



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE AISLADOS CHILENOS
DE *Botrytis cinerea* Pers. PROVENIENTES DE *Vitis vinifera* L CV. THOMPSON
SEEDLESS CON DISTINTO NIVEL DE SENSIBILIDAD A ESTROBILURINAS**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA Y
AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS AGROPECUARIAS CON MENCIÓN
SANIDAD VEGETAL

CHARLEEN ELIZABETH COPIER ALIAGA

DIRECTOR DE TESIS
MARCELA ESTERIO G.

PROFESORES CONSEJEROS
JAIME AUGER S.
NICOLA FIORE

SANTIAGO - CHILE
2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE AISLADOS CHILENOS
DE *Botrytis cinerea* Pers. PROVENIENTES DE *Vitis vinifera* L CV. THOMPSON
SEEDLESS CON DISTINTO NIVEL DE SENSIBILIDAD A ESTROBILURINAS**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA Y
AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS AGROPECUARIAS CON MENCIÓN
SANIDAD VEGETAL

CHARLEEN ELIZABETH COPIER ALIAGA

	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
Director de Tesis		
MARCELA ESTERIO G. Ingeniero Agrónomo, Mg Sc.	7,0	Aprobado
Profesores Evaluadores/Consejeros		
JAIME AUGER S. Ingeniero Agrónomo, Mg Sc., Ph.D.	7,0	Aprobado
NICOLA FIORE. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,6	Aprobado

Santiago, Chile

2013

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
Aspectos generales de <i>Botrytis cinerea</i>	3
Sintomatología	3
Ciclo de la enfermedad y epidemiología	3
Control	4
Estrobilurinas	4
Resistencia a estrobilurinas	5
Antecedentes moleculares de <i>Botrytis cinerea</i>	6
Reacción en cadena de la polimesasa PCR	6
HIPÓTESIS DE TRABAJO	8
OBJETIVOS DEL TRABAJO	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
MATERIALES Y MÉTODO	9
Lugar de estudio	9
Materiales y reactivos	9
Origen de los aislados de <i>B. cinerea</i>	9
Medios de cultivo	9
Material vegetal	9
Materiales reactivos y equipos	9

METODOLOGÍA	10
Caracterización genética de los aislados seleccionados de <i>Botrytis cinerea</i> con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin	10
Obtención del ADN genómico de <i>Botrytis cinerea</i>	10
Obtención de biomasa	10
Extracción de ADN	10
Cuantificación y calidad del ADN extraído	10
Corroboración de niveles de sensibilidad a azoxystrobin mediante la detección de mutaciones asociadas	11
Separación y visualización de los fragmentos amplificados de ADN	11
Purificación de los productos de PCR	12
Secuenciación de ADN	12
Correspondencia genotípica	12
Caracterización fenotípica de los aislados seleccionados de <i>Botrytis cinerea</i> con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin	13
Caracterización morfológica	13
Capacidad de virulencia	14
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	17
Caracterización genética de los aislados seleccionados de <i>Botrytis cinerea</i> con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin	18
Corroboración de niveles de sensibilidad a azoxystrobin mediante la detección de mutaciones asociadas	18

Correspondencia genotípica	22
Caracterización fenotípica de los aislados seleccionados de <i>Botrytis cinerea</i> con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin	23
Caracterización morfológica	23
Capacidad de virulencia	28
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

La base del control de *Botrytis cinerea* radica en el uso de fungicidas aplicados en los periodos críticos de infección (floración y envero a precosecha). Las estrobilurinas (QoIs) por tener efecto sobre Oídio y también sobre Botrytis son alternativas de control en pre y post-floración. Recientemente, en ciertas regiones de Europa, Norteamérica y Chile se ha detectado el inicio de pérdida de sensibilidad de botrytis a QoIs. La resistencia a este grupo de fungicidas en hongos fitopatógenos estaría asociada a tres tipos de mutaciones en el citocromo b, siendo la principal la mutación G143A (reemplazo de Glicina por Alanina en el codón 143).

El objetivo del presente estudio fue determinar la posible relación entre pérdida de sensibilidad a QoIs, comportamiento del patógeno y presencia de algunas de las 3 mutaciones asociadas. Con este propósito 20 aislados de *B. cinerea* recuperados desde vid y seleccionados según antecedentes previos de sensibilidad a azoxystrobin, fueron caracterizados genéticamente, mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) alelo-específico, para detectar la presencia de las mutaciones asociadas a resistencia a QoIs y mediante PCR-duplex para detectar la presencia de los transposones *Boty* y *Flipper*. La caracterización fenotípica consideró los siguientes parámetros: aspecto miceliar, esporulación, capacidad formadora de esclerocios (medio Agar- Malta (AM) a 20°C), crecimiento miceliar (medio AM a 15, 20 y 25°C), y virulencia sobre bayas cv. Thompson Seedless, con y sin herida a 0 y 20°C.

La totalidad de los aislados considerados inicialmente como resistentes (10) presentaron la mutación G143A, detectándose además la existencia de dos estructuras del gen del citocromo b del patógeno, una con tres intrones en los 10 aislados resistentes y en 5 de los sensibles y otra, con un intrón extra de 1205 pb (detectado por PCR y secuenciación de ADN) en los 5 aislados sensibles restantes. Los veinte aislados correspondieron al genotipo *transposa* y se comportaron similarmente respecto a aspecto miceliar, esporulación, capacidad formadora de esclerocios y virulencia ($P > 0,05$), detectándose solo diferencias en crecimiento miceliar a 20°C, temperatura a la cual los aislados resistentes crecieron significativamente menos que los sensibles ($P < 0,05$).

Palabras clave: Pudrición Gris, resistencia, azoxystrobin.

