104Q	I365N/S/R	L849V	T1259A
	Arg- Glut CGA→CAA	Ile- Asn/Ser/Arg ATC→AAC / AGC / AGA	Leu-Val CTC→GTC	Thr- Ala ACA→GCA
Secuencia de referencia (<i>bos1</i>)	Arg	Ile	Leu	Thr
33 AR	Glu	Asn	Leu	Ala
ANP2C AR	Arg	Ser	Val	Ala
SP8D AR	Glu	Asn	Leu	Ala
61 AR	Glu	Asn	Leu	Ala
A2 AR	Glu	Asn	Leu	Ala
LGA1 AR	Glu	Asn	Leu	Ala
29 AR	Glu	Asn	Leu	Ala
SP8C AR	Glu	Asn	Leu	Ala
SP8A AR	Glu	Asn	Leu	Ala
67S	Arg	Ile	Leu	Thr
SPP6S	Arg	Ile	Leu	Thr
28S	Arg	Ile	Leu	Thr
53 S	Arg	Ile	Leu	Thr

Las mutaciones del gen *bos1* en donde se reemplaza en la posición 365 isoleucina por serina o por asparragina, se han presentado en aislados resistentes de campo colectados en Nueva Zelanda, Suiza, Estados Unidos (Oshima *et al.*, 2006) y Japón (Oshima *et al.*, 2006; Banno *et al.*, 2008).

	1443	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530
Gen transcrito Bos1	266	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
33AR-completo	339	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
53S-completo	339	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
61AR-completo	326	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
67S-completo	326	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
AF396827 gen Bos1	1443	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
ANP2CAR-completo	338	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
LGA1AR-completo	339	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
SP8AR-completo	326	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
SP8CAR-completo	326	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
SP8DAR-completo	339	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
SPP6S-completo	338	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
28S-completo	338	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
29AR-completo	339	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						
A2AR-completo	333	TACTCACTGGTGCCCCATCCCAGCCTCAAAGAGTACTACATCCC	GACAACAGCTCGTAAATTCGTTGCTTGCCGCCAGAGAAGCGCCACC	CG						

Figura 8. Alineamiento, mutación posición 104 (311) del gen *bos1*. Cambio de CGA (arginina) por CAA (glutamina).

	2343	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440
Gen transcrito Bos1	1045	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
33AR-completo	1239	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
53S-completo	1238	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
61AR-completo	1225	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
67S-completo	1225	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
AF396827 gen Bos1	2342	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
ANP2CAR-completo	1237	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
LGA1AR-completo	1238	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
SP8AR-completo	1225	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
SP8CAR-completo	1225	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
SP8DAR-completo	1239	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
SPP6S-completo	1237	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
28S-completo	1237	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
29AR-completo	1238	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							
A2AR-completo	1232	GTAGCAAGAGATGTAGGAACTGAAGGTATTCCTGGGGGTCAAGCAGAAA	CGAAGGCGTCCAGGGCATGTGGAACACATTGATAGTGAACGTC	CAACGCTATGG							

Figura 9. Alineamiento, mutación posición 365 (1095) del gen *bos1*. Cambio de ATC (isoleucina) por AAC (asparragina) ó AGC (serina).

