



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE AISLADOS
CHILENOS DE *Botrytis cinerea* DE DIFERENTE GRADO DE
SENSIBILIDAD A BOSCALID**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agropecuarias
Mención Sanidad Vegetal

ANDREA ELIZABETH ROMAN RAMOS
INGENIERO AGRÓNOMO

Directores de Tesis

MARCELA ESTERIO GREZ
JAIME AUGER SAVEEDRA

Profesores Consejeros

MARLENE ROSALES
JAIME R. MONTEALEGRE A.

Santiago - Chile
2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE AISLADOS
CHILENOS DE *Botrytis cinerea* DE DIFERENTE GRADO DE SENSIBILIDAD
A BOSCALID**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias
Mención Sanidad Vegetal

ANDREA ELIZABETH ROMAN RAMOS
INGENIERO AGRÓNOMO

Calificaciones * *
(Tesis de Grado)

Directores de Tesis

MARCELA ESTERIO GREZ
Ing. Agr. Mg. Cs.

Aprobado

JAIME AUGER SAVEEDRA
Ing. Agr. M.S. Ph.D.

Aprobado

Profesores Consejeros

MARLENE ROSALES
Ing. Agr. M.S. Ph.D.

Aprobado

JAIME R. MONTEALEGRE A.
Ing. Agr.

Aprobado

Santiago - Chile
2013

** Aprobado o Reprobado

Agradecimientos

Cuando miro hacia atrás recordando todo lo vivido durante estos últimos dos años, pienso que después el sacrificio y esfuerzo diario, me han dejado la grata sensación de haber cumplido con una etapa importante en el camino hacia mi desarrollo personal y profesional.

Es por eso que agradezco a Dios por darme fortaleza, valor y capacidad para enfrentar obstáculos permitiéndome avanzar día a día.

Quiero agradecer principalmente al Gobierno del Ecuador que a través del programa de becas desarrollado por la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), me dio la oportunidad de realizar mis estudios en Sanidad Vegetal adquiriendo conocimientos en el área Fitopatológica, lo cual servirá para potenciar el desarrollo de esta área en mi país Ecuador.

A mis profesores guías Marcela y Jaime quienes han confiado en el trabajo permitiéndome desarrollar esta investigación en el laboratorio a su cargo, esta experiencia me sirvió para crecer y aprender del área de investigación que elegido para mi futuro.

Gracias además por la disposición recibida de mis profesores consejeros Marlene Rosales y Jaime R. Montealegre A. por sus consejos en la redacción de la tesis.

A mis padres Isabel y Alberto por su cariño y ánimos a la distancia, siempre los tengo presentes.

A mis compañeros de laboratorio Simón y María José quienes me apoyaron incondicionalmente durante el desarrollo de la investigación, gracias queridos amigos.

En especial a Eduardo que a pesar de la distancia fue mi apoyo, mi paz, fuerza y el positivismo día a día, gracias por tu confianza de siempre durante este reto que hoy termina.

**“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria completa”**

Mahatma Gandhi

INDICÉ

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis.....	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Generalidades de <i>Botrytis cinerea</i>	5
Morfología y Epidemiología de <i>Botrytis cinerea</i>	5
Grupos químicos de fungicidas utilizados para el control de <i>Botrytis cinerea</i>	6
Resistencia a fungicidas	7
PCR - PIRA (Primer-Introduced Restriction Enzyme Analyses)	7
Genes asociados a la resistencia de <i>Botrytis cinerea</i> a boscalid	8
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Lugar de estudio.....	10
Materiales y reactivos	10
METODOLOGÍA	11
Caracterización genética de aislados de <i>Botrytis cinerea</i> de distinto nivel de sensibilidad a boscalid	12
Caracterización morfológica <i>Botrytis cinerea</i> según el tipo de mutación identificada	14
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Sensibilidad a boscalid.....	17
Caracterización genética de aislados de <i>Botrytis cinerea</i> de distinto nivel de sensibilidad de boscalid.....	19
Caracterización morfológica de aislados de <i>Botrytis cinerea</i> según mutación identificada	24
Virulencia de los aislados de <i>Botrytis cinerea</i> con mutaciones en el gen <i>sdhB</i> a 20°C ...	27
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	31
APÉNDICE	40

RESUMEN

Botrytis cinerea produce importantes pérdidas en uva de mesa en Chile. En el control químico de este patógeno se utiliza entre otras moléculas a boscalid, carboxamida que actúa inhibiendo la enzima succinato deshidrogenasa. En aislados de *Botrytis* recolectados de cultivos sometidos a un uso intensivo del fungicida, se ha demostrado la asociación entre la pérdida de sensibilidad con mutaciones en el gen *sdhB*, en donde se han identificado las mutaciones P225F/L/T y N230I asociadas a aislados resistentes y en mayor frecuencia las mutaciones H272R/Y/L asociadas a aislados resistentes y moderadamente resistentes. Durante las últimas dos temporadas (2011-2012 y 2012-2013), en la zona Central de Chile, se ha reportado una baja sensibilidad a boscalid.

El objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de mutaciones en el gen *sdhB* en aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a boscalid. Con este propósito, 50 aislados monoconidiales fueron caracterizados genética y fenotípicamente. Para la caracterización fenotípica se verificó la sensibilidad a boscalid mediante evaluación del comportamiento de germinación conidial, determinándose 4 categorías según valores EC_{50} : Sensible (S) ($>0,05-1,37\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), Levemente Resistente (LR) ($1,38-7,80\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), Moderadamente Resistente (MR) ($7,81-50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y Resistente (R) ($>50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Aislados R y MR con mutaciones se compararon con sensibles, según parámetros como: crecimiento miceliar, esporulación, sensibilidad osmótica, capacidad formadora de esclerocios y virulencia.

La detección de mutaciones se realizó mediante la técnica PCR-PIRA (Primer-Introduced Restriction Enzyme Analyses) y el uso de partidores específicos H272Y/R-*fw* y H272-*rev*, cuyos productos fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HhaI* respectivamente.

Los aislados de *Botrytis cinerea* mostraron niveles de sensibilidad a boscalid variables entre $0,13\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (S) y $1,1*10^9\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (R). La utilización del PCR-PIRA, permitió identificar las mutaciones H272Y/R en el gen *sdhB* que resultaron ser inespecíficas de un determinado nivel de sensibilidad a boscalid.

De acuerdo a los parámetros de adaptabilidad evaluados tales como crecimiento miceliar, capacidad formadora de esclerocios y esporulación de aislados resistentes con mutaciones H272Y/R respecto de los sensibles fueron significativamente diferentes ($p<0,05$), lo cual implicaría que las mutaciones detectadas y asociadas a la resistencia a boscalid generarían un costo metabólico en los aislados de *Botrytis*.

Palabras clave: PCR-PIRA, resistencia, SDHI, mutación, patogenicidad, adaptabilidad.

ABSTRACT

Botrytis cinerea produces serious losses in table grapes in Chile. In the chemical control of this pathogen is used among other molecules like boscalid, carboxamide that inhibits the succinate dehydrogenase enzyme. *Botrytis* isolates collected from different crops subjected to intensive fungicide application has shown an association between sensitivity loss and mutations in the *sdhB* gene, where P225F/L/T and N230I mutations have been identified in resistant isolates and most frequently mutations like H272R/Y/L on moderately resistant and resistant isolates. During the past two seasons (2011-2012 and 2012-2013) in the central Chile, has reported a low sensitivity to boscalid.

The objective of this research was determine the mutations presence in the *sdhB* gene of *Botrytis cinerea* isolates with different sensitivity levels to boscalid. For this purpose, 50 monoconidial isolates were characterized genetically and phenotypically. For phenotypic characterization was verified the sensitivity to boscalid by conidial germination, were classified into four resistance phenotypes based on the EC_{50} values them: Sensitive (S) (>0.05 - $1.37 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Low resistant (LR) (1.38 - $7.80 \mu\text{g.mL}^{-1}$), moderately resistant (MR) (7.81 - $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and resistant (R) ($>50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Isolate R and MR with mutations were compared with sensitive isolates, with parameters such as mycelial growth, sporulation, osmotic sensitivity, sclerotia production and virulence.

Mutations detection was performed by PIRA-PCR (Primer- Introduced Restriction Enzyme Analyses) with specific primers H272-rev H272Y/R-fw whose products were digested with restriction enzymes *EcoRV* and *HhaI* respectively.

Botrytis cinerea isolates showed different sensitivity levels between $0.13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ boscalid (S) and $1.1 \cdot 10^{-9} \mu\text{g.mL}^{-1}$ (R). The PIRA-PCR method has detected H272Y/R mutations, none were specific a sensitivity level to boscalid.

According to adaptability parameters evaluated such as mycelial growth, sclerotia production and sporulation of resistant isolates with mutations H272Y/R compare with sensitive were significantly different ($p < 0.05$), which imply that the mutations detected generate a metabolic cost in *Botrytis cinerea* isolates to boscalid.

Keywords: PIRA- PCR, fungicide resistance, SDHI, mutation, virulence, fitness.

INTRODUCCIÓN

El control de *Botrytis cinerea* se realiza de manera integrada considerando prácticas culturales y control químico, siendo éste fundamental. Sin embargo, como el patógeno tiene gran capacidad de generar resistencia a los fungicidas, en algunos casos un uso inadecuado se ha traducido en disminución de la eficacia.

Boscalid es una nueva molécula fungicida utilizada en el control de *Botrytis* cuyo modo de acción se basa en inhibir a la enzima succinato deshidrogenada en el transporte de electrones del complejo II. Actualmente, para éste y otros fungicidas del grupo de las carboxamidas se ha detectando la existencia de resistencia cruzada (Leroux *et al.*, 2010).

Hasta la fecha se ha reportado la presencia de aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a boscalid en diversos cultivos tales como vides, frutilla, manzanos y kiwi entre otros, sometidos a una alta presión de selección por el fungicida (Stammler, 2008; Leroux, 2010; Leroux *et al.*, 2011). Según estudios efectuados por Velloukas *et al.* (2011), la resistencia de *Botrytis cinerea* a boscalid, estaría asociada a la presencia de mutaciones en el gen de la enzima succinato deshidrogenasa en la subunidad hierro- azufre del complejo II (SdhB). En Chile el primer reporte de pérdida de sensibilidad a boscalid de *Botrytis cinerea* en uva de mesa se efectuó en 2011 (Esterio *et al.*, 2011a).

Debido a los antecedentes indicados se postuló que la resistencia de los aislados chilenos de *Botrytis cinerea* sometidos a reiteradas aplicaciones de boscalid, presentan cambios aminoacídicos en el gen *sdhB*.

El objetivo principal del presente estudio fue caracterizar genética y fenotípicamente 50 aislados chilenos de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a boscalid, recuperados desde uva de mesa de los cvs. Thompson Seedless, Red Globe y Crimson Seedless.

Con la técnica de PCR-PIRA (Primer-Introduced Restriction Enzyme Analyses) (Velloukas *et al.*, 2011), se detectaron mutaciones asociadas a resistencia a boscalid en botrytis. Paralelamente, se corroboró mediante ensayos in vitro el nivel de sensibilidad de los aislados a boscalid, determinándose los valores EC₅₀ en base a evaluación de la germinación conidial a distintas concentraciones del fungicida.

Estos procedimientos permitieron relacionar la resistencia en los aislados chilenos de *Botrytis cinerea* a boscalid con las mutaciones ya descritas (Stammler, 2008; De Miccolis *et al.*, 2010; Leroux *et al.*, 2010; Velloukas *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2011; Fernández-Ortuño *et al.*, 2012).

Hipótesis

Los aislados chilenos de *Botrytis cinerea* sometidos a presión de selección por boscalid en el campo presentan cambios aminoacídicos asociados a resistencia al fungicida en el gen *sdhB*.

Objetivo general

Caracterizar genética y fenotípicamente aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a boscalid, colectados desde uva de mesa de los cultivares Thompson Seedless, Crimson Seedless y Red Globe.

Objetivos específicos

1. Verificar el grado de sensibilidad según concentración media efectiva (valores EC_{50}) a boscalid in vitro (S, LR, MR y R) de 50 aislados de *Botrytis cinerea*.
2. Caracterizar genéticamente los aislados de *Botrytis cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a boscalid respecto de las mutaciones presentes en el gen *sdhB* mediante la técnica del PCR-PIRA.
3. Caracterizar fenotípicamente aislados de *Botrytis cinerea* con mutación de distinto nivel de sensibilidad a boscalid (S, LR, MR, y R) respecto de los siguientes parámetros: sensibilidad osmótica, crecimiento miceliar, producción de conidias, capacidad formadora de esclerocios y virulencia en bayas cv. Thompson Seedless con y sin heridas a 20°C.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades de *Botrytis cinerea*

En su fase asexual *Botrytis cinerea* y su fase teleomórfica *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, es el agente causal de la “pudrición gris” que afecta a más de 200 especies vegetales (Veloukas and Karaoglanidis, 2012), entre las que se incluyen especies frutales, plantas ornamentales y hortalizas (Rosslenbroich *et al.*, 1999). Entre los frutales, en Chile, la vid es el cultivo de mayor importancia económica donde éste patógeno produce importantes pérdidas antes y después de la cosecha (Esterio y Auger, 2012). Además, ocasiona pérdidas en la calidad de la fruta, debido al deterioro durante las etapas de transporte y almacenaje (Rosslenbroich and Stuebler, 2000).