ABSTRACT

The basis for *Botrytis cinerea* control lies in the use of fungicides applied at critical infection periods (bloom and veraison to preharvest). Strobilurins, for being effective on Powdery Mildew and also on Botrytis, strobilurins (Qols), are control alternatives at pre- and post-bloom. Recently, the onset of loss of Botrytis sensitivity to Qols has been detected in some parts of Europe, North America and Chile. Resistance to this group of fungicides in plant pathogenic fungi would be associated with three mutation types in cytochrome b, with G143A being the main mutation (substitution of alanine for glycine at codon 143).

The aim of this study was to determine the possible relationship between loss of sensitivity to Qols, the pathogen behavior, and the presence of some of the three associated mutations. For this purpose 20 *B.cinerea* isolates, recovered from grapevine and selected according to a previous history of sensitivity to azoxystrobin, were genetically characterized by allele-specific polymerase chain reaction (PCR) for the presence of mutations associated with resistance to Qols and by duplex PCR to detect the occurrence of transposable elements *Boty* and *Flipper*. Phenotypic characterization considered the following parameters: mycelial aspect, sporulation, sclerotium forming ability (malt agar (MA) medium at 20°C), mycelial growth (MA medium at 15, 20 and 25°C), and virulence on 'Thompson Seedless' wounded and nonwounded berries at 0 and 20°C.

All the initially-considered resistant isolates (10) showed the G143A mutation. Besides, the occurrence of two structures of cytochrome b gene of the pathogen was detected, one with three introns in the ten resistant isolates and in five of the sensitive ones, and the other with an extra intron of 1205 bp (detected by PCR and DNA sequencing) in the five remaining sensitive isolates. The 20 isolates corresponded to the *transpose* genotype and behaved similarly with respect to mycelial aspect, sporulation, sclerotium forming ability and virulence ($P>0.05$), with differences being detected only in mycelial growth at 20°C, temperature at which resistant isolates grew significantly less than the sensitive ones ($P<0.05$).

Key words: gray mold, resistance, azoxystrobin

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aspectos generales de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers. (fase teleomorfa *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), hongo que pertenece al Phylum Ascomycota, clase Ascomycete, agente causal de la pudrición gris en la vid, es el responsable de importantes pérdidas económicas en la producción de éste y otros cultivos en el país como también en el resto del mundo (Esterio, 2005).

Botrytis corresponde a un patógeno necrotrófico que ataca a más de 200 especies diferentes de plantas (Jarvis, 1977). Sin embargo, en estudios moleculares realizados, señalan la existencia de un alto grado de diferenciación genética y algún nivel de especificidad de aislados del hongo con respecto a hospederos (Muñoz *et al.*, 2002).

Sintomatología

En el caso de la vid, botrytis infecta todos los órganos de la planta en sus diferentes estadios de desarrollo, manifestándose en hojas, zarcillos y sarmientos como en flores y en frutos. El mayor daño se produce cuando ataca el racimo antes, durante y después de la floración (McClellan y Hewitt, 1973; Pastor, 1980; Auger, 1981) y posteriormente de envero en adelante, coincidiendo con la disminución en las bayas de compuestos antifúngicos, tales como: ácido glicólico, taninos y fitoalexinas como el resveratrol, expresándose la infección latente generalmente asociada a la base de la baya y pedicelo (Pastor, 1980; Holz *et al.* 2003, Keller *et al.*, 2003). Las bayas infectadas presentan generalmente una pudrición de consistencia acuosa y de color grisáceo dado por el crecimiento fungoso y abundante esporulación (Latorre, 1986). Cuando se presentan lluvias cercanas a cosecha se produce el síntoma de “piel suelta” que se manifiesta como manchas pardo violáceas sobre la cutícula de las bayas, la que se desprende fácilmente al ser presionada, dejando la pulpa intacta (Auger, 1981). Las pudriones ocurridas durante precosecha son evidenciadas en poscosecha, principalmente cuando la cadena de frío es interrumpida durante el periodo de almacenamiento y transporte de la fruta a mercado de destino (Esterio, 2005).

Ciclo de la enfermedad y epidemiología

El desarrollo de *Botrytis cinerea* requiere de ciertas condiciones de humedad y temperatura; el micelio requiere para su desarrollo de un clima húmedo y templado (18 a 23C°). En cambio, la esporulación, liberación y germinación de conidias, puede presentarse incluso a bajas temperaturas (Agrios, 1996). La producción de esporas ocurre en rangos de

temperaturas fluctuantes entre 15 y 20°C, y las condiciones óptimas de germinación corresponden a 20°C y humedad relativa de 90% (Auger, 1981).

El patógeno se caracteriza por sobrevivir bajo condiciones poco favorables para su desarrollo mediante la producción de pseudotejidos parenquimatosos llamados esclerocios formados por micelio compactado, que son de consistencia dura, exteriormente de color negro y blanco en su interior y que corresponde a una de las formas de reservorio del patógeno (Auger, 1987). También el hongo puede sobrevivir en forma de micelio saprofítico en restos de plantas afectadas (Auger, 1981; Auger y Esterio, 1997 a).

En su fase teleomorfa produce ascosporas en apotecios, aunque su ocurrencia en la naturaleza es poco frecuente (Agrios, 1997). Sin embargo, por el alto grado de variabilidad y el proceso de especiación detectado en botrytis durante los últimos años se piensa que este componente debería estar presente, ya que la fase teleomorfa es la principal causa de variación en los organismos. Por otro lado también es importante señalar que los esclerocios corresponden a uno de los componentes esenciales para que se forme la fase sexual del hongo (Raposo *et al.*, 2001).