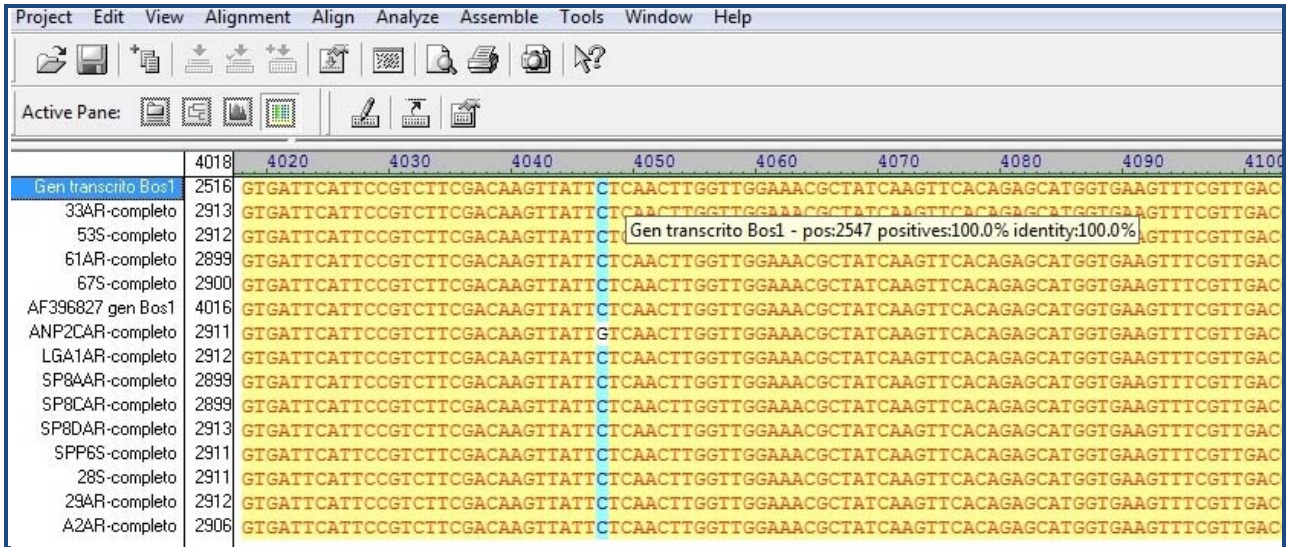


Figura 10. Alineamiento, mutación posición 849 (2547) del gen *bos1*. Cambio de CTC (leucina) por GTC (valina).

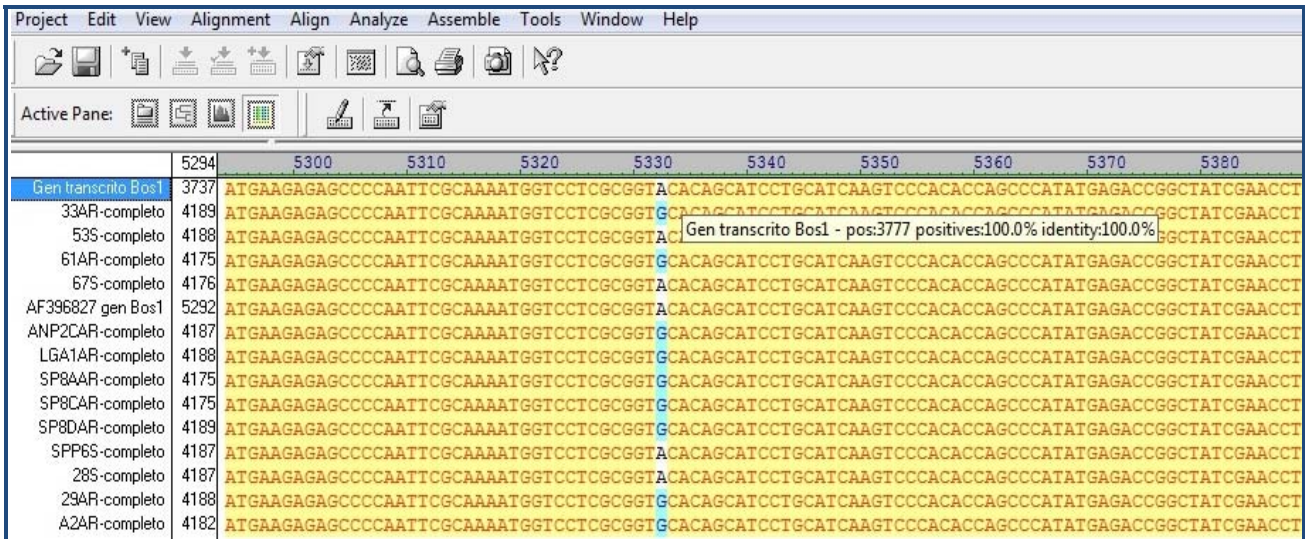


Figura 11. Alineamiento, mutación posición 1259 (3777) del gen *bos1*. Cambio de ACA (treonina) por GCA (alanina).

De acuerdo a la clasificación propuesta por Cui *et al* (2004), los aislados pueden clasificarse en Grupo 1, si presentan treonina en la posición 1259 (T1259), o Grupo 2, si presentan la mutación treonina por alanina en la posición 1259 (T1259A). Además, dentro de los grupos los aislados pueden subdividirse en Clase 1: si presenta la sustitución de isoleucina por serina en la posición 365 (I365S); Clase 2 si presenta la sustitución de isoleucina por asparragina en la posición 365 (I365N); Clase 3 si presenta la sustitución de isoleucina por arginina en la posición 365 (I365R) y Clase 4 si presenta la sustitución de isoleucina por serina en la posición 365(I365S) además de la sustitución de glutamina por prolina en la posición 369 (Q369P) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Clasificación de aislados propuesta por Cui *et al*, 2004

GRUPO	MUTACIÓN	CLASE 1	CLASE 2	CLASE 3	CLASE 4
1	Thr 1259	Ile 365 Ser	Ile 365 Asn	Ile 365 Arg	Ile 365 Ser + Gln 369 Pro
2	Thr 1259 Ala				

En el presente estudio, todos los aislados resistentes presentaron diferencias en la zona de repetición de aminoácidos con respecto a los aislados sensibles, de acuerdo a estas diferencias, los 9 aislados resistentes clasifican en el Grupo 2, por presentar la mutación T1259A y los 4 aislados sensibles corresponden al Grupo 1.