Morfología y Epidemiología de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea produce conidias heterocarióticas hialinas a levemente coloreadas, unicelulares, ovoides a esféricas, sobre pequeños esterigmas en el extremo de conidióforos ramificados; sus hifas son septadas y ramificadas (Agrios, 1997). Forma una variedad de estructuras de penetración, incluyendo apresorios, con los cuales invade la epidermis del tejido vegetal (Salinas *et al.*, 1986). Además, las especies del género *Botrytis* producen esclerocios, que actúan como estructuras de resistencia del patógeno ante condiciones climáticas desfavorables (Ten Have, 2000).

Los síntomas provocados por *Botrytis* incluyen: pudrición en frutos, marchitez del tejido, pústulas y manchas foliares, caída de plántulas, canchales en los tallos y tizones en inflorescencias (Kim and Cho, 1996). *Botrytis cinerea* produce un micelio inicialmente blanquecino y de aspecto lanoso en el tejido infectado, que luego se torna grisáceo (esporulación) (Ten Have, 2000).

Las condiciones del proceso de infección evidencian la gran adaptabilidad del patógeno, y por ello éste se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, siendo solo inhibido cuando prevalecen condiciones de baja humedad relativa (Rosslenbroich, 1999). Aunque *Botrytis cinerea* puede afectar cualquier órgano en la vid, el mayor daño lo produce sobre el racimo a partir de estados iniciales de su formación, en el período de floración y desde envero (véraison) en adelante (McClellan and Hewitt, 1973; Pastor, 1980; Auger, 1981) coincidiendo con la disminución de compuestos antifúngicos, tales como: ácido glicólico, taninos y fitoalexinas como el resveratrol (Pastor, 1980; Keller *et al.*, 2003). Además durante este estadio fenológico con el aumento de sólidos solubles en las bayas y restos florales contaminados con el patógeno, se podría reactivar infecciones latentes generalmente asociada a la base de la baya y pedicelo (Pastor, 1980; Auger y Esterio, 1997, Coertze *et al.*, 2001; Holz *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2003).

Infecciones ocurridas en precosecha se evidencian en poscosecha, particularmente cuando la cadena de frío es interrumpida durante el periodo de almacenamiento o

transporte. Durante el otoño, el hongo permanece en el cultivo como esclerocio y como micelio esporulante en restos de plantas afectadas (Esterio, 2005). En primavera el micelio y los esclerocios producen gran cantidad de conidióforos con abundante liberación de conidias capaces de infectar bajo condiciones climáticas favorables de alta humedad relativa y temperaturas fluctuantes entre 15 y 20°C (Auger y Esterio, 1997)

Grupos químicos de fungicidas utilizados para el control de *Botrytis cinerea*

Durante los últimos 50 años el control de este patógeno se ha basado en el uso de fungicidas químicos sintéticos (Rosslénbroich and Stuebler, 2000), siendo los benzimidazoles y las dicarboximidias los más utilizados, sin embargo, como *Botrytis* tiene la capacidad de adaptarse a los fungicidas (Sergeeva *et al.*, 2002), el uso inadecuado de éstos, rápidamente se tradujo en pérdida de su eficacia debido al desarrollo de cepas altamente resistentes a ambos grupos (Yourman and Jeffers, 1999).

Posteriormente, en la década de 90s nuevas moléculas fueron utilizadas para el control de *Botrytis cinerea* tales como anilinoimidazoles (ciprodinil, pyrimethanil y mepanipirina), phenylpyrroles (fludioxonil, phenpiclonil) y hydroxianilidas (fenhexamid, fenpyrazamine). Con el tiempo *Botrytis* ha desarrollado resistencia a varias de estas moléculas (Rosslénbroich and Stuebler, 2000).

En la actualidad una alternativa de control son las carboxamidas pertenecientes al grupo de inhibidores de la enzima succinato deshidrogenasa (SDHI) y se han introducido nuevas moléculas como boscalid, penthiopyradol o fluopyram las cuales tienen un amplio espectro de acción (Stammler *et al.*, 2007; Yanase *et al.*, 2007; Avenot and Michailides, 2010; Glättli *et al.*, 2010). En Chile como en otros países boscalid es utilizado para el control *Botrytis cinerea*, este fungicida actúa inhibiendo la respiración mitocondrial al impedir el transporte de electrones del complejo II, bloqueando la producción de energía en la célula (Matsson and Hederstedt, 2001; Cecchini, 2003; Leroux *et al.*, 2010; Veloukas *et al.*, 2011).

La succinato deshidrogenasa (SDH) es una enzima clave en el ciclo de Krebs, puesto que cataliza la reacción de oxidación de succinato a fumarato y la reducción de ubiquinona a ubiquinol (Stammler, 2008; Shima *et al.*, 2009). Boscalid actúa inhibiendo la germinación conidial y el crecimiento del micelio y la elongación de los tubos germinativos (Stammler *et al.*, 2008). Además, por tener un amplio espectro de control puede actuar sobre varios hongos patógenos de plantas como: *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Sclerotinia* spp., *Mycosphaerella* spp., *Monilinia* spp. y oídios (Stammler, 2008).

Desafortunadamente, el riesgo de desarrollo de resistencia a los SDHIs se considera alto y ya se ha informado de resistencia en campo a boscalid de varios hongos fitopatógenos entre los que se incluyen *Alternaria alternata*, *Corynespora cassicola*, *Didymella bryoniae* y *Monilinia fructicola* (Avenot and Michailides, 2007; Stevenson, 2008; Amiri *et al.*, 2010; Miyamoto *et al.*, 2010).

Resistencia a fungicidas

La resistencia a fungicidas se manifiesta como una variación genética en un hongo que resulta en la reducción de su sensibilidad a una molécula química, debido a la disminución en la tasa de ingreso del fungicida a las células del patógeno, o falta de afinidad química con su molécula objetivo o por detoxificación del compuesto por parte del hongo (Koller, 2000).

El nivel de resistencia puede medirse como la concentración efectiva del ingrediente activo que es capaz de inhibir el crecimiento, la germinación de esporas o la infección del patógeno en un 50%, valor que se denomina concentración efectiva media y se calcula tanto para cada individuo muestreado como para la población bajo estudio (Damicone, 2004).

La pérdida de sensibilidad a los fungicidas (resistencia), también puede ser detectada utilizando técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerasa Chain Reaction: PCR), que son más sensibles, confiables y más rápidas. Estas técnicas, se fundamentan en el análisis de las secuencias de los genes objetivo, los cuales codifican para los transcritos o proteínas afectadas por el fungicida (Sierotzki *et al.*, 2000). Estos cambios generalmente se encuentran asociados con la presencia de mutaciones genéticas que ocurren en forma natural o inducida como resultado de una alta presión de selección ejercida por la molécula fungicida (Damicone, 2004). Las técnicas de PCR, permiten identificar mutaciones puntuales que conducen a los cambios en la secuencia de aminoácidos que confieren el fenotipo resistente.

Diferentes estrategias se han empleado para el diseño de pruebas de diagnóstico molecular de poblaciones resistentes a fungicidas entre estas se destacan: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) (Konieczny and Ausubel, 1993), Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) (Oefner and Underhill, 1995), Primer-Introduced Restriction Enzyme Analyses (PCR-PIRA) (Vuorio *et al.*, 1999), PCR de alelos específicos (Delye *et al.*, 1997) y (Spore-PCR) detección de una repetición en además de un promotor transcripcional en una región promotora del gen objetivo (Hamamoto *et al.*, 2001). Adicionalmente, en los últimos años se han diseñado métodos que permiten detectar cuantitativamente los niveles de resistencia en poblaciones patógenas mediante PCR en tiempo real (Gisi *et al.*, 2002).

PCR - PIRA (Primer-Introduced Restriction Enzyme Analyses)

PCR-PIRA es una técnica ampliamente utilizada para la detección de polimorfismos (Jacobson and Moskovits, 1991), consiste en la amplificación de ADN mediante PCR con el uso de partidores modificados, diseñados para introducir una sustitución de base adyacente al codón de interés con el fin de crear un sitio de restricción artificial con sólo una forma alélica (wildtype o mutado) (Haliassos, 1989), seguida de una digestión

enzimática con el uso de enzimas de restricción para detectar una mutación puntual (Ma and Michailides, 2005).

El método introduce un polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción; en el producto del PCR, generalmente el partidor se introduce cerca del extremo 3' que está cerca de la mutación de interés (Ke *et al.*, 2001).

Como el PCR-RFLP es una técnica fácil y rápida, varios ensayos se han desarrollado para la detección de resistencia a fungicidas como por ejemplo: benzimidazoles en *B. cinerea* (Luck and Gillings, 1995), *Cladobotryum dendroides* (McKay *et al.*, 1998), *Helmisthospodium solani* (McKay and Cooke, 1997; Cunha and Rizzo, 2003); estrobilurinas en: *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Baumler *et al.*, 2003), *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* (Sierotzki *et al.*, 2000) y *Podosphaera fusca* (Ishii *et al.*, 2001).

Otro ensayo de PCR-PIRA fue empleado para la detección de resistencia a carpropamid en *Magnaporthe grisea* (Kaku *et al.*, 2003). Carpropamid, es un inhibidor de la biosíntesis de melanina-deshidratasa (MBI-D), que controla enfermedades en arroz. Un estudio reciente demostró que la resistencia de *Magnaporthe grisea* a carpropamid fue causada por una mutación puntual que resultó de la sustitución de metionina por valina en el codón 75 (M75V) (Takagaki *et al.*, 2004). Por lo tanto, el método PCR-PIRA se ha desarrollado para detectar resistencia en base a una mutación puntual.

Genes asociados a la resistencia de *Botrytis cinerea* a boscalid

Varias mutaciones específicas de *Botrytis cinerea* se han identificado dentro de los genes *sdhB* y *sdhD* que codifican la proteína hierro-azufre y una proteína de anclaje del complejo de la succinato deshidrogenasa, respectivamente. Todas las modificaciones actualmente identificadas que afectan al complejo II hierro-azufre (S2) del gen *SDHB* parecen ser específicos para *Botrytis* (Leroux *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Stammler *et al.* (2007), se encontró un alelo con una modificación P225F en este codón, la misma fue identificada en aislamientos resistentes a boscalid.

Stammler (2008), informó que las mutaciones H272Y y P225L/F en el gen *sdhB* se asocian con una menor sensibilidad de *Botrytis cinerea* a boscalid. Es así que las mutaciones de aminoácidos en las posiciones 272 (H272Y/R) y 225 (P225L/F/T) se correlacionan a la resistencia *sdhB* a boscalid (Stammler, 2008; De Miccolis, 2010), esta última mutación también fue detectada por Veloukas *et al.* (2011) en el codón 225, resultando en un cambio de prolina a fenilalanina (P225F), en aislados de *Botrytis* recuperados desde fresa asociados a alta resistencia. Más recientemente Leroux *et al.* (2010) informaron que, además de las mutaciones H272Y/R se presentan otras mutaciones H272L, N230I en el gen *sdhB*, está asociada a resistencia del tipo moderada (Veloukas *et al.*, 2011) y H132R en *sdhD*, las que también se relacionan con resistencia a

boscalid en aislados de *Botrytis cinerea* procedentes de Francia y Alemania (frutillas, manzanas y uvas). Asociado a esto Veloukas *et al.* (2011) determinó que aislamientos moderadamente resistentes presentan las mutaciones H272R/R y la mutación H272L en aislados resistentes, y según Yin *et al.* (2011) las mutaciones H272R/Y en el gen *sdhB* correspondería al genotipo mutante dominante en los aislados de campo recolectados de manzanas.

Además, es importante señalar que el desarrollo de ensayos de PCR con alelos específicos para la detección de resistencia a boscalid en aislados de *Botrytis* con mutaciones en la posición 272, facilitaría la vigilancia de la resistencia a fungicidas (Yin *et al.*, 2011); sugiriendo con ello que el desarrollo de resistencia a este fungicida en *Botrytis cinerea* no es totalmente al azar y que las poblaciones resistentes pueden provenir de diferentes grupos genéticos específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

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

Materiales y reactivos

Aislados de *Botrytis cinerea* utilizados para pruebas genotípicas y fenotípicas

En la presente investigación se utilizaron 50 aislados de *Botrytis cinerea* que forman parte del cepario del Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular del Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile y que fueron seleccionados según antecedentes de sensibilidad a boscalid determinados en estudios previos (Apéndice I).