Control

El manejo de la enfermedad se realiza mediante control integrado, abarcando prácticas culturales realizadas en campo, durante el periodo de crecimiento del racimo, como: manejo de la canopia, fertilizaciones balanceadas y arreglo del racimo y control químico preventivo mediante fungicidas de acción botryticida, aplicados en los estadios más susceptibles a la infección (floración, envero y precosecha), y en el caso de uva de mesa de exportación, en poscosecha, mediante el uso de anhídrido sulfuroso (Pastor, 1980; Auger, 1981; 1983; 1987; Latorre, 1986). En algunos casos el manejo del patógeno no ha sido satisfactorio provocando pérdidas económicas para el país (Esterio, 2005). Las principales causas del deficiente control son el uso inadecuado de fungicidas según estadio fenológico, problemas de pérdida de sensibilidad a fungicidas, composición genética de las poblaciones predominantes y variaciones en la dinámica poblacional del hongo, aspectos que han sido evidenciados por estudios moleculares realizados en Francia y Chile (Giraud *et al.*, 1997; 1999; Muñoz *et al.*, 1999; 2002; Esterio, 2005).

Estrobilurinas

Las estrobilurinas (Qols) como azoxystrobin, utilizadas principalmente para el control de oídio, han sido bastante efectivas en el manejo de ciertos patógenos como es el caso de la pudrición gris en varios cultivos dentro de los que se incluyen vegetales y especies ornamentales (Jiang *et al.*, 2009). En la actualidad existen al menos 12 fungicidas pertenecientes a este grupo, que se encuentran relacionados químicamente, presentando un

modo de acción similar, inhibición de la transferencia del electrón en el sitio Qo del complejo mitocondrial III (Brent and Hollomon, 2007).

Este grupo de moléculas posee un amplio espectro de acción, ya que pueden controlar una variada gama de especies fúngicas como las clases ascomicetes, basidiomicetes, deuteromicetes y oomicetes (Ammermann *et al.*, 2000).

Al respecto es importante señalar que se ha demostrado que las Qols poseen un efecto tóxico sobre el crecimiento y la morfología de los patógenos, afectando la germinación de esporas, el crecimiento micelial y la esporulación, siendo por ello su acción de carácter preventivo, curativo y erradicante (Markoglou *et al.*, 2006). Además de su efecto directo sobre los patógenos, estos fungicidas pueden provocar alteraciones fisiológicas positivas en muchos cultivos, especialmente en los cereales, dando lugar a la retención del tejido verde de la hoja y mejoras significativas en el rendimiento (Grossmann and Reztlaff, 1997).

Resistencia a estrobilurinas

Con el paso del tiempo el control de *B. cinerea* ha sido más dificultoso, uno de los factores responsables es el desarrollo progresivo de resistencia a fungicidas, debido a su intensiva utilización. Un ejemplo de ello es la resistencia detectada en el hongo a los benzimidazoles, presente en la mayoría de los aislados y la resistencia a dicarboximidas, de carácter menos estable (Auger y Esterio, 1997 b).

En relación a las estrobilurinas, luego de dos años de su introducción se observó una marcada pérdida de acción en contra del Mildiú, asociado con poblaciones de alta resistencia en cultivos de trigo en Alemania, y poco después en todo el noreste de Europa. (Chin *et al.*, 2001). Posteriormente graves problemas de resistencia se han detectado en otros patógenos (*Mycosphaerella graminícola*, *Plasmopara vitícola*, *Venturia inaequalis* y *Mycosphaerella fijiensis*) (Brent and Hollomon, 2007).

En la mayoría de los casos la resistencia a las estrobilurinas es producida por una mutación puntual en el citocromo b. La mutación principal es generada por un cambio de aminoácido en donde se reemplaza glicina por alanina (G143A) en el codón 143. Una segunda mutación puntual ocurre en el codón 129 en donde se reemplaza fenilalanina por leucina (F129L). Adicionalmente, se ha descrito una tercera mutación en donde se reemplaza glicina por arginina en el codón 137 (G137R) (Gisi *et al.*, 2002).

Es importante señalar que aislados que poseen la mutación G143A se expresan con una resistencia alta (R. completa) y los aislados que presentan las mutaciones F129L o G137R se expresan como una resistencia moderada (R. parcial). Las dosis de estrobilurinas recomendadas por los fabricantes se muestran eficaces para el control de enfermedades cuando se presentan las mutaciones F129L y G137R. En cambio cuando predominan los aislados con la mutación G143A se observa una pérdida de eficacia en el control de

enfermedades. Por otro lado es importante señalar que el incremento de poblaciones con esta mutación se ha detectado generalmente cuando las estrobilurinas se utilizan solas (FRAC, 2006).

Antecedentes moleculares de *Botrytis cinerea*

Durante la última década, resultados obtenidos mediante el uso de técnicas moleculares, particularmente PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), señalan que *B. cinerea* estaría conformada por al menos dos grupos crípticos denominados *vacuma* y *transposa*, ambos diferenciados sólo en base a la presencia o ausencia de dos tipos de transposones o elementos transponibles: *Boty* y *Flipper*, en el genoma del hongo y que ambos tipos genéticos se encontrarían simpátricamente en la vid (Giraud *et al.*, 1997).

El genotipo botrytis *transposa* presenta las secuencias transponibles *Boty* y *Flipper*. *Boty* corresponde a una secuencia de 6 Kilobases (Kb) perteneciente a la familia de retrotransposones del tipo gypsy (Diolez *et al.*, 1995) y *Flipper* a un elemento de clase II correspondiente a una secuencia de 1842 pares de bases (pb) descubierto como una inserción en el gen codificante para la enzima nitrato reductasa (Levis *et al.*, 1997). El genotipo *vacuma* no presentaría estas secuencias. Además, algunos aislados presentan solo la secuencia transponible *Boty* o *Flipper* (Giraud *et al.*, 1997).