Dentro de la división por Clase, 8 de los 9 aislados resistentes (33-AR, SP8D-AR, 61-AR, A2-AR, LGA1-AR, 29-AR, SP8C-AR y SP8A-AR), presentaron el cambio aminoacídico en la posición 365 de la proteína de isoleucina por asparragina (I365N), correspondiendo por ello a la Clase 2. El aislado ANP2C-AR, fue el único aislado Clase 1, ya que presentó la mutación de isoleucina por serina en la posición 365 (I365S). Ninguno de aislados de *B. cinerea* analizados ninguno correspondió a la Clase 3 y 4.

Estudios previos realizados por Cui *et al.* (2002); Oshima *et al.* (2002) y Oshima *et al.* (2006), determinaron que las mutaciones asociadas a la resistencia a dicarboximidas en *B. cinerea* se limitan a la segunda y tercera repetición de aminoácidos del gen *bos1* (dominio de repetición de 90 aminoácidos, Figura 12), sin embargo Ma *et al.* (2007), detectaron una mutación en la posición 1040 localizada en la región terminal C del dominio quinasa, que codifica para un codón de término.

En el aislado resistente ANP2C-AR fue detectada una sustitución de leucina por valina en la posición 849 (L849V), localizada en el dominio quinasa del gen *bos1*, mutación que no había sido descrita previamente, desconociéndose aún su implicancia en el nivel de resistencia a dicarboximidas. Sin embargo, de acuerdo a los antecedentes ya indicados, esta mutación podría estar afectando la actividad de la histidina quinasa, modificando la respuesta del hongo en presencia del fungicida.

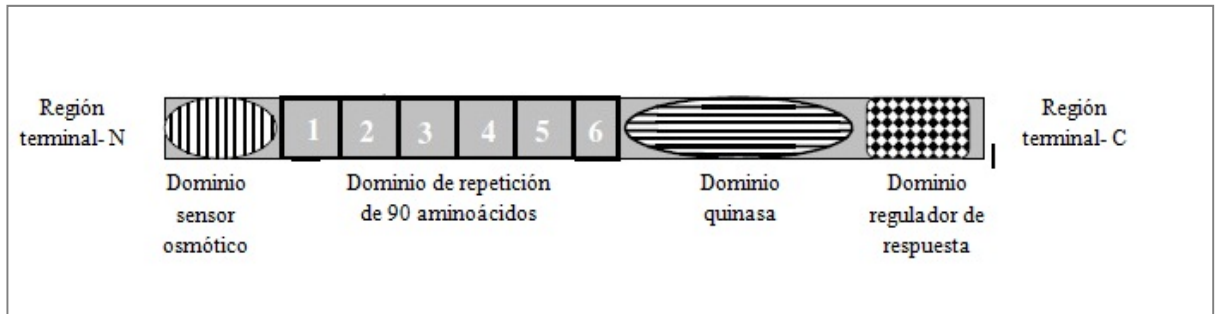


Figura 12. Representación esquemática del gen *bos1*.

Cabe destacar, que todos los aislados resistentes presentaron ulteriores cambios sólo en una base lo que no implicó un cambio aminoacídico. Estos cambios fueron tres y se localizaron en la posición: 541 glicina (GGG por GGA), 561 arginina (AGG por AGA) y 1312 leucina (TTA por CTA) de la proteína.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten señalar que:

- Las pruebas de sensibilidad *in vitro* mediante la metodología de crecimiento miceliar, corroboraron el nivel de sensibilidad de los 9 aislados resistentes y de los 4 sensibles, obtenidos previamente mediante germinación conidial.
- El grado de virulencia entre aislados resistentes y sensibles a iprodione fue similar, lo que indica que no existe un patrón de comportamiento entre aislados de distinto nivel de sensibilidad que permita establecer diferencias entre éstos.
- Los aislados sensibles a iprodione no presentan mutaciones en el gen *bos1*, sin embargo, la totalidad de los aislados resistentes a iprodione presentaron mutaciones en el gen *bos1* descritas previamente y que están asociadas con resistencia a dicarboximidas. En ocho de los nueve aislados resistentes se presentaron las mutaciones I365N y R104Q, el aislado resistente restante presentó la mutación I365S. Estas mutaciones están relacionadas con la resistencia a dicarboximidas.
- Todos los aislados resistentes correspondieron al Grupo 2 (mutación T1259A). Solo uno de los aislados resistentes analizados correspondió a la Clase 1 (mutación I365S), los ocho aislados resistentes restantes pertenecieron a la Clase 2 (mutación I365N).
- En uno de los aislados chilenos resistentes a iprodione se detectó en la posición L849V de la proteína, una mutación en el gen *bos1*, no descrita previamente situada en el dominio quinasa, cuya implicancia en la resistencia a dicarboximidas se desconoce.