Medios de cultivo

Agar-Malta-Levadura (AML): Reactivación e incremento de aislados de *Botrytis cinerea* para las diferentes pruebas tanto morfológicas como genéticas (Haynes *et al.*, 1955).

Agar-Malta (AM): Cultivos monoconidiales (Haynes *et al.*, 1955).

Agar- agua (AA): Pruebas *in vitro* de sensibilidad a boscalid (Lingappa and Lockwood, 1960).

Agar-Papa-Dextrosa (APD): Caracterización morfológica (Lacy and Bridgman, 1962).

Agar-Papa-Dextrosa (APD) modificado (8% NaCl): Sensibilidad osmótica (Kim and Xiao, 2011).

Medio líquido a base de glucosa (10g. 500 ml⁻¹): obtención de biomasa de los aislados para la extracción de ADN (Gale and Epps, 1942).

Material vegetal

Bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless (16.5° Brix): utilizadas en los ensayos de virulencia, de los aislados seleccionados de *Botrytis cinerea* según presencia de mutaciones.

METODOLOGÍA

Cultivos monospóricos

El protocolo que se utilizó fue el desarrollado en el Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular. Con este propósito se reactivaron los aislados de *Botrytis cinerea* en medio AML. Luego de 5 días de incubación a partir de micelio esporulante se prepararon suspensiones conidiales de cada aislado en agua destilada estéril a una concentración de 10^6 conidias/mL determinada mediante un hemacitómetro. De esta suspensión, 200 μ L se esparcieron uniformemente sobre placas de Petri conteniendo medio AM, dejando las placas por un periodo de 24 horas a 20°C. Transcurrido este tiempo se observó bajo el microscopio la germinación y crecimiento de las conidias y se seleccionó una conidia del medio; la cual se transfirió a placas de Petri de 60 mm con medio AML, obteniéndose cultivos monospóricos, conservándose en glicerol al 20% a -20°C.

Sensibilidad a boscalid

La sensibilidad a boscalid (Cantus®), se corroboró mediante evaluación del comportamiento de la germinación conidial en placas de Petri con AA en concentraciones crecientes desde 0 a 100 μ g.mL⁻¹.

Las suspensiones conidiales de cada aislado fueron preparadas en agua destilada estéril a una concentración de 10^6 conidias/mL. Posteriormente 200 μ L de la suspensión conidial de cada concentración fue sembrada e incubada por 24 horas a 20°C en oscuridad continua, tiempo después del cual se procedió a evaluar el comportamiento de germinación conidial en 100 conidias. Se consideró como conidia germinada a aquella que presentó un tubo germinativo viable con una elongación de al menos 3 veces el tamaño de la conidia, y por cada concentración se consideraron 3 repeticiones.

El establecimiento de las categorías de sensibilidad se efectuó mediante el rango adaptado de Veloukas *et al.* (2011) y propuesto para boscalid según el Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Grado de sensibilidad

Rango de EC ₅₀ (μ g. μ L)	Grado de sensibilidad
< 0,05 - 1,37	Sensible
1,38 -7,80	Levemente resistente
7,81- 50	Moderadamente resistente
> 50	Resistente

Fuente: Adaptado de Veloukas *et al.*, 2011.

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

Obtención de ADN genómico de *Botrytis cinerea*

Obtención de la biomasa. La biomasa del hongo fue incrementada en medio glucosado líquido luego de un periodo de 4 días de incubación a 20°C; la biomasa fue lavada con agua destilada estéril y secada en papel absorbente, luego ésta fue transferida a tubos eppendorf de 2 mL. Estos tubos fueron mantenidos a -80°C y posteriormente liofilizados por un periodo de 24 horas.

Extracción de ADN. La extracción de ADN con CTAB se realizó siguiendo el protocolo de Aguayo *et al.* (2011).

Cuantificación y calidad del ADN extraído. Se determinó a través de lecturas de absorbancia realizadas a longitudes de onda de 260nm y 280nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601. La lectura a 260nm señala la concentración de ácido nucleico en la muestra y la relación entre ambas lecturas permitió estimar la pureza del ADN extraído. Para determinar la integridad del ADN genómico extraído se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 98 voltios por 30 minutos.

Purificación de productos de PCR. Con este propósito se cortaron con bisturí estéril las bandas de ADN amplificadas en gel de agarosa, bajo un transiluminador UV de onda corta Vilber Loumart. Posteriormente, las bandas se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL previamente pesados y luego se pesaron una vez más con el contenido total. El ADN obtenido fue purificado de acuerdo al protocolo de E.Z.N.A Gel Extraction kit (OMEGA bio-tek.), obteniendo finalmente entre 30-40 µL de ADN puro a utilizarse en la digestión enzimática.

Correspondencia genotípica de aislados de *Botrytis cinerea*

La correspondencia genotípica en base a presencia o ausencia de los elementos transponibles *Boty* y *Flipper* de los aislados de distinto nivel de sensibilidad se efectuó mediante PCR-duplex siguiendo la metodología descrita por Muñoz *et al.* (2002).

Los partidores utilizados para la identificación de *Boty*, fueron LTR 98: 5'AGCCTGTAGAATCACCAACG3' y LTR 728: 5'CGGTATTTCTGGTTGGCA3' que amplifican 648 pb de la región LTR (Secuencias largas repetidas) en las posiciones 98-745 (Diolez *et al.*, 1995) y para *Flipper* F304: 5'ATTCGTTTCTTGGACTGTA3' y F14: 5'GCACAAAACCTACAGAAGA3' que amplificaron un producto de 1250pb, correspondiente a la mayor parte de este transposón (Levis *et al.*, 1997).

Determinación de grupo genético de *Botrytis cinerea* a través de PCR-RFLP

Para la determinación de grupo genético de los 50 aislados de distinto nivel de sensibilidad a boscalid se utilizó la técnica de PCR-RFLP. Esta técnica amplifica la región del gen *Bc-hch* con un fragmento de 1171 bp, entre las posiciones 701 y 1871. Para realizar la identificación de Grupo I (*Botrytis pseudocinerea*) o Grupo II (*Botrytis cinerea sensu stricto*) se utilizaron los partidores 262: 5'AAGCCCTTCGATGTCTTGGA3' y 520L:5'ACGGATTCCGAACTAAGTAA3'. Este producto fue sometido a digestión enzimática con la enzima *HhaI* siguiendo el protocolo descrito por Fournier *et al.*, 2003.

Amplificación y secuenciación del gen *sdhB* de aislados de *Botrytis cinerea*

La validación de la técnica PCR-PIRA y la identificación de mutaciones en el gen *sdhB* se realizó sobre los 50 aislados de distinto nivel de sensibilidad a boscalid seleccionados. La reacción de PCR para amplificar el gen *sdhB* se realizó según el protocolo descrito por Leroux *et al.* (2010), utilizando los partidores IpBcBeg e IpBecEnd2; los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE IX (Sambrook *et al.*, 1989) y visualizados bajo luz UV. El producto PCR fue secuenciado por Macrogen (USA). Posteriormente, las secuencias completas del gen *sdhB* se compararon con el gen de referencia B05.10. (número de accesoión BC1G_13286.1) y fueron alineadas utilizando el software CLC Main Workbench 5.5.

Detección de cambios aminoacídicos mediante PCR-PIRA

La detección de cambios aminoacídicos se realizó mediante la técnica PCR-PIRA (Veloukas *et al.*, 2011). Los partidores no coincidentes, enzimas de restricción y fragmento objetivo se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Partidores utilizados para amplificar el gen *sdhB* de *Botrytis cinerea* y la detección de mutaciones asociadas a boscalid mediante PCR-PIRA

Partidores	Secuencia (5'3')	Fragmento amplificado (bp)	Enzima	Fragmento Obtenido (bp)	Objetivo
IpBcBeg	CCACTCCCTCCATAAATGGCTGCTCTCCGC	953	-----		<i>sdhB</i>
IpBecEnd2	CTCATCAAGCCCCCTCATTGATATC	---	-----		----
H272R-fw	GGCAGCTTTGGATAACAGCAATGAGTTTGTACA GATGGC	120	<i>HhaI</i>	85 y 35	H272R
H272Y-fw	GGCAGCTTTGGATAACAGCAATGAGTTTGTACA GATAT	120	<i>EcoRV</i>	120	H272Y
H272-rev	GCATTTCCTTCTTAATCTCCGC	---	-----		H272R/Y

Fuente: Veloukas *et al.* (2011)

En la reacción de PCR y de digestión enzimática se utilizó un volumen total de 20 µL. El programa de PCR y el protocolo de digestión enzimática fue el utilizado por Veloukas *et al.*, 2011.

El producto de PCR amplificado por los partidores H272L-fw/H272-rev, H272R-fw/H272-rev y H272Y-fw/H272-rev fue digerido con las enzimas de restricción *HhaI*, y *EcoRV* respectivamente. Las digestiones se realizaron durante 4 horas a 37°C.

Los productos del PCR junto con el producto de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989) y los eventuales fragmentos obtenidos de esta reacción se visualizaron después de la tinción con SYBR Red (SR).

Caracterización morfológica *Botrytis cinerea* según el tipo de mutación identificada

La caracterización morfológica se realizó sobre un total de 30 aislados de *Botrytis*, 18 de éstos con presencia de mutaciones (H272R/Y), 4 mutaciones silentes y 8 aislados sensibles, y consistió en la evaluación in vitro de los siguientes parámetros fenotípicos: (i) crecimiento miceliar en APD a 20° y 0°C, (ii) producción de conidias en APD y (iii) sensibilidad osmótica, mediante el protocolo de Kim and Xiao (2011). Además se evaluó la capacidad formadora de esclerocios de los distintos aislados del hongo luego de 20 días de incubación en APD a 20°C (número, peso y tamaño de esclerocios).

Crecimiento miceliar. Se efectuó disponiendo de manera invertida discos de 5 mm de diámetro de APD con micelio activo del hongo (2 días de edad), en placas de Petri conteniendo el mismo medio, siendo mantenidas en incubación en oscuridad continua por 3 y 14 días a 20°C y 0°C, respectivamente, evaluándose al término de este tiempo el crecimiento miceliar en 2 direcciones perpendiculares. Por cada aislado y condición de incubación se consideraron 4 repeticiones y cada una de éstas correspondió a una placa de Petri.

Producción de conidias. Se procedió inicialmente de la misma forma que en Crecimiento miceliar, pero con variaciones en las condiciones de incubación; 3 días en oscuridad continua a 20 °C y luego bajo luz por fotoperiodos de 12 horas y otro de 12 horas de oscuridad durante 14 días para facilitar la producción de conidias. Posterior al periodo de incubación, se dispusieron 20 mL de agua desionizada estéril sobre las placas de Petri, luego se raspó con un bisturí el crecimiento fungoso formado en cada placa, se filtró este contenido a través de dos capas de gasa en viales de centelleo individuales estimándose el contenido total de conidias (conidias/mm²) por cada aislado en base a 4 mediciones efectuadas mediante hemacitómetro.

Sensibilidad osmótica. Se dispusieron de manera invertida discos de 5 mm de diámetro de APD con micelio activo del hongo (2 días de edad), en placas de Petri conteniendo APD modificado con 8% de NaCl, siendo mantenidas en incubación en oscuridad continua por 3 días a 20°C, evaluándose al término de este tiempo el crecimiento miceliar fue medido en 2 direcciones perpendiculares. Por cada aislado y condición de incubación se consideraron 4 repeticiones y cada una de éstas correspondió a una placa de Petri. El porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio se calculó usando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - N / A) \times 100,$$

En donde:

A: corresponde al diámetro de las colonias en APD modificado con 8% de NaCl

N: diámetro en APD no modificado.

Capacidad formadora de esclerocios

Después de 2 días de incubación a 20°C en la oscuridad se tomó con un saca bocado discos de 5 mm de diámetro del margen de crecimiento activo de cada aislado y se colocaron en forma invertida en el centro de placas de APD. Se incubaron a 0°C y 20 °C durante 40 días y 20 días respectivamente; cumplido con este periodo se contó el número de esclerocios (n) de cada aislado.

Virulencia de los aislados de *Botrytis cinerea* con mutaciones en el gen *sdhB* a 20°C

El nivel de virulencia se determinó sobre aislados ya indicados en pruebas anteriores y consistió en inocular mediante una suspensión concentrada de conidias equivalente a 1×10^5 conidias/mL sobre bayas con y sin heridas previamente desinfectadas (inmersiones 0,5% NaClO/1 min, varios lavados en agua destilada estéril y secadas sobre papel absorbente).