En la vid aislados *vacuma* son menos estables, heterogéneos y a menudo se encuentran en tejidos asintomáticos en inicio de floración (asociados a follaje), tendiendo a disminuir hacia la cosecha e incrementándose hacia el receso invernal. Los aislados *transposa* son más estables y uniformes, poseen una mayor capacidad parasítica, ya que están asociados frecuentemente a infecciones en bayas (Giraud *et al.*, 1999). Así mismo, la virulencia del patógeno es mayor en bayas al existir una vía expuesta. Los aislados correspondientes al genotipo *transposa* presentan niveles de agresividad similar a los aislados *vacuma* y superior a los que presentan sólo *boty*. A una temperatura de incubación de 18°C *vacuma* es más agresivo, a 0°C los aislados *transposa* presentan mayor virulencia que *boty* y *vacuma* (Esterio, 2005).

Además en otros estudios se ha detectado que existe una mayor similaridad en aislados colectados desde un determinado hospedero, lo que señala algún grado de especificidad entre las poblaciones de *B. cinerea* y las plantas hospederas (Giraud, 1999; Muñoz *et al.*, 2002; Thompson y Latorre, 1999).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las técnicas moleculares son ampliamente utilizadas en la detección de genes resistentes a los fungicidas en las poblaciones de patógenos (Ma and Michailides, 2005). Han

proporcionado nuevas oportunidades para una detección rápida y viable de patógenos resistentes a fungicidas una vez que los mecanismos de resistencia a nivel molecular se han determinado (Ma *et al.*, 2003).

PCR es una de estas técnicas, que comprende la síntesis enzimática, *in vitro*, de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa, se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos utilizados como iniciadores que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena “blanco” de la amplificación. Estos iniciadores son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias que flanquean la región “blanco” (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La facilidad, rapidez, versatilidad y sensibilidad de esta técnica, la hace particularmente importante para los estudios genéticos-moleculares que incluyen gran número de individuos de cualquier organismo vivo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Es importante señalar que usando la metodología de PCR dúplex, consistente en la amplificación simultánea de secuencias parciales de los retrotransposones *Boty* y *Flipper*, es posible, en una misma reacción, identificar rápidamente los genotipos de *Botrytis cinerea* (Muñoz *et al.*, 2002).

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Los aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de diferente sensibilidad a azoxystrobin presentan diferencias genéticas y fenotípicas.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Objetivo general

- Caracterizar genética y fenotípicamente a aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Objetivos específicos

- Caracterizar aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de diferente sensibilidad a azoxystrobin recuperados desde vid (n=20), según la presencia de mutaciones en la secuencia del gen citocromo b, asociadas a resistencia del patógeno.

- Determinar la correspondencia genotípica de los aislados seleccionados de *Botrytis cinerea* (*vacuma*, *transposa*, *boty* y *flipper*).

-Caracterizar fenotípicamente los mismos aislados de *B. cinerea* con respecto a su morfología: aspecto miceliar, capacidad formadora de esclerocios, crecimiento miceliar y nivel de esporulación, y de su agresividad (virulencia) a 0°C y 20°C.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar de estudio

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

Materiales y reactivos

Origen de los aislados de *B. cinerea*

Los aislados de *B. cinerea* (n=20) que se utilizaron en el estudio 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 fueron seleccionados según antecedentes de sensibilidad a azoxystrobin determinados en estudios previos.

Medios de cultivo

Agar-Malta-Levadura (AML): Recuperación y cultivo de aislados de *B. cinerea* para posterior extracción de ADN.

Agar-Malta (AM): Caracterización morfológica de aislados de *B. cinerea*.

Glucosa-Fosfato (PG): Pruebas de sensibilidad *in vitro*.

Agar-Papa-Dextrosa (PDA): Pruebas de virulencia *in vivo*

Material vegetal

Bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless (16.5° Brix) sobre las cuales se efectuaron los ensayos de virulencia, *in vivo*, de los aislados seleccionados de *B. cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Materiales, reactivos y equipos

Los materiales, reactivos y equipos utilizados en las distintas etapas de esta investigación son los de uso habitual para la obtención de aislados y biomasa de *Botrytis cinerea*, metodologías de extracción, amplificación de fragmentos de secuencias de ADN del hongo mediante PCR y en la visualización electroforética de estos.

METODOLOGÍA

Previo a los análisis se corroboró el nivel de sensibilidad, *in vitro*, a azoxystrobin, de los veinte aislados de *B. cinerea* seleccionados, en base germinación conidial y para ello se preparó una suspensión de cada aislado equivalente a 1×10^5 conidias/mL en agua destilada estéril. Se sembraron 200 μ L de la suspensión sobre las placas de Petri conteniendo medio PG más el fungicida en las siguientes concentraciones: 0; 0,04; 0,2; 1; 5; 25; 50; 100 ppm. Luego de 18 horas de incubación en oscuridad a 18°C se observaron bajo un microscopio las conidias, contándose un total de 100 y determinando cuantas de estas estaban germinadas. Se consideró conidia germinada cuando ésta presentaba un tamaño de tubo germinativo igual a 3 veces el tamaño de la conidia.

Los valores obtenidos permitieron ratificar el nivel de sensibilidad determinado en pruebas anteriores (EC₅₀: concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de la germinación del hongo).