BIBLIOGRAFIA

Auger, J. y M. Esterio, 1997. Control integrado de *Botrytis cinerea* Pers. En vid (*Vitis vinifera* L.). 14-25 p. *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. 125 p.

Bainbridge, B. W., Spreadbury, C. L., Scalise, D.G. and Cohen, J. 1990. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. FEMS Microbiol. Lett. 66: 113 – 118.

Banno, S., Fukumori, F., Ichiishi, Okada K., Uekusa, H., Kimura M. and Fujimura M. 2008. Genotyping of Benzimidazole-Resistant and Dicarboximide-Resistant Mutations in *Botrytis cinerea* using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays. Phytopathology. 98: 397-404.

Brent KJ and Whollomon D. 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: How can be managed? *In:* Fungicide Resistance Action Committee Monograph N°1 Groupment Int. Assoc. Nat. Fabricants Prodvtis Agrochimiques, Brussels, Belgium. 2:1-48.

Bulit, J. and Dubos, B. 1988. *Botrytis* bunch rot and blight. *In:* Pearson, R.C., Goheen, A.C. (ed.), Compendium of grape diseases. APS Press, St Paul, MN, USA, 13-14.

Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S., Weeds, P. L. and Templeton, M. 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Fungal Genetics and Biology 36:187-198.

Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S. L. and Templeton, M. 2004. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. Phytopathology 94: 1129-1135.

Droby, S. and Lichter, A. 2004. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. *In:* Elad, y., Williamson, B, Tudzynski, p. y Delen N. (eds.), Botrytis: biology, pathology and control. Kluwer academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 349-367.

Faretra, F. and Pollastro, S. 1991. Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Mycological research. 95: 943-951.

Gullino, M. L. and Kuijpers, L. A. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. Annual Review of Phytopathology. 32: 559-579.

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

Leroux, P. et Gredt, M. 1981. Méthode de detection de la résistance de *Botrytis cinerea* Pers, aux fongicides, a partir d'échantillons prélevés dans le vignoble. Phytatrie-Phytopharmacie. 30: 57 - 68.

Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D. and Gredt, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. Crop Protection Vol. 18 (10) 687-697.

Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. Pest Manag. Sci., 58: 876-888.

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

Moorman, G. W. and R. J. Lease. 1992. Benzimidazole and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. Plant Disease. 76: 477-480.

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

Oshima, M., Fujimura M., Banno, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A. and Yamaguchi, I. 2002. A point mutation in the two-component histidine kinase *BcOS-1* gene

confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 92: 75-80.

Oshima, M., Banno, S., Okada, K., Takeuchi, T., Kimura, M., Ichiishi, A. Yamaguchi, I. and Fujimura, M. 2006. Survey of mutation of a histidine kinase gene *BcOS-1* in dicarboximide resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 65-73.

Oshiai, N., Fujimura M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K. and Yamaguchi, I. 2001. Characterization of mutation in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensibility in the *os-1* mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Management Science* 57: 437- 442.

Pastor, E. 1980. Periodo de infección y latencia de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. en *Vitis vinifera* L. cv. Sultanina. Memoria Ingeniero agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 70p.

Peever, T. L. and Milgroom, M. G. 1994. Lack of correlation between fitness and resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* 84: 515-519.

Raposo, R., Delcan, J., Gomez, V. and Melgarejo, P. 1996. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathology* 45: 497-505.

Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T. and Melgarejo, P. 2000. Fitness of *Botrytis cinerea* Associated with Dicarboximide Resistance. *Phytopathology* 19: 1246-1249.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J. S., Le Pecheur, P., Kunduru, A. R., Leroux, P. and Legendre, L. 2006. A class III histidine kinase acts as novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant- Microbe Interaction*. 19: 1042-1050.

Williamson, B., Tudzynsky, B., Tudzynsky, P. and Van Kan, J. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* Vol.8. N°5: 561-580.

West and Stock. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26:369-376.