Las bayas ya inoculadas se mantuvieron en incubación a 20°C por 48 horas, evaluándose el nivel de daño provocado a través de mediciones del diámetro de la lesión (mm) posterior a este tiempo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La corroboración de los niveles de sensibilidad a boscalid, se realizó mediante análisis del test de Probit utilizando el programa MINITAB 12.1. determinándose de esta manera los valores EC_{50} de cada aislado.

La evaluación de la caracterización morfológica se efectuó mediante un diseño completamente al azar para cada una de las pruebas efectuadas, sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y en el caso de detectar diferencias se utilizó la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey ($p < 0,05$), en este caso la placa de Petri fue la unidad experimental y se consideraron cuatro repeticiones por tratamiento.

Para el análisis de virulencia de los aislados con y sin mutación el diseño utilizado fue completamente al azar con estructura factorial 4×2 ; (sensibles, H272R, H272Y y mutación silente) y 2 formas de exposición al inóculo (con herida y sin herida). Los resultados se analizaron con un ANDEVA y luego se procedió a hacer una Prueba de Comparación Múltiple de Tukey ($p < 0,05$), en este caso la baya fue la unidad experimental y se consideraron tres repeticiones por tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sensibilidad a boscalid

Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad permitieron corroborar los niveles iniciales de los 50 aislados analizados; de éstos, 8 correspondieron a la categoría sensible (S) ($0,13 \geq EC_{50} \leq 0,96 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 12 aislados a la categoría levemente resistente (LR) ($1,84 \geq EC_{50} \leq 7,17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 18 aislados a la categoría moderadamente resistente (MR) ($8,07 \geq EC_{50} \leq 49,67 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y 12 aislados a la categoría resistente (R) ($145,08 \geq EC_{50} \leq 1,12\text{E}+09 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Cuadro 3).

En Chile el primer reporte de pérdida de sensibilidad a boscalid de *Botrytis cinerea* en uva de mesa se efectuó en 2011 (Esterio *et al.*, 2011a), confirmándose la existencia de aislados resistentes a boscalid (Román *et al.*, 2013; Piqueras *et al.*, 2013).

Cuadro 3. Aislados de *Botrytis cinerea* por nivel de sensibilidad

n ¹	Aislado	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Sensibilidad
1	IBF-1A	0,96	S
2	C1- 14 A	0,20	S
3	IBF-18C	0,37	S
4	IBF-18B	0,29	S
5	C1-33-2A	0,40	S
6	IBF-17A	0,23	S
7	IBF-17B	0,13	S
8	C1-21C	0,38	S
9	IBF-30C	2,92	LR
10	IBF-30B	2,16	LR
11	IBB-21C	7,17	LR
12	ICF-22C	2,90	LR
13	IBF-39A	2,74	LR
14	IBF-21A	2,29	LR
15	IBF-14A	1,91	LR
16	ICF-43A	1,84	LR
17	IBF2-38AR1	4,37	LR
18	IBF2-36A	2,42	LR
19	ICF256A	2,17	LR
20	IDF2-33C	5,63	LR
21	IBF-8A	8,13	MR
22	IBB-27C	14,63	MR
23	IBF-6A	46,83	MR
24	IBB-28C	42,45	MR
25	IBB-26C	49,67	MR
26	IBF-11A	38,66	MR
27	IBF-20A	34,70	MR
28	ICB-22AR1	35,69	MR
29	IBF-38A	9,74	MR
30	ICB-16C	11,8	MR
31	ICF2-12C	8,07	MR
32	ICF2-55D	9,59	MR
33	IBF2- 15 A	13,48	MR
34	IBB-24A	11,47	MR
35	IDF2-49A	10,06	MR
36	ICF-19C	13,30	MR
37	IBB-16AR1	13,91	MR
38	ICF2-60B	8,13	MR
39	C1-37-3A	169,17	R
40	ICB 14B	570,48	R
41	C1-37-4A	145,08	R
42	IBF2-16A	3,25E+07	R
43	ICF2-48D	6,98E+03	R
44	A935A2a2	678,99	R
45	C1-37-4B	1,84*10 ⁴	R
46	A919 A3a3	3,27*10 ³	R
47	ICB-22B	1,12*10 ⁹	R
48	IBF-20B	1,04*10 ⁵	R
49	ICF2-45C	949,57	R
50	ICF2-47C	1,76*10 ⁴	R

¹Número de aislados por sensibilidad evaluados (S=8, LR=13, MR=18 y R=12)

Caracterización genética de aislados de *Botrytis cinerea* de distinto nivel de sensibilidad de boscalid

Determinación de grupo genético de *Botrytis* mediante PCR-RFLP

Los 50 aislados analizados correspondieron al Grupo II (*Botrytis cinerea* sensu stricto) (Apéndice II).

Estudios realizados en Chile han determinado que el Grupo II es el predominante en la mayor parte de las poblaciones de *Botrytis* (Esterio *et al.*, 2006; Esterio *et al.*, 2007). Por otro lado es importante señalar que en otros estudios realizados anteriormente (Leurox *et al.*, 2010, Veloukas *et al.*, 2011), la mayoría de los aislados de distinto nivel de sensibilidad a boscalid también pertenecieron al mismo grupo genético (Grupo II).

Amplificación y secuenciación del gen *sdhB* de aislados de *Botrytis cinerea*

Los resultados obtenidos en la secuenciación del gen *sdhB* de los 50 aislados de *Botrytis cinerea* permitieron identificar el cambio de adenina (A) por guanina (G), produciendo un cambio de histidina por arginina (H272R) y el cambio de citosina (C) por timina (T) que origina un cambio de histidina por tirosina (H272Y); relacionándose ambas mutaciones con la pérdida de sensibilidad a boscalid (Stammler, 2008; De Miccolis, 2010; Leroux *et al.*, 2011; Veloukas *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2011; Fernández-Ortuño *et al.*, 2012) estas mutaciones están presentes en aislados R y algunos MR (Figura 1).

Por otro lado, es importante señalar que en 12 aislados MR no se detectaron mutaciones (Apéndice II), este comportamiento corrobora lo informado en algunos reportes como el de Walker *et al.* (2013), en donde se indica que algunos aislados MR a boscalid no presentan mutaciones en las proteínas SDH; lo cual también habría sido reportado por Leroux *et al.* (2010). Un comportamiento similar se ha detectado en otros patógenos como *Podosphaera fusca* en aislados R a QoI en donde no se han detectado mutaciones (Fernández-Ortuño *et al.*, 2008) e incluso la pérdida de sensibilidad no se ha relacionado a otros mecanismos de resistencia como una vía alternativa de respiración (oxidativa alternativa-AOX) reportada en otros hongos resistentes a esta molécula (Wood and Hollomon, 2003; Avila-Adame and Köller, 2003; Leroux *et al.*, 2010).

En aislados LR y S no se detectaron mutaciones asociadas al gen *sdhB* (Figura 2). Este resultado concuerda con los obtenidos por Fernández-Ortuño *et al.* (2012), Leroux *et al.*, (2010) y Veloukas *et al.* (2011) en los cuales, aislados sensibles no presentaron ninguna mutación.

Por lo tanto, este procedimiento permitió la validación de la técnica para la detección de mutaciones (PCR-PIRA) y la confirmación de la presencia de mutaciones en aislados chilenos de *Botrytis cinerea*, recuperados desde uva de mesa y finalmente inferir que la

	B05-1.10	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
									His			
									H			
LR	IBF-30C	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
LR	IBF-14A	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
LR	ICF-43A	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
LR	IBF-39A	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
LR	IBF-21A	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
S	C1-33-2A	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
S	C1-14A	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
S	IBF-17B	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
S	C1-21C	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
S	IBF-18B	AGC	ATG	AGT	TTG	TAC	AGA	TGT	CAC	ACT	ATT	CTC
									His			
									H			

Figura 2. Alineamiento de secuencias con el gen *sdhB* del aislado de referencia B05.10. (número de acceso BC1G_13286.1) con algunas secuencias de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de nivel de sensibilidad LR y S. En la figura se muestra que no existen reemplazos de nucleótidos, manteniendo el mismo aminoácido histidina (ausencia de mutaciones).

Las mutaciones P225L/F/T, N230I y H272L asociadas a un alto nivel de resistencia a boscalid en aislados de *Botrytis cinerea* (Stammler, 2008; Leroux *et al.*, 2010, Veloukas *et al.*, 2011) no se detectaron en la presente investigación; cabe destacar que este tipo de mutaciones en general se ha detectado en una baja frecuencia respecto a las mutaciones asociadas al codón 272 (R/Y). Debido a ello es importante realizar una prospección a futuro con objeto de verificar la presencia de estas mutaciones en poblaciones de *Botrytis cinerea* en Chile.

Alteraciones en la posición 225 prolina (P) y en la posición 230 asparagina (N) son parte de una región altamente conservada del ADN del patógeno (CPSYWWN) (Leroux *et al.*, 2010), estudios bioquímicos han indicado que los residuos de triptófano cercanos a la mutación N230I y P225L/F/T, permiten la unión entre ubiquinona y la carboxamida en la subunidad B de la succinato deshidrogenasa (Huang, 2006; Oyedotun and Lemire, 2004; Yankovskaya *et al.*, 2003). De lo indicado anteriormente, es posible que este tipo de mutaciones presentes en regiones conservadas se transmitieran a su progenie reduciendo la eficacia de la molécula.

Detección de cambios aminoacídicos mediante PCR-PIRA

De manera concomitante con el proceso de secuenciación, la técnica PCR-PIRA permitió corroborar la presencia de las mutaciones en el codón 272, es así que de 50 aislados analizados el 36% de estos presentaron mutaciones (n=18). Determinándose que la población total de aislados R (n=12) presentaron mutaciones (H272R/Y), de los cuales 6 aislados presentaron la mutación H272Y y otros 6 aislados la mutación H272R; mientras que en el caso de los aislados MR, solo en uno de ellos se detectó la mutación H272Y y en 5 la mutación H272R.

Como se puede observar en la Figura 3, en los amplicones obtenidos de los aislados que presentan la mutación H272Y no ocurre digestión con la enzima *EcoRV*, manteniendo un fragmento de 120 bp. En cambio, en los aislados que no la presentan, se generan 2 fragmentos de 85 y 35 pb respectivamente.

Por otro lado, en los amplicones obtenidos de los aislados con la mutación H272R se puede observar que después de la digestión con la enzima *HhaI*, se obtienen fragmentos de 85 bp y 35 bp. Los amplicones obtenidos de los aislados que no presentan la mutación mantienen el fragmento de 120 bp debido a que la enzima no digiere el fragmento (Figura 4).

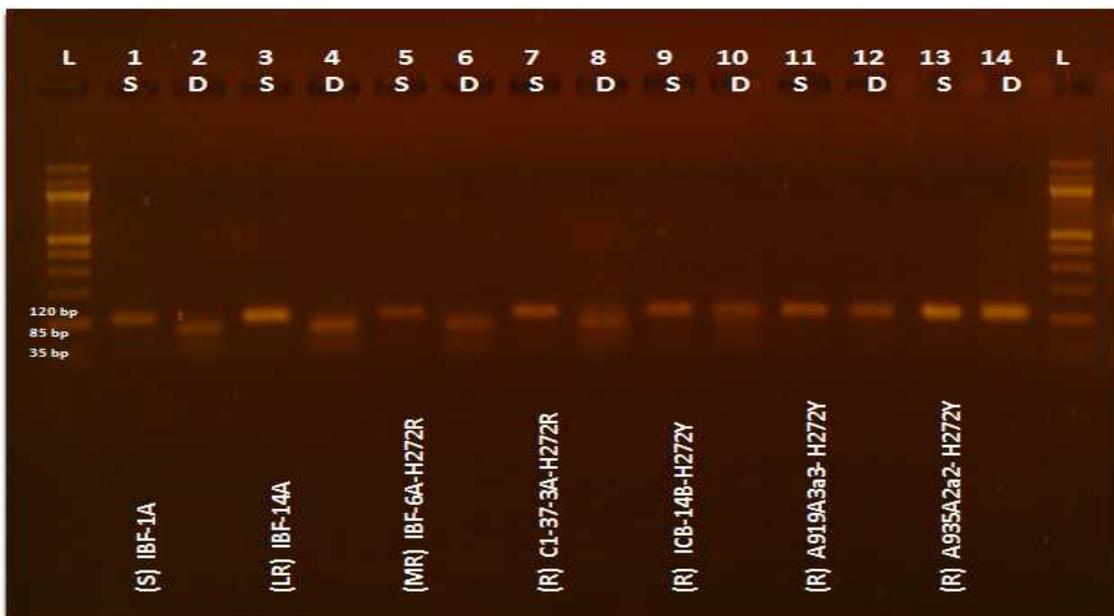


Figura 3. Digestión con la enzima *EcoRV* de los amplicones obtenidos de aislados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a boscalid, utilizando los partidores para detección de la mutación H272Y. (S) Amplicones sin digerir. Se observa un fragmento de 120 bp. (D) Producto de la digestión. Al presentarse la mutación no se digiere el amplicon, en cambio se observan fragmentos de 85 y 35 bp cuando no presentan la mutación.