Caracterización genética de los aislados seleccionados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Se realizó mediante las siguientes etapas:

Obtención del ADN genómico de *B. cinerea*

Obtención de biomasa: Se cultivó micelio de los distintos aislados de *B. cinerea* en medio nutritivo Agar Malta Levadura incubándose por un periodo de 5 a 6 días a 20°C y humedad de 60%, hasta obtener un crecimiento miceliar superficial en capa uniforme y con esporulación. A partir de la capa miceliar obtenida se recuperó 10 gramos de la biomasa del hongo y se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL.

Extracción de ADN: Se realizó mediante el protocolo del DNeasy plant mini kit (QUIAGEN).

El ADN obtenido de cada aislado fue disuelto en 50 μ L de agua y una alícuota de 1 μ L de esta dilución fue utilizada para la amplificación de PCR.

Cuantificación y calidad del ADN extraído: La cantidad y calidad del ADN obtenido 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 260 nm señala la concentración de ácido nucleico en la muestra y la relación entre ambas lecturas permitió estimar la pureza del ADN extraído y la posible contaminación con proteínas y/o fenoles. Para determinar la integridad del ADN y la ausencia de ARN, se realizó en cada una de las

extracciones una electroforesis en gel de agarosa 0,8% por una hora a 95 volts, en buffer Tris Borato (TBE) 1X (Sambrook *et al.*, 1989).

Corroboración de niveles de sensibilidad a azoxystrobin mediante la detección de mutaciones asociadas

Con este propósito por medio de la técnica de PCR se amplificó parte de la secuencia del citocromo b de *Botrytis cinerea* para determinar si los aislados correspondían realmente a aislados resistentes o sensibles a azoxystrobin (Jiang *et al.*, 2009).

CUADRO 1. Secuencias de los partidores, productos esperados y mutación incluida en el fragmento amplificado (Jiang *et al.*, 2009).

Partidores	Secuencia 5'-3'	Fragmento amplificado (bp)	Mutación puntual incluida en amplicón
BcAR-R BcAR-F	ACCATCTCCATCCATCCACCATACCT GGCAAATGTCACTGTGAGC	260	codón 143
cytb129-R cytb129-F	CCGTCTGGCGTCACTATAAAT GCATAAAGCATTGGGGCTAA	978	codón 129
cytb-BcR cytb-BcF	CCATCTCCATCCACCATACCT TAAAGTGGTATAACCCGACGG	564 y 1792	codones 137 y 143

La mezcla de PCR que se utilizó en la reacción fue establecida en el estudio y consistió en un volumen final de 25 µL por muestra, la que incluyó: 2.5 µL de Buffer PCR 10X, 1 µL 10mM dNTP's; 1 µL de 5µM de los partidores antes descritos según la reacción, 0.75 µL de 50 mM MgCl₂; 1 µL de 5 ng de ADN; 0,25 µL de 5U/µL *Taq* ADN polimerasa, completándose el volumen con agua destilada ultra pura.

El programa de amplificación correspondió al mismo utilizado por Jiang *et al.* (2009).

Separación y visualización de los fragmentos amplificados de ADN: La verificación de las reacciones de amplificación se realizó en geles de agarosa al 1,5%, utilizándose como carga 10 µL de cada mezcla de reacción amplificada más 2 µL de buffer de carga 6X, considerándose además de los productos obtenidos en la reacción de PCR, un marcador de longitud de ADN "ladder" de 100 pb. La electroforesis se realizó por el periodo de 1 hora a 95 volts. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron visualizados mediante un transiluminador UV de onda corta Vilber Lourmat y fotografiados con un equipo digital Canon Power Shot A650 IS, con filtro para luz UV (Sambrook *et al.*, 1989).

Purificación de productos de PCR: Con este propósito se cortaron con bisturí estéril las bandas de ADN amplificadas en el gel de agarosa, bajo un transiluminador UV de onda corta Vilber Loumart. Posteriormente las bandas así cortadas se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL y luego se pesaron. El ADN obtenido fue purificado de acuerdo al protocolo del Ultra clean 15 DNA purification kit (MO BIO Laboratories inc.), obteniendo finalmente entre 30 - 40 μ L de ADN puro.

Secuenciación de ADN: La secuenciación de ADN purificado, fue realizada por MACROGEN CORP USA. El alineamiento de cada secuencia del gen del citocromo b del patógeno fue realizado con el programa Vector NTI suite 7. Se utilizó de referencia la secuencia genómica del citocromo b de *Botrytis cinerea* descrita en el NCBI, que presenta sólo la mutación G143A (N° de acceso AB262969) y con la descrita, para el gen de referencia que posee el intrón extra (N° de acceso FJ217744) y que no presenta mutaciones.

Correspondencia genotípica

Para confirmar la presencia de los elementos transponibles *Boty* y *Flipper* en los 20 aislados seleccionados se utilizó la técnica de PCR dúplex siguiendo la metodología descrita por Muñoz *et al.* (2002). Los partidores que se utilizaron para detectar *Boty* fueron: LTR 98: 5'AGCCTGTAGAATCACCAACG3' y LTR 728: 5'CGGTATTTCTGGTTGGCA3', que amplifican 648 pares de base (pb) de la región LTR (Long Terminal Repeat) del transposón *Boty* en las posiciones 98-745 de la secuencia (Diolez *et al.*, 1995).

Para detectar *Flipper* los partidores que se utilizaron fueron:

F14: 5'GCACAAAACCTACAGAAGA3' y

F304: 5'ATTCGTTTCTTGGACTGTA3', que amplifican 1250 pares de base (pb) (Levis *et al.*, 1997).

La mezcla de PCR dúplex para la detección de ambos transposones en una misma reacción fue la descrita por Muñoz *et al.*, (2002), consistente en un volumen final de 20 μ L por muestra, la que incluyó: 2 μ L de Buffer PCR 10X; 0,5 μ L de 10mM dNTP's; 0,4 μ L de 5 μ M de los partidores LTR 98, LTR 728, FLIP 14 y FLIP 304; 1,2 μ L de 50 mM MgCl₂; 1 μ L de 5 ng de ADN; 0,2 μ L de 5U/ μ L *Taq* ADN polimerasa, completándose el volumen final con agua destilada ultra pura.

El programa de amplificación correspondió al utilizado por Muñoz *et al.* (2002).

Luego se realizó la separación y visualización de los fragmentos amplificados de ADN, del modo anteriormente señalado (Sambrook *et al.*, 1989).

Caracterización fenotípica de los aislados seleccionados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Caracterización morfológica

A partir de los 20 aislados en estudio y mantenidos en incubación en medio AM, se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro, los que se dispusieron en placas de Petri conteniendo medio AM, manteniéndose en incubación a oscuridad continua y a distintas temperaturas según condición a evaluar.

La caracterización morfológica se realizó según los criterios adoptados por Esterio (2005), y consideró la evaluación de los siguientes parámetros: aspecto miceliar, esporulación (€), capacidad formadora de esclerocios (Cfe) y crecimiento miceliar.

El aspecto miceliar, esporulación y capacidad formadora de esclerocios de los distintos aislados fueron evaluados en tres oportunidades (10, 15 y 20 días post siembra a 20°C), clasificándose para el caso de aspecto miceliar y capacidad formadora de esclerocios en categorías o clases morfológicas “miceliales” o “esclerociales” cuando presentaron un predominio de éstas según la clasificación descrita por Martínez *et al.* (2003). (Véase Cuadro 2).

Para establecer el nivel de esporulación de los 20 aislados de *B. cinerea* en estudio, se dividió la placa, en forma imaginaria, en cuatro partes iguales y se extrapoló el porcentaje final por placa. Se clasificaron en cuatro niveles arbitrariamente establecidos (0 a 3), en donde 0 correspondió a la ausencia total de esporulación y 3 a esporulación profusa (Cuadro 2).

Para el crecimiento miceliar las placas fueron sometidas a tres temperaturas de incubación: 15, 20 y 25°C, la evaluación fue diaria hasta el 5° día post siembra para la 2° y 3° temperatura y hasta el 6° día para la 1° temperatura, midiéndose en cada oportunidad el diámetro medio de crecimiento miceliar.

Cuadro 2. Escalas de evaluación utilizadas en la caracterización morfológica de los aislados de *B. cinerea* (Martínez *et al.*, 2003).

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

¹ Niveles arbitrariamente establecidos por Esterio (2005) considerando los criterios utilizados por Martínez *et al.* (2003).

Capacidad de virulencia

El nivel de virulencia de los 20 aislados de *Botrytis cinerea* seleccionados se determinó mediante inoculación de una suspensión conidial sobre bayas del cv. Thompson Seedless con pedicelo incluido, con heridas y sin heridas.

Previo a la inoculación, 2500 bayas fueron desinfectadas mediante inmersión en hipoclorito de sodio (1%) por 1 minuto, luego lavadas con abundante agua destilada estéril y secadas sobre papel absorbente estéril, posteriormente fueron dispuestas en cajas plásticas transparentes estériles, con papel absorbente estéril humedecido en su base con agua destilada estéril.

La inoculación con herida, se efectuó con una aguja de disección esterilizada dispuesta a una profundidad no mayor a 2 mm en una zona previamente demarcada en la baya. La inoculación se realizó sobre la zona previamente demarcada aplicando una alícuota de 10 µL de una suspensión equivalente a 1×10^5 conidias/mL, determinada mediante un hemacitómetro y preparada a partir de cultivos puros de los aislados del hongo de 7 a 10 días de edad mantenidos en APD. Luego las bayas se incubaron a dos temperaturas, 0 y 20°C.

Las evaluaciones se realizaron con intervalos de 24 horas de incubación a partir del momento de la inoculación. En las bayas mantenidas a 20°C, las mediciones se realizaron diariamente durante tres días y en las bayas mantenidas a 0°C hasta diez días post inoculación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la corroboración de los niveles de sensibilidad a azoxystrobin se consideró un diseño experimental completamente aleatorizado con estructura factorial 2 x 8 (2 categorías de sensibilidad: sensibles y resistentes y ocho concentraciones del producto). Los datos obtenidos, fueron analizados mediante Test de Probit utilizándose el programa MINITAB N° 15 para determinar niveles de sensibilidad mediante valores EC_{50} .

Para aspecto miceliar, esporulación y capacidad formadora de esclerocios se consideró un diseño completamente al azar. La determinación del grado de asociatividad entre el nivel de sensibilidad de los aislados y su pertenencia a una clase morfológica específica se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado (X^2). Para esporulación los datos se transformaron mediante Rangos, realizando una análisis de varianza (One way).

Para el caso del crecimiento miceliar se utilizó un diseño completamente al azar con estructura factorial 2 x 3 [dos categorías de sensibilidad a azoxystrobin (sensible y resistente) y tres temperaturas de incubación (15, 20 y 25°C)]. Los resultados obtenidos correspondientes al promedio de crecimiento miceliar diario fueron analizados mediante un ANDEVA y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$).