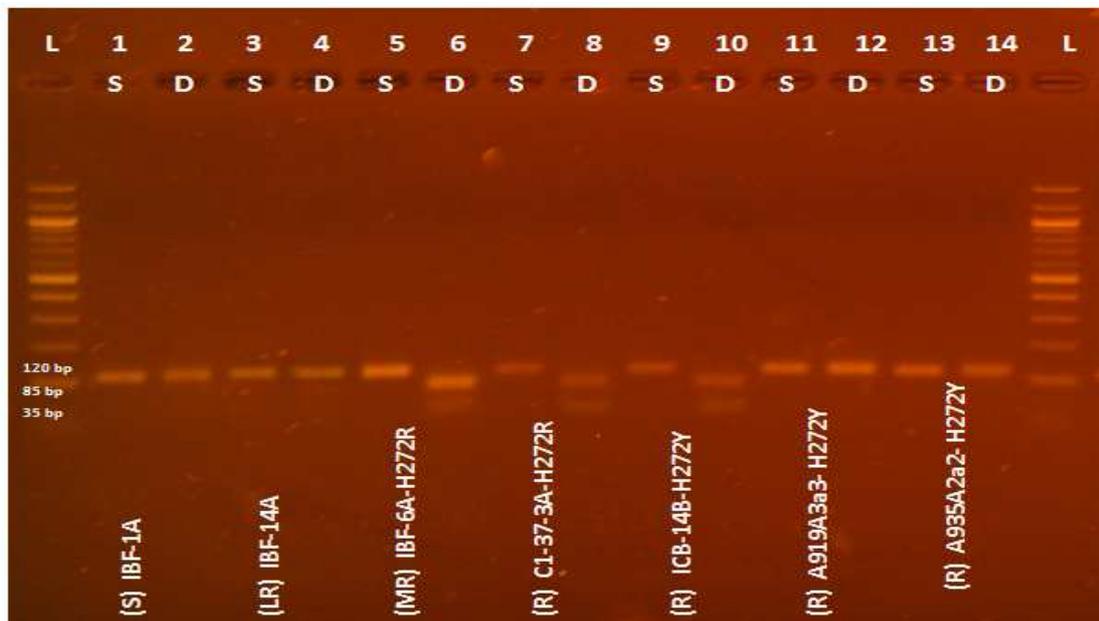


Figura 4. Digestión con la enzima *HhaI* de los amplicones obtenidos de aislados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a boscalid, utilizando los partidores para detección de la mutación H272R. (S) Amplicones sin digerir. Se observa un fragmento de 120 bp. (D) Producto de la digestión. Cuando se presenta la mutación, se digiere el amplicon observándose fragmentos de 85 y 35 bp, en cambio cuando no la presentan no se digiere el amplicón.

Varios autores han asociado a las diferentes mutaciones detectadas en el gen *sdhB* a un fenotipo, tal es el caso de la mutación H272R que se la ha asociado tanto a aislados R (Leroux *et al.*, 2010) como aislados MR (Veloukas *et al.*, 2011, Stammler, 2008). En cuanto a la mutación H272Y se ha asociado a aislados R (Leroux *et al.*, 2010; Veloukas *et al.* 2011; Fernández-Ortuño *et al.*, 2012). Pero esta deducción aun no puede ser confirmada, ya que en el presente estudio, como en otros desarrollados previamente (Yin *et al.*, 2011; Fernández-Ortuño *et al.*, 2012) las poblaciones con distinto nivel de sensibilidad presentan frecuentemente las mismas mutaciones H272R o H272Y. Además en este estudio se pudo relacionar el incremento de los valores EC_{50} con la presencia de mutaciones (Apéndice II).

Correspondencia genotípica de aislados de *Botrytis cinerea*

De los 50 aislados analizados el 76% (n=38) correspondió al genotipo *transposa* (*boty+;flipper+*) de todos los niveles de sensibilidad (R, MR, LR y S) (Apéndice II). En un reporte anterior Esterio *et al.* (2011b) determinaron la predominancia de este genotipo en las poblaciones de *Botrytis cinerea* en uva de mesa de exportación en Chile.

Por otro lado del total de aislados que presentaban la mutación H272R (n=10) la gran mayoría correspondió también a *transposa* (80 %), y el porcentaje restante a los genotipos *flipper* y *vacuma* (10% c/u). En el caso de los aislados que presentaron la mutación H272Y, se detectó nuevamente un predominio de *transposa* (87,5%), y el 12,5% restante correspondió al genotipo *boty*, corroborándose lo indicado por Esterio *et al.* (2011b) del genotipo predominante en *Botrytis* (Apéndice IV).

Aunque los resultados obtenidos en este estudio y lo indicado por otros autores señalan que el genotipo *transposa* es el más frecuente en los aislados resistentes a boscalid (Giraud *et al.*, 1999; Esterio *et al.*, 2011b; Milicevic *et al.*, 2006), se debería tener más antecedentes para asociarlo con la pérdida de sensibilidad a boscalid y con las mutaciones detectadas.

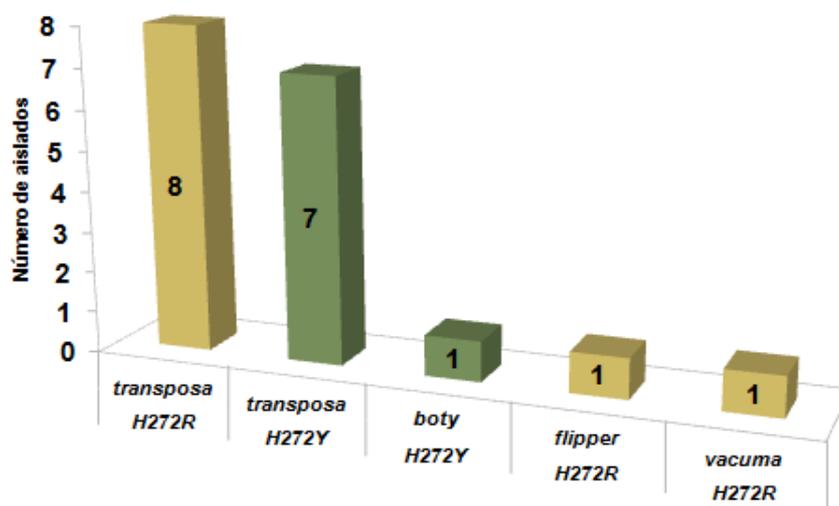


Figura 5. Número de aislados de *Botrytis cinerea* con las mutaciones H272R/Y según correspondencia genotípica.

Caracterización morfológica de aislados de *Botrytis cinerea* según mutación identificada

El análisis de las variables fenotípicas, tales como crecimiento micelial, esporulación y número de esclerocios a 20°C determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Cuadro 4).

Los aislados H272R presentaron un menor crecimiento micelial respecto de los H272Y, de los que presentaron la mutación silente y los sensibles (sin mutación). Cabe señalar que en estudios desarrollados por Bardas *et al.* (2008), aislados de *Botrytis cinerea* resistentes y sensibles a anilino pirimidinas, mostraron diferencias en el crecimiento micelial contrario a los estudios desarrollados por Stevenson *et al.* (2008) en el hongo

Didimella bryoniae y de lo obtenido por Miyamoto *et al.* (2009) en *Corynespora cassiicola*, donde no se presentaron diferencias en las tasas de crecimiento del micelio entre aislados resistentes y sensibles a boscalid.

Además, se detectó que los aislados H272R/Y presentaron menor nivel de esporulación que los sensibles y los de la mutación silente. *Botrytis* tiene una gran capacidad de producir conidias y esta condición natural permite una rápida dispersión del hongo en los viñedos (Beever, 1983). Por otro lado según el estudio realizado por Kim and Xiao (2011) los aislados resistentes a boscalid tendrían una menor capacidad de producción de conidias *in vitro* que los sensibles. Adicionalmente en otros estudios realizados en condiciones de laboratorio también se determinó una reducción de la esporulación en aislados resistentes a fenhexamid (Billard *et al.*, 2012) y en aislados resistentes a QoI (Markoglou *et al.*, 2006). De acuerdo a lo anteriormente indicado, la menor capacidad de esporulación presentada por los aislados H272R/Y afectaría la dispersión de este tipo de aislados en el campo.

Por el contrario en las pruebas de sensibilidad osmótica y crecimiento miceliar a 0°C no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) presentando todos los aislados un comportamiento similar. Según estudios efectuados por Beever (1983), la sensibilidad osmótica se relaciona con el cambio en la composición de la pared celular y por ello los aislados resistentes a dicarboxamidas serían osmóticamente más sensibles. Contrario a esta afirmación, en la presente investigación y en el estudio de Kim and Xiao (2011), los aislados con mutaciones presentan un comportamiento similar pudiéndose inferir que todos los aislados se ven afectados ante condiciones adversas como la salinidad y temperatura baja (0°C).

Por otra parte, la mutación silente detectada (Apéndice V), que también se ha presentado en aislados de *Cercospora zea-maydis* no ha producido cambios en su adaptabilidad de acuerdo a los parámetros evaluados como crecimiento miceliar, esporulación o virulencia (Shim and Dukle, 2005). Es importante señalar que en esta investigación se evaluó estos aislados, los cuales presentaron un comportamiento similar a los sensibles.

Cuadro 4. Caracterización morfológica de los aislados de *Botrytis cinerea* por tipo de mutación identificada

Mutación	n*	Crecimiento miceliar (mm)				Sensibilidad osmótica (%Inhibición)	Esporulación (conidias/mm ²)		
		20°C		0°C					
H272R	11	58,37	A	29,55	A	87,67	A	91,26	A
Mutación silente	4	73,12	B	26,82	A	87,77	A	125,48	B
H272Y	7	73,26	B	29,61	A	91,01	A	101,63	A
Sensibles (Sin mutación)	8	74,23	B	28,88	A	88,03	A	134,37	B
p-Value		0,0015		0,777		0,177		0,0002	

Medias con una letra común no son significativas según la prueba de Tukey ($p>0,05$).

* número de aislados analizados

Con respecto a la capacidad formadora de esclerocios se detectaron diferencias estadísticamente significativas a los 20 días de incubación ($p < 0,05$), pero no así a los 40 días ($p > 0,05$). Por lo tanto aislados con las mutaciones H272R/Y forman esclerocios más lentamente que los aislados sin mutaciones; además es importante señalar que la variación detectada respecto del número de esclerocios a los 20 y 40 días de incubación podría deberse a que los aislados que presentan mutaciones aparentemente requerirían un mayor tiempo para la formación de esclerocios. Esto tendría importancia en la sobrevivencia en el campo.

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

Sin embargo al evaluarse el peso y tamaño de los esclerocios tanto a los 20 como a los 40 días, sí fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los aislados con y sin mutación, presentando los esclerocios de los aislados H272R/Y un menor peso y tamaño que los esclerocios de los aislados sin mutaciones. Este resultado estaría indicando que los aislados H272R/Y tendrían una menor capacidad de sobrevivencia.

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

Cuadro 5. Capacidad formadora de esclerocios después de 20 y 40 días a 20 °C en APD

Mutación	20 días			40 días		
	Número de esclerocios	Peso (g)	Tamaño (mm)	Número de esclerocios	Peso (g)	Tamaño (mm)
H272R	13,33 B	0,19 A	2,31 A	22,64 A	0,21 A	2,72 A
Mutación silente	19,31 AB	0,44 B	4,81 B	29,06 A	0,48 B	4,06 B
H272Y	11,97 B	0,23 A	2,25 A	24,03 A	0,23 A	2,75 A
Sensibles (Sin mutación)	25,53 A	0,41 B	4,81 B	32,97 A	0,38 B	4,38 B

Medias con una letra común no son significativas según la prueba de Tukey ($p > 0,05$).