En el caso de la virulencia el diseño fue completamente al azar con estructura factorial 2 x 2 x 2, [dos categorías de sensibilidad (sensible y resistente), dos formas de exposición al inóculo (con y sin herida) y dos temperaturas de incubación (0 y 20°C)]. Los resultados obtenidos (diámetro de la lesión en mm) se analizaron mediante ANDEVA y prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

En todos los parámetros antes indicados se consideró un total de tres repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue la placa de Petri, con excepción de la determinación de virulencia en donde la unidad experimental fue la baya.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de sensibilidad *in vitro*

Según Leroux *et al.* (2010), la concentración discriminadora de sensibilidad para azoxystrobin es de 10 ppm; los resultados obtenidos en los análisis de sensibilidad permiten corroborar que todos los aislados de *B. cinerea* considerados, según determinaciones previas como resistentes a azoxystrobin presentaron valores EC₅₀ superiores a 10 ppm y los sensibles valores EC₅₀ inferiores a 10 ppm (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores EC₅₀ de los aislados *B. cinerea*, según comportamiento de germinación conidial en PG enmendado con distintas concentraciones de azoxystrobin.

Aislados de <i>B. cinerea</i>	EC ₅₀ promedio (ppm)	Sensibilidad
2A	455,1	resistente
PC12D	112,6	resistente
CR22T	132	resistente
18D	495,4	resistente
188	129,4	resistente
AC3G	81,2	resistente
ANP6E	127,8	resistente
CR50F	198,3	resistente
CC19F	182,9	resistente
184	226,2	resistente
AC3D	0,35	sensible
ANP3F	0,39	sensible
47C	0,4	sensible
CC22B	0,4	sensible
AC1E	0,28	sensible
ANP3H	0,31	sensible
ANP2C	0,35	sensible
22F	0,53	sensible
1E	1,05	sensible
CR50H	0,84	sensible

Caracterización genética de los aislados seleccionados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Corroboración de niveles de sensibilidad a azoxystrobin mediante la detección de mutaciones asociadas

Los partidores cytb129-F y cytb129-R amplificaron 978 pb en los 20 aislados en estudio (figura 1). Al comparar las secuencias nucleotídicas obtenidas con la secuencia de referencia (figura 2) se observó una completa identidad, lo que indica que no está presente la mutación F129L en los 20 aislados analizados.

Es importante señalar que la mutación F129L corresponde al reemplazo de Fenilalanina por Leucina, que presenta el cambio del codón TTC, en la posición 129, por TTA, TTG, CTC, que codifican para Leucina (Semar *et al.*, 2006).

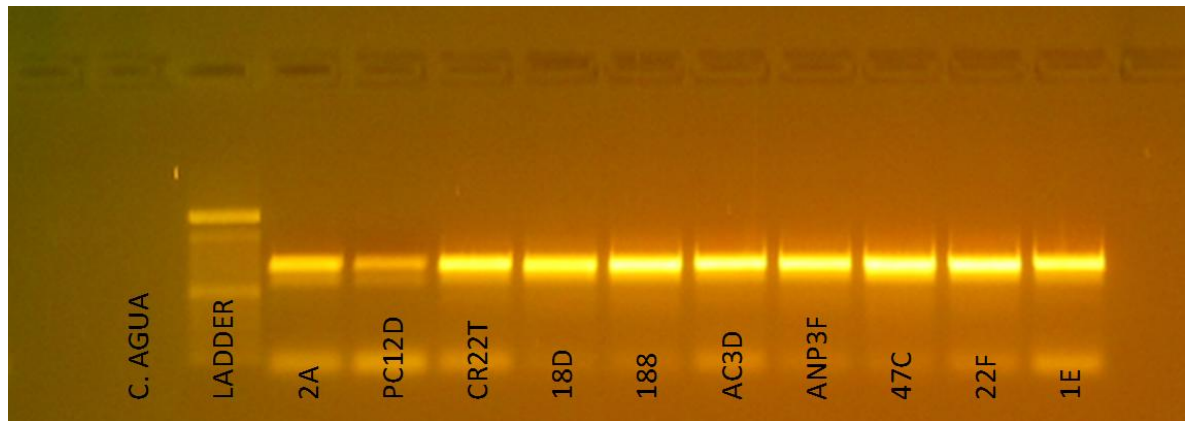


Figura 1. Visualización de los productos generados mediante PCR usando los partidores cytb129-F y cytb129-R en los aislados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

	2222	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310
<i>B. Fuckelliana cytb gen FJ217741</i>	2222	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
PC12D cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
CR50H cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
CR50F cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
CR22T cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
CC22B cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
CC19F cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
ANP6E cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
ANP3H cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
ANP3F cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
ANP2C cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
AC3G cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
AC3D cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
AC1E cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
47C cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
2A cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
22F cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
1E cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
18D cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
188 cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						
184 cytb-129	304	GGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTACAGCTTTC	TTGGGTTATAAACATAGCCCCAAATGGTTTAATATAAATAA	AAAGGAAATACAATAAA						

Figura 2. Alineamiento mutación posición 129. No existe reemplazo de Fenilalanina por Leucina (el codón TTC no cambia a TTA, TTG o CTC).

Por otro lado al utilizar los partidores cytb-BcF y cytb-BcR éstos amplificaron dos tamaños diferentes de fragmentos en los 20 aislados en estudio, uno de 1792 pb y el otro de 564 pb (figura 3). Es importante destacar que ninguno de los aislados amplificó ambos fragmentos, debido a que el citocromo b de *B. cinerea* posee dos estructuras diferentes (Banno *et al.*, 2009).