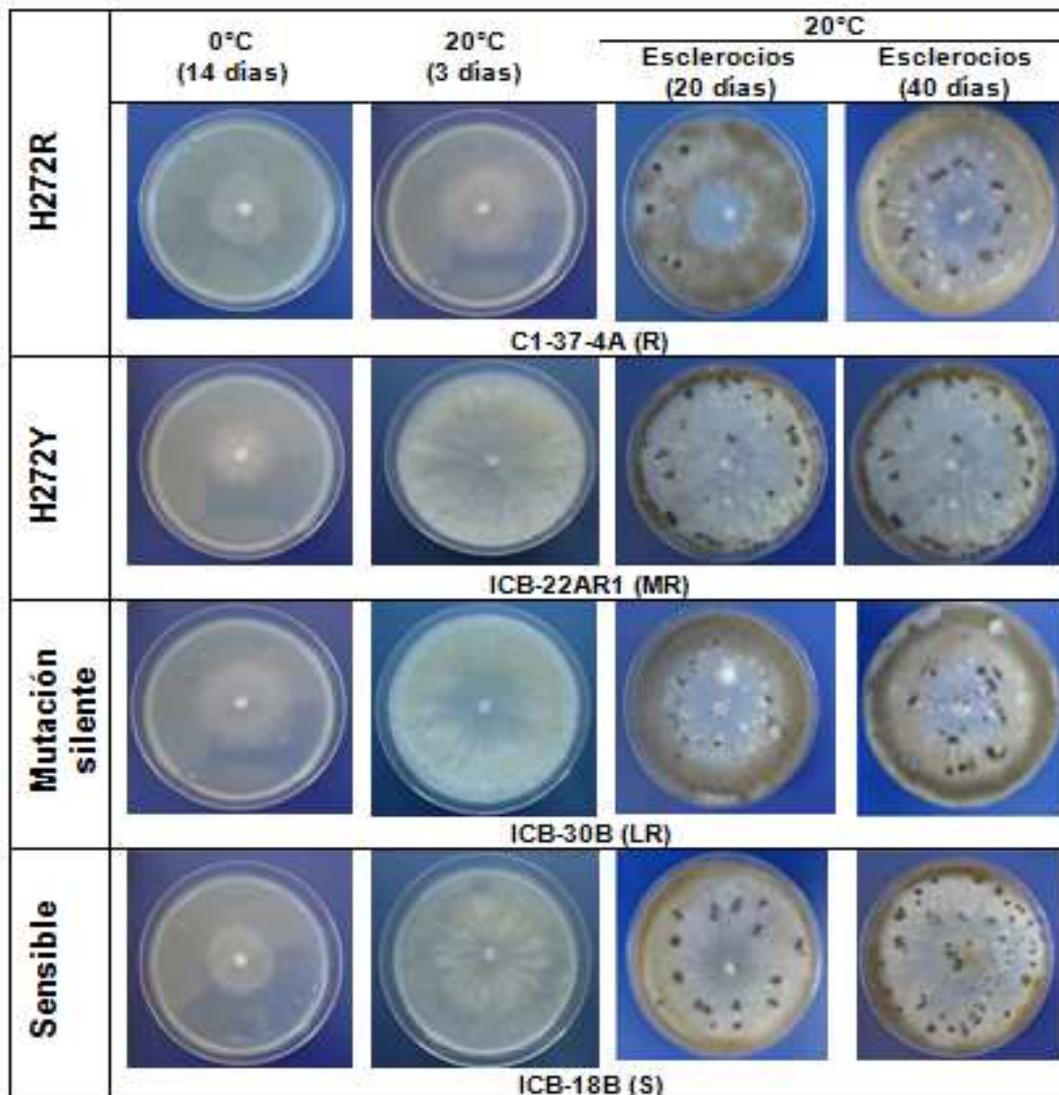


Figura 6. Crecimiento *in vitro* en APD a 0°C y 20°C y capacidad formadora de esclerocios a 20 °C de algunos de los aislados de *Botrytis cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a boscalid analizados.

Virulencia de los aislados de *Botrytis cinerea* con mutaciones en el gen *sdhB* a 20°C

Los resultados de la evaluación de la capacidad de virulencia señalan que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre aislados H272R/Y y sensibles ($p > 0,05$). Por otro lado como no se detectaron interacciones entre los factores presencia de mutaciones H272R/Y y tipo de exposición al inóculo, por lo que se procedió a analizar su efecto por separado (Cuadro 6).

Con respecto al factor tipo de exposición al inóculo (con y sin herida) a 20°C se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el diámetro de la lesión en la baya (Cuadro 6), siendo lógicamente mayor en las bayas con herida. Este comportamiento se debe a que la lesión provocada favorece la penetración del patógeno (Figura 7) asociándose a los resultados obtenidos por Esterio (2005), Pozo (2009), Araneda (2011) y Copier (2013).

Por otra parte, los aislados H272R/Y presentaron un comportamiento de virulencia similar a los sensibles luego de 48 horas posteriores a la inoculación. Un comportamiento similar fue detectado en aislados resistentes y sensibles a boscalid de *Alternaria alternata* en hojas de pistacho Avenot and Michailides (2007) y *Corynespora cassiicola* en hojas de pepino (Miyamoto *et al.*, 2009).

Cuadro 6. Capacidad de virulencia (mm) de *Botrytis cinerea* por presencia de mutación a 20°C

Tratamiento	H272Y	H272R	Mutación silente	Sensible	Efecto inoculación	gl	p-valor
Con herida	5,17	5,30	6,57	3,65	5,17 A		
Sin herida	0,95	1,10	1,55	0,93	1,13 B		
Efecto mutación	3,06A	3,20A	4,06A	2,29A			
ANDEVA							
Forma de exposición						7	<0,0001
Mutación						1	0,0159
T*F.Ex.						3	0,1393

Medias con una letra común no son significativas según la prueba de Tukey ($p > 0,05$).

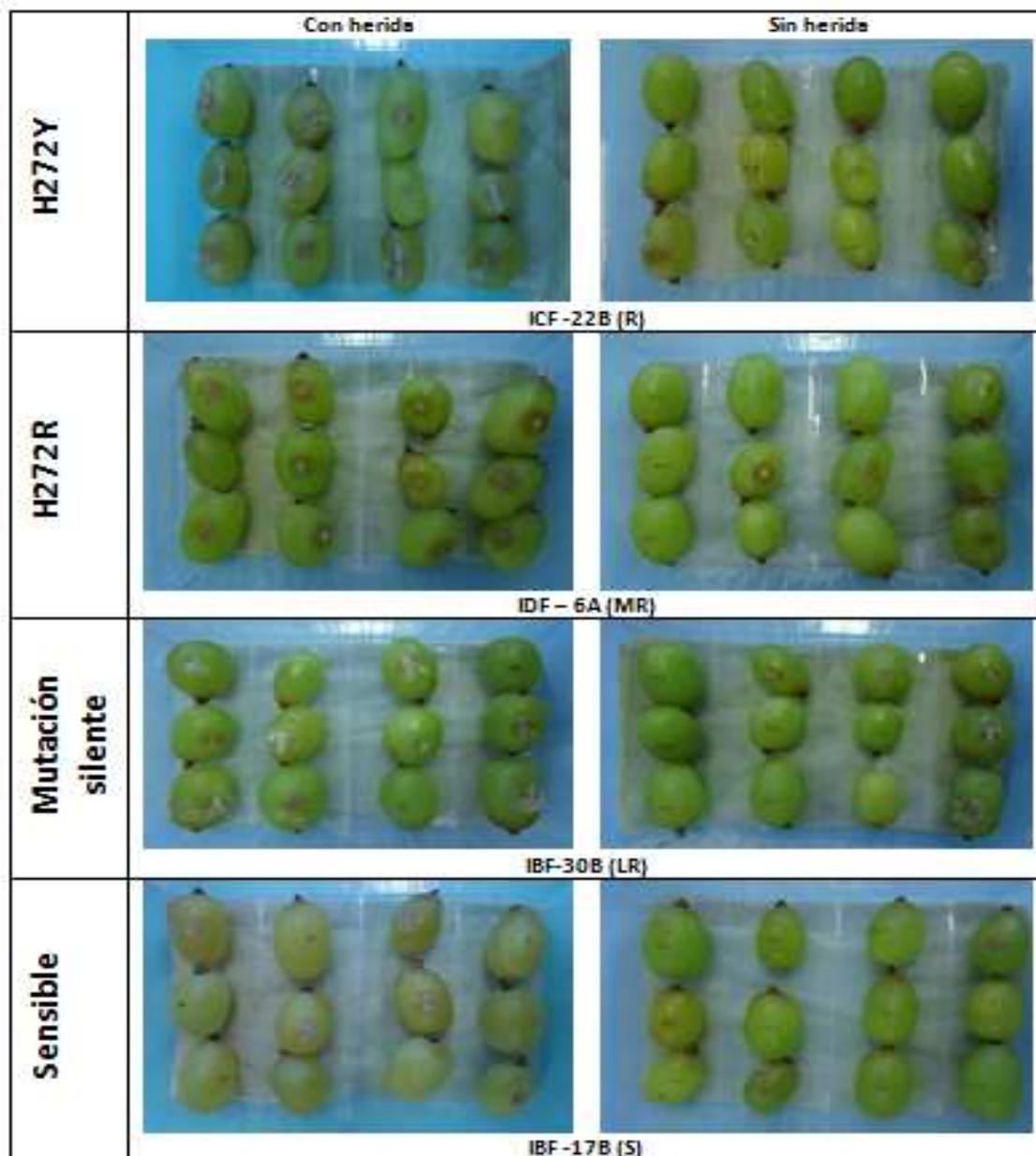


Figura 7. Prueba de virulencia realizada sobre bayas del cv. Thompson Seedless con herida y sin herida a 20°C, con la inoculación de aislados de *Botrytis cinerea* que presentan mutaciones en el gen *sdhB* y aislados sensibles, luego de 48 horas de inoculación.

CONCLUSIONES

Mediante la metodología utilizada en esta investigación, los resultados permiten concluir que:

Los niveles de sensibilidad determinados para cada uno de los aislados de *Botrytis cinerea* de acuerdo a los valores EC_{50} fueron variables, estos se relacionan con la presencia de mutaciones. Por lo tanto la presencia de mutaciones en el gen *sdhB* en los aislados chilenos de *B. cinerea* estaría relacionada con niveles altos de resistencia a boscalid ($EC_{50} > 50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

La técnica PCR-PIRA permitió detectar en el gen *sdhB* de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* dos de las mutaciones ya descritas y asociadas a pérdida de sensibilidad moderada y alta a boscalid: H272Y y H272R; la presencia de estas mutaciones fue validada mediante secuenciación y ninguna de las dos mutaciones detectadas resultó ser específica para un determinado nivel de sensibilidad a boscalid.

Ninguno de los aislados sensibles, levemente resistentes analizados e incluso algunos aislados de resistencia moderada a boscalid presentó mutaciones en este gen *sdhB*.

Todos los aislados en este estudio pertenecieron a *Botrytis cinerea sensu stricto* (Grupo II) y la mayoría de los aislados que presentaron las mutaciones H272R/Y, correspondieron al genotipo *transposa*.

La presencia de mutaciones (H272R/Y) en los aislados de *Botrytis* generaría un costo metabólico que se traduciría en una menor capacidad de sobrevivencia de estos dos tipos de aislados en el medio, debido a una menor esporulación, menor número, peso y tamaño de esclerocios y menor crecimiento a 20°C (solo en H272R).

Los aislados H272R/Y mostraron un comportamiento similar según el nivel de virulencia, crecimiento miceliar a 0°C y sensibilidad osmótica respecto de aislados sin mutación. Sugiriendo que todos los aislados tanto con la presencia de mutaciones o sin ellas se ven afectados ante condiciones adversas.

Los resultados obtenidos permiten comprobar la hipótesis planteada en la presente investigación: la presencia de mutaciones en el gen *sdhB* está asociada con la reducción de la sensibilidad a boscalid en aislados chilenos de *Botrytis cinerea*.

Finalmente es importante indicar que dado los resultados de este estudio se debería realizar una prospección que permita establecer una estrategia de manejo basado en la distribución de mutaciones en las poblaciones de *Botrytis cinerea* predominantes en Chile.

BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G. 1997. Plant Pathology (4^a ed.). Academic Press, 635 p.
- Aguayo, C., J. Riquelme, C. Urrejola, PDT. Valenzuela & E. Silva. 2011. Bchex a virulence gen of *Botrytis cinerea*: characterization and functional analyses. Journal of General Plant Pathology 77(4): 230-238.
- Auger, J. 1981. La pudrición gris de la vid. Revista Frutícola 2(2): 7-9.
- Auger, J. y M. Esterio, 1997. *Botrytis* en vides de Chile: Epidemiología y resistencia a fungicidas. 3-9 p. En: Esterio M. y J. Auger. *Botrytis*: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Santiago, Chile. 125 p.
- Amiri, A., P. Brannen, and G. Schnabel. 2010. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. Plant Disease 94:737-743.
- Araneda, M. J. 2011. Aislados chilenos de *Botrytis cinerea* resistentes a Iprodione: niveles de virulencia y caracterización del gen *bos*. Memoria de Título Ing. Agr., Esc. de Ing. Agronómica, Fac. de Cs. Agr. Universidad de Chile. 19 p.
- Avenot, H. and T. Michailides. 2007. Resistance to boscalid fungicide in *Altemaria altemata* isolates from pistachio in California. Plant Disease 91:1345-1350.
- Avila-Adame, C. and W. Köller. 2003, Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to Qo-inhibiting fungicides. Pest Management Science 59: 303–309.
- Bardas, G., C. Myresiotis, and G. Karaoglanidis. 2008. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. Phytopathology 98:443-450.
- Baumler, S., F. Felsenstein and G. Schwarz. 2003. CAPS and DHPLC analysis of a single nucleotide polymorphism in the cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin in field isolates of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Journal Phytopathology 151: 149–152.
- Beever, R. 1983. Osmotic sensitivity of fungal variants resistant to dicarboximide fungicides. Transactions of the British Mycological Society 80:327-331.
- Billard, A., S. Fillinger, P. Leroux, H. Lachaise, R. Beffa and D. Debieu. 2012. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. Pest Management. Science 68(5):684-91.

Cecchini, G. 2003. Function and structure of complex II of the respiratory chain. Annual Review of Biochemistry 72:77-109.

Copier, S. 2013. Caracterización genética y fenotípica de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* pers. provenientes de *Vitis vinifera* L cv. Thompsons seedless con distinto nivel de sensibilidad a estrobilurinas. Memoria de Título Ing. y M. Cs, Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 29 p.

Coertze, S., G. Holz and A. Sadie 2001. Germination and establishment of infection on grape berries by single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. Plant Disease 85: 668–677.

Cunha, M. and D. Rizzo. 2003. Development of fungicide cross resistance in *Helminthosporium solani* population from California. Plant Disease 87: 798–803.

Damicone, J. 2004. Fungicide Resistance Management. Oklahoma State University. 7 p.

Delye, C., F. Laigret and M. Corio-Costet. 1997. A mutation in the 14-alpha-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. Applied and Environmental Microbiology 63(8): 2966-2970.

De Miccolis, A., W. Habia, C. Rotolo, S. Pollastro, and F. Faretra. 2010. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. European Journal of Plant Pathology 128:185-199.

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

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

Esterio, M. J. Auger, M. Domange, H. García, C. Ramos y Venegas. 2006. Análisis de sensibilidad in vitro de *Botrytis cinerea* Pers. a fenhexamid en Chile y caracterización genética mediante uso de fragmento parcial del gen *Bc-hch*. Fitopatología 41 (1):15-24.

Esterio, M., J. Auger, C. Ramos and H. García. 2007. First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* on grapevine in Chile. Plant Disease 91:768.

Esterio, M., C. Ramos, M.J. Araneda, y J. Auger. 2011a. Situación actual de sensibilidad a botryticidas en las principales zonas productoras de uva de mesa en Chile, trabajo presentado como ponencia. En: XX Congreso de la Sociedad Chilena

de Fitopatología. (34°, Noviembre 29 – Diciembre 1, 2011, Hotel Neruda). Libro de Resúmenes. Eds. Montealegre, J. y Henríquez, J. L. Santiago, Chile: SOCHIFIT. 49 p.

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

Esterio, M. y J. Auger. 2012. “*Botrytis cinerea*, principal problemática de vides y arándanos de exportación en Chile: aspectos relevantes para el diseño de programas de control eficaces y medioambientalmente sustentables”. *Investigación Agrícola* 1: 29-47.

Fernández-Ortuño, D., J. Torés, A. de Vicente and A. Pérez-García. 2008. Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Pest Management Science* 64: 694–702.

Fernández-Ortuño, D. and G. Schnabel. 2012. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Disease* 96:1198-1203.

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

Gale, E. and H. Epps. 1942. *Journal of Biochemistry*. 36: 600.

Giraud, T., D. Fortini, C. Levis, C. Lamarque, P. Leroux, K. Lobuglio and Y. Brygoo. 1999. Two sibling species of the *B. cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89: 967-973.

Gisi, U., H. Sierotzki, A. Cook and A. McCaffery. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58(9): 859-867.

Glättli, A., G. Stammler, T. Grote, and S. Schlehuber. 2010. SDH Inhibitors: History, biological performance and molecular mode of action. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. 16th International Reinhardsbrunn Symposium. Reinhardsbrunn, Germany. 50-54 p.

Haliassos, A., J. Chomel, S. Grandjouan, J. Kruh, J. Kaplan and A. Kitzis. 1989. Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. *Nucleic Acids Research*. 17:8093:8099.

- Hamamoto, H., K. Hasesawa, R. Nakaune, Y. Jin-Lee, K. Akutsu, and T. Hibi, 2001. PCR-based detection of sterol demethylation inhibitor-resistant strains of *Penicillium digitatum*. *Pest Management Science* 57(9): 839-843.
- Haynes, W., L. Wickerham and C. Hesseltine. 1955. *Applied Microbiology*. 3:361-368.
- Holtz, G., M. Gütschow and S. Coertze. 2003. Occurrence of *B. cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunch grape. *Plant disease* 87(4):351-358.
- Huang, L. S., G. Sun, D. Cobessi, A. C. Wang, J. T. Shen, E. Y. Tung, V. E. Anderson, and E. A. Berry. 2006. 3-Nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 281:5965–5972.
- Ishii, H., B. Fraaije, T. Sugiyama, K. Noguchi, K. Nishimura, T. Takeda, T. Amano, D.W. Hollomon. 2001. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91: 1166–1171.
- Jacobson, D. and T. Moskovits. 1991. Rapid, nonradioactive screening for activating ras oncogene mutations using PCR- primer introduced restriction analysis (PIRA- PCR). *PCR methods and applications* 1:146-148.
- Kaku, K., M. Takagaki, T. Shimizu and K. Nagayama, 2003. Diagnosis of dehydratase inhibitors in melanin biosynthesis inhibitor (MBID) resistance by primer-introduced restriction enzyme analysis in scytalone dehydratase gene of *Magnaporthe grisea*. *Pest Management Science* 59: 843–846.
- Ke, X., A. Collins and S. Ye. 2001. PIRA PCR designer for restriction analysis of single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics applications note* 17(9): 838–839.
- Keller, M., O. Viret and M. Cole. 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* 93(3): 316-322.
- Kim, W. and W. Cho. 1996. Developmental characteristics of gray mold in pepper. *Journal in Agriculture Science Crop Protection* 38: 466-472.
- Kim, Y., and C. Xiao. 2011. Stability and fitness of pyraclostrobin and boscalid resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101:1385-1391.
- Konieczny, A. and F. Ausubel. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant Journal* 4(2): 403–410.

- Koller, W. 2000. Fungicide resistance. Encyclopedia of plant pathology. 1368 p.
- Lacy, M. and G. Bridgman. 1962. Phytopathology 52: 173.
- Lalève, A., Gamet, S., Walker, A-S., Debieu, D., Toquin, V., Fillinger, S. 2013. Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. Environmental Microbiology 1462-2920.
- Leroch, M., M. Kretschmer, and M. Hahn. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. Journal of Phytopathology 159:63-65.
- Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch, and A. Walker. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. Applied and Environmental Microbiology 76: 6615-6630.
- Levis, C., D. Fortini and Y. Brygoo. 1997. *Flipper*, a mobile *Fot1*-like transposable element in *Botrytis cinerea*. Molecular and General Genetics. 254: 674-680.
- Lingappa, Y. and J. Lockwood. 1960. Phytopathology 50: 644.
- Luck, J. and M. Gillings. 1995. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. Mycological Research 99: 1483–1488.
- Ma., Z. and T. Michailides. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection 24: 853–863.
- McClellan, W. and W. Hewitt. 1973. Early Botrytis rot of grapes: time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. Phytopathology 63: 1151-1157.
- Markoglou, A., A. Malandrakis, A. Vitoratos, and B. Ziogas. 2006. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. European Journal of Plant Pathology 115:149-162.
- Matsson, M. and L. Hederstedt. 2001. The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate:quinone reductase identified by mutations. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 33: 99-105.
- McKay, G., D. Egan, E. Morris and A. Brown. 1998. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. Mycological Research 102: 671–676.

McKay, G. and L. Cooke, 1997. A PCR-based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. FEMS Microbiology Letters 152: 371–378.

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

Miyamoto, T., H. Ishii, T. Seko, S. Kobori, and Y. Tomita. 2009. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. Plant Pathology 58: 1144- 1151.

Miyamoto, T., H. Ishii, G. Stammler, A. Koch, T. Ogawara, Y. Tomita, J. Fountaine, S. Ushio, T. Seko, and S. Kobori. 2010. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. Plant Pathology 59:873-881.

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

Oefner, P. and P. Underhill. 1995. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). American Journal Human Genetics 57: 266.

Oyedotun, K. and B. Lemire. 2004. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. Journal of Biological Chemistry 279:9424–9431.

Pastor, E. 1980. Período de infección y latencia de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. en *Vitis vinífera* L. cv Sultanina. Memoria de Título Ing. Agr. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago. 70 p.

Piqueras, C., R. Torres, B. Latorre. 2013. Resistencia de *Botrytis cinerea* a boscalid en uva de mesa. En: XXII Congreso Peruano y XVII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, trabajo presentado como ponencia. (Sesión N°4, 1 al 5 de Octubre de 2013, Salón N°3-Universidad Pedro Ruiz Gallo). Libro de Resúmenes. Eds. Rodríguez, E. y Murguía, C. Lambayeque, Perú: CLAP, ALF. 53 p.

Pozo, A. 2009. Caracterización fenotípica de aislados de *Botrytis cinerea* con distintos niveles de sensibilidad a Fenhexamid, *in vitro*, y su comportamiento frente a otros fungicidas. Memoria de Título Ing. Agr. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago. 48p.

- Román, A., J. Auger, y M. Esterio. 2013. Caracterización genética y fenotípica de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de diferente grado de sensibilidad a boscalid. En: XXII Congreso Peruano y XVII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, trabajo presentado como ponencia. (Sesión N°4, 1 al 5 de Octubre de 2013, Salón N°2 - Universidad Pedro Ruiz Gallo). Libro de Resúmenes. Eds. Rodríguez, E. y Murguía, C. Lambayeque, Perú: CLAP, ALF. 60 p.
- Rosslensbroich, H. 1999. Efficacy of fenhexamid (KBR 2739) against *Botrytis cinerea* and related fungal pathogens. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 52(2): 127-144.
- Rosslensbroich, H. and D. Stuebler. 2000. *Botrytis cinerea* History of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protection 19: 557-561.
- Salinas, J., F. Warnaar and K. Verhoeff. 1986. Production of cutin hydrolyzing enzymes by *Botrytis cinerea* in vitro. Journal Phytopathology 116: 299-307.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2d edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y. 40 p.
- Sergeeva, V., N. Nair, J. Verdaneza, C. Shen, I. Barchia and R. Spooner Hart. 2002. First report of anilinopyrimidine resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* on grapevines in Australia. Australasian Plant Pathology 31: 299-300.
- Shima, Y., I. Kaneko, S. Hatabayashi, H. Watanabe, Y. Adachi, and K. Yabe. 2009. Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in *Aspergillus oryzae*. Fungal Genetics and Biology 46:67-76.
- Shim, W and L., Dunkle. 2005. *Malazy*, a degenerate, species-specific transposable element in *Cercospora zea-maydis*. Mycology 97(2): 349-355.
- Sierotzki, H., J. Wullschleger and U. Gisi. 2000. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis f. sp. tritici* field isolates. Pesticide Biochemistry and Physiology 68(2): 107-112.
- Stammler, G., H. Brix, A. Glättli, M. Semar, U. Schoefl, 2007. Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. In: Proceedings XVI International Plant Protection Congress. Glasgow, UK. 40- 45 p.
- Stammler, G. 2008. Mode of action, biological performance and latest monitoring results of boscalid sensitivity. In: Abstr.18th Symposium Res. Committee on Fungicide Resistance. The Phytopathological Society of Japan. Matsueshi, Japan. 30-43 p.

Stammler, G., H. Brix, B. Nave, R. Gold, and U. Schoefl. 2008. Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. In: V. 15th International Reinhardtsbrunn Symposium. Modern fungicides and antifungal compounds. Eds. H. Dehne, H. Deising, U. Gisi, K. Kuck, P. Russell, and H. Lyr Friedrichroda, Germany. 44–51 p.

Stevenson, K., D. Langston, and F. Sanders. 2008. Baseline sensitivity and evidence of resistance to boscalid in *Didymella bryoniae*. *Phytopathology* 98: 151.

Takagaki, M., K. Kaku, S. Watanabe, T. Shimizu, H. Sawada, K. Nagayama. 2004. Monitoring and characterization of *Magnaporthe grisea* isolates with decreased sensitivity to scytalone dehydratase inhibitors. *Pest Management Science* 61: 777–785.

Ten Have, A. 2000. The *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase gene family. Thesis (doctoral)-WageningenUniversiteit. Disponible en: <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis2791.pdf>. Leído del 2 de Agosto del 2012.

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

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

Vuorio, A., L. Paulin, J. Saltevo and K. Kontula. 1999. Single-nucleotide polymorphisms may cause erroneous results in primer-introduced restriction enzyme analyses: a case of molecular misdiagnosis of homozygous vs heterozygous familial hypercholesterolemia. *Molecular and Cellular Probes* 13(6): 421-424.

Walker, A. S, A. Micoud, F. Rémuson, J. Grosman, M. Gretd and P. Leroux. 2013. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science* 69: 667–678.

Wood, P. and D. Hollomon. 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of Complex III. *Pest Management Science* 59: 499–511.

Yankovskaya, V., R. Horsefield, S. Tornroth, C. Luna-Chávez, H. Miyoshi, C. Leger, B. Byrne, G. Cecchini, and S. Iwata. 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299: 700–704.

Yanase, Y., Y. Yoshikawa, J. Kishi and H. Katsuta, 2007. The history of complex II inhibitors and the discovery of penthiopyrad. In: Ohkawa, H., H. Miyagawa, P.W. Lee.

(Eds.). Weinheim-Germany. pp. 295-303. (Pesticide Chemistry, Crop Protection, Public Health, Environmental Safety WILEY-VCH).

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

Yourman, L. and S. Jeffers. 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 83: 569-575.

APÉNDICE

Apéndice I

Cuadro 1. Aislados de *Botrytis cinerea* que se utilizaron en el estudio

n	Aislado	Región	Variedad	Origen	Temporada
1	C1-37-3A	Metropolitana	Crimson	BAYA	2011 - 2012
2	ICB-14B	Metropolitana	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
3	A935A2a2	IV Región	Red globe	FLOR	2011 - 2012
4	C1-37-4B	Metropolitana	Crimson	BAYA	2011 - 2012
5	A919 A3a3	III Región	Thompson Seedless	FLOR	2010 - 2011
6	ICB-22B	Metropolitana	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
7	IBF-20B	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
8	C1-37-4A	Metropolitana	Crimson	BAYA	2011 - 2012
9	ICB-22AR1	Metropolitana	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
10	IBF-6A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
11	IBB-28C	V Región	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
12	IBB-26C	V Región	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
13	IBF-11A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
14	IBF-20A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
15	IBF-38A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
16	IBF-8A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
17	IBB-21C	V Región	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
18	IBF-30C	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
19	ICF-22C	Metropolitana	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
20	IBF-39A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
21	IBF-21A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
22	IBF-30B	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
23	IBF-14A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
24	ICF-43A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
25	IBF-1A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
26	C1- 14 A	Metropolitana	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
27	IBF-18C	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
28	IBF-18B	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
29	C1-33-2A	Metropolitana	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
30	IBF-17A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
31	IBF-17B	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
32	C1-21C	Metropolitana	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
33	IBB-27C	V Región	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
34	ICB-16C	V Región	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
35	IBF2-38AR1	V Región	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012
36	ICF2-12C	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
37	IBF2-16A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
38	ICF2-45C	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
39	ICF2-55D	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
40	IBF2- 15 A	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
41	ICF2-47C	V Región	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
42	IBB-24A	V Región	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012

n	Aislado	Región	Variedad	Origen	Temporada
43	IDF2-49A	VI Region	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
44	IBF2-36A	V Region	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
45	ICF2-60B	V Region	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
46	ICF2-48D	V Region	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
47	ICF256A	V Region	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
48	IDF2-33C	VI Region	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
49	ICF-19C	Metropolitana	Thompson Seedless	FLOR	2011 - 2012
50	IBB-16AR1	V Región	Thompson Seedless	BAYA	2011 - 2012

Apéndice II

Cuadro 1. Caracterización genotípica según nivel de sensibilidad a boscalid

n	Aislado	EC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Sensibilidad	Producto generado de la digestión <i>EcoRV</i>	Producto generado de la digestión <i>HhaI</i>	Mutación (PCR-PIRA y secuenciación)	Genotipo	Grupo
1	IBF-1A	0,96	S	85 y 35	120	-	<i>vacuma</i>	II
2	C1- 14 A	0,20	S	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
3	IBF-18C	0,37	S	85 y 35	120	-	<i>vacuma</i>	II
4	IBF-18B	0,29	S	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
5	C1-33-2A	0,40	S	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
6	IBF-17A	0,23	S	85 y 35	120	-	<i>vacuma</i>	II
7	IBF-17B	0,13	S	85 y 35	120	-	<i>vacuma</i>	II
8	C1-21C	0,38	S	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
9	IBF-30C	2,92	LR	85 y 35	120	Mutación silente*	<i>boty</i>	II
10	IBF-30B	2,16	LR	85 y 35	120	Mutación silente*	<i>transposa</i>	II
11	IBB-21C	7,17	LR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
12	ICF-22C	2,90	LR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
13	IBF-39A	2,74	LR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
14	IBF-21A	2,29	LR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
15	IBF-14A	1,91	LR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
16	ICF-43A	1,84	LR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
17	IBF2-38AR1	4,37	LR	85 y 35	120	-	<i>vacuma</i>	II
18	IBF2-36A	2,42	LR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
19	ICF256A	2,17	LR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
20	IDF2-33C	5,63	LR	85 y 35	120	-	<i>vacuma</i>	II
21	IBF-8A	8,13	MR	85 y 35	120	Mutación silente*	<i>vacuma</i>	II
22	IBB-27C	14,63	MR	85 y 35	120	Mutación silente*	<i>vacuma</i>	II
23	IBF-6A	46,83	MR	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>transposa</i>	II
24	IBB-28C	42,45	MR	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>transposa</i>	II
25	IBB-26C	49,67	MR	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>flipper</i>	II
26	IBF-11A	38,66	MR	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>transposa</i>	II
27	IBF-20A	34,70	MR	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>transposa</i>	II
28	ICB-22AR1	35,69	MR	120	120	H272Y	<i>transposa</i>	II
29	IBF-38A	9,74	MR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
30	ICB-16C	11,8	MR	85 y 35	120	-	<i>vacuma</i>	II
31	ICF2-12C	8,07	MR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
32	ICF2-55D	9,59	MR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
33	IBF2- 15 A	13,48	MR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
34	IBB-24A	11,47	MR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II

n	Aislado	EC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Sensibilidad	Producto generado de la digestión <i>EcoRV</i>	Producto generado de la digestión <i>HhaI</i>	Mutación (PCR-PIRA y secuenciación)	Genotipo	Grupo
35	IDF2-49A	10,06	MR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
36	ICF-19C	13,30	MR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
37	IBB-16AR1	13,91	MR	85 y 35	120	-	<i>transposa</i>	II
38	ICF2-60B	8,13	MR	85 y 35	120	-	<i>vacuma</i>	II
39	C1-37-3A	169,17	R	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>transposa</i>	II
40	ICB 14B	570,48	R	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>transposa</i>	II
41	C1-37-4A	145,08	R	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>transposa</i>	II
42	IBF2-16A	3,25E+07	R	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>vacuma</i>	II
43	ICF2-48D	6,98E+03	R	85 y 35	85 y 35	H272R	<i>transposa</i>	II
44	A935A2a2	678,99	R	120	120	H272Y	<i>transposa</i>	II
45	C1-37-4B	1,84E+04	R	120	120	H272Y	<i>transposa</i>	II
46	A919 A3a3	3,27E+03	R	120	120	H272Y	<i>transposa</i>	II
47	ICB-22B	1,12E+09	R	120	120	H272Y	<i>transposa</i>	II
48	IBF-20B	1,04E+05	R	120	120	H272R	<i>transposa</i>	II
49	ICF2-45C	949,57	R	120	120	H272Y	<i>boty</i>	II
50	ICF2-47C	1,76E+04	R	120	120	H272Y	<i>transposa</i>	II

* Análisis de las secuencias (MACROGEN USA)

Apéndice III

Cuadro 1. Porcentaje de los genotipos según las mutaciones detectadas

Tipo de mutación	Tipo de genotipo								Total (n)	Total (%)
	<i>transposa</i>		<i>flipper</i>		<i>vacuma</i>		<i>boty</i>			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
H272R	8	44,44	1	5,56	1	6	0	0,00	10	56
H272Y	7	38,89		0,00	0	0	1	5,56	8	44,45
Total	15	83,33	1	5,56	1	6	1	5,56	18	100

Apéndice IV

Cuadro 1. Número de esclerocios de aislados de distinto nivel de sensibilidad a boscalid de acuerdo al genotipo

n	Aislado	Sensibilidad	Mutación	Genotipo	Esclerocios a los 20 días 20 °C (n)*
1	C1-37-3A	R	H272R	<i>transposa</i>	5
2	ICB-14B	R	H272Y	<i>transposa</i>	1
3	A935A2a2	R	H272Y	<i>transposa</i>	34
4	C1-37-4B	R	H272Y	<i>transposa</i>	0
5	A919 A3a3	R	H272Y	<i>transposa</i>	3
6	ICB-22B	R	H272Y	<i>transposa</i>	18
7	IBF-20B	R	H272R	<i>transposa</i>	6
8	C1-37-4A	R	H272R	<i>transposa</i>	16
9	ICB-22AR1	MR	H272Y	<i>transposa</i>	26
10	IBF-6A	MR	H272R	<i>transposa</i>	34
11	IBB-28C	MR	H272R	<i>transposa</i>	38
12	IBB-26C	MR	H272R	<i>flipper</i>	21
13	IBF-11A	MR	H272R	<i>transposa</i>	1
14	IBF-20A	MR	H272R	<i>transposa</i>	4
15	IBB-27C	MR	Mutación silente	<i>vacuma</i>	17
16	IBF-8A	MR	Mutación silente	<i>vacuma</i>	21
17	IBF-30C	LR	Mutación silente	<i>boty</i>	19
18	IBF-30B	LR	Mutación silente	<i>transposa</i>	20
19	IBF2-16A	R	H272R	<i>vacuma</i>	0
20	ICF2-45C	R	H272Y	<i>boty</i>	6
21	ICF2-47C	R	H272Y	<i>transposa</i>	14
22	ICF2-48D	R	H272R	<i>transposa</i>	0
23	IBF-1A	S	-	<i>vacuma</i>	45
24	C1- 14 A	S	-	<i>transposa</i>	31
25	IBF-18C	S	-	<i>vacuma</i>	20
26	IBF-18B	S	-	<i>transposa</i>	20
27	C1-33-2A	S	-	<i>transposa</i>	11
28	IBF-17A	S	-	<i>vacuma</i>	14
29	IBF-17B	S	-	<i>vacuma</i>	21
30	C1-21C	S	-	<i>transposa</i>	42

*Muestra el promedio del número de esclerocios de 4 repeticiones evaluadas

Apéndice V

B05.10	CCT	GCT	GCC	GAC	TCG	GAG	TCT	TTG	ATC	AAG	ACA	TTC	AAC	ATT	TAC
	Pro	Ala	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Leu	Ile	Lys	Thr	Phe	Asn	Ile	Tyr
IBF-30B	CCT	GCT	GCC	GAC	TCA	GAG	TCT	TTG	ATC	AAG	ACA	TTC	AAC	ATT	TAC
	Pro	Ala	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Leu	Ile	Lys	Thr	Phe	Asn	Ile	Tyr
IBF-30C	CCT	GCT	GCC	GAC	TCA	GAG	TCT	TTG	ATC	AAG	ACA	TTC	AAC	ATT	TAC
	Pro	Ala	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Leu	Ile	Lys	Thr	Phe	Asn	Ile	Tyr
C1-33-2A	CCT	GCT	GCC	GAC	TCG	GAG	TCT	TTG	ATC	AAG	ACA	TTC	AAC	ATT	TAC
	Pro	Ala	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Leu	Ile	Lys	Thr	Phe	Asn	Ile	Tyr
IBB-27C	CCT	GCT	GCC	GAC	TCA	GAG	TCT	TTG	ATC	AAG	ACA	TTC	AAC	ATT	TAC
	Pro	Ala	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Leu	Ile	Lys	Thr	Phe	Asn	Ile	Tyr
IBF-8A	CCT	GCT	GCC	GAC	TCA	GAG	TCT	TTG	ATC	AAG	ACA	TTC	AAC	ATT	TAC
	Pro	Ala	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Leu	Ile	Lys	Thr	Phe	Asn	Ile	Tyr

Figura 8. Alineamiento de secuencias con el gen *sdhB* del aislado de referencia B05.10. (número de accesoión BC1G_13286.1) con las secuencias de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* con la presencia de la mutación silente (LRy MR) y un aislado sensible. En la figura se muestra el reemplazo de un nucleótido G por A, que no produce un cambio de aminoácido serina.