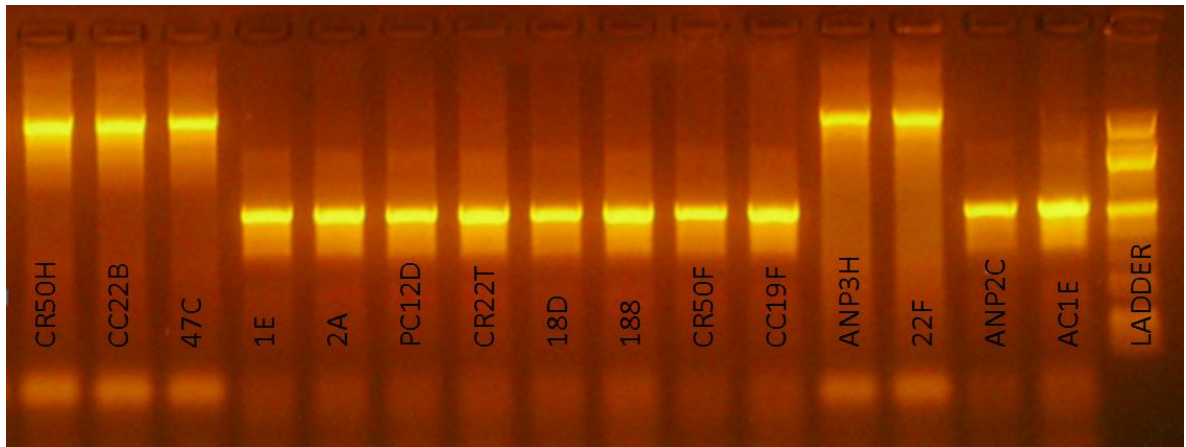


Figura 3. Visualización de los productos generados mediante PCR usando los partidores cytb-BcF y cytb-BcR en los aislados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Los aislados que presentaron un tamaño de amplificación de 564 pb poseen tres intrones en el citocromo b, el primero de ellos inserto entre el codón 67 y 68, el segundo inserto entre el codón 131 y 132 y el tercero inserto en el codón 164. Los aislados que presentan un tamaño de amplificación de 1792 pb poseen un intrón extra de 1205 pb entre el codón 143 y 144. Este intrón pertenece al grupo 1, presenta un ORF (Open Reading Frame) que codifica una ARNm madurada (Banno *et al.*, 2009) y es común en genes mitocondriales de hongos que codifican componentes del sistema de transporte de electrones y genes RNA ribosomales (Grasso *et al.*, 2006). Es importante destacar que los aislados que presentan

este intrón corresponden sólo a aislados sensibles (Jiang *et al.*, 2009). Puesto que cuando está presente el intrón más la mutación G143A (aislado resistente) no permite el correcto apareamiento de la secuencia exónica con la secuencia intrónica IGS (Internal Guide Sequence) de la molécula pre-ARNm, afectando el proceso de splicing (procesamiento de ARNm), provocando un déficit de citocromo b. Por lo tanto esta sustitución es letal para los individuos que llevan este intrón (Grasso *et al.*, 2006).

Por otro lado al comparar la secuencia nucleotídica obtenida con la secuencia nucleotídica de referencia (figuras 4, 5 y 6), se detectó la ausencia de la mutación G137R en los 20 aislados analizados. Es importante señalar que la mutación G137R, corresponde al reemplazo de Glicina por Arginina, que presenta el cambio del codón GGG, en la posición 137, por AGG o CGG, que codifican para Arginina (Sierotzki *et al.*, 2006).

También es importante señalar que la mutación G143A solo se detectó en los aislados resistentes (figuras 4, 5, y 6) y el intrón extra sólo en los sensibles.

	3620	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
B. Fuckeliana cytb gen FJ217741	3620	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
PC12D-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
CR50F-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
CR22T-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
CC19F-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
ANP6E-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
AC3G-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
2A-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
18D-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
188-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
184-cytb-Bc	278	AGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710

Figura 4. Alineamiento mutación posición 137 en aislados *B. cinerea* resistentes que amplifican 564 pb. No existe reemplazo de Glicina por Arginina (codón GGG no cambia a AGG o CGG). Además se puede apreciar la mutación G143A en la secuencia de referencia.

	3602	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	
B. Fuckeliana cytb gen FJ217741	3602	AAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700
ANP3F-cytb-Bc	260	AAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700
ANP2C-cytb-Bc	260	AAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700
AC3D-cytb-Bc	260	AAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700
AC1E-cytb-Bc	260	AAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700
1E-cytb-Bc	260	AAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700

Figura 5. Alineamiento mutación posición 137 en aislados *B. cinerea* sensibles que amplifican 564 pb. No existe reemplazo de Glicina por Arginina (codón GGG no cambia a AGG o CGG). Además se puede apreciar la mutación G143A en la secuencia de referencia.

	3629	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740	
citocromo b + intrón	3629	AAITTTATAAATAAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740
CR50H-cytb-Bc i	205	AAITTTATAAATAAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740
CC22B-cytb-Bc i	205	AAITTTATAAATAAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740
ANP3H-cytb-Bc i	205	AAITTTATAAATAAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740
47C-cytb-Bc i	205	AAITTTATAAATAAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740
22F-cytb-Bc i	205	AAITTTATAAATAAAGTTGTTTGTACGGATAAGTTTGTATTTTGTATGTTCTGCCCTAC	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740

Figura 6. Alineamiento mutación posición 137 en aislados *B. cinerea* sensibles que amplifican 1792 pb. No existe reemplazo de Glicina por Arginina. (codón GGG no cambia a AGG o CGG). No se presenta la mutación G143A en la secuencia de referencia (N° de acceso FJ217744).

Los partidores BcAR-F y BcAR-R amplificaron 260 pb. sólo en los 10 aislados resistentes (figura 7) (EC_{50} azoxystrobin > 10 ppm). Con los aislados sensibles no se obtuvo amplificación debido a que éstos no presentan la mutación G143A, para la cual fueron diseñados los partidores alelo-específicos (Jiang *et al.*, 2009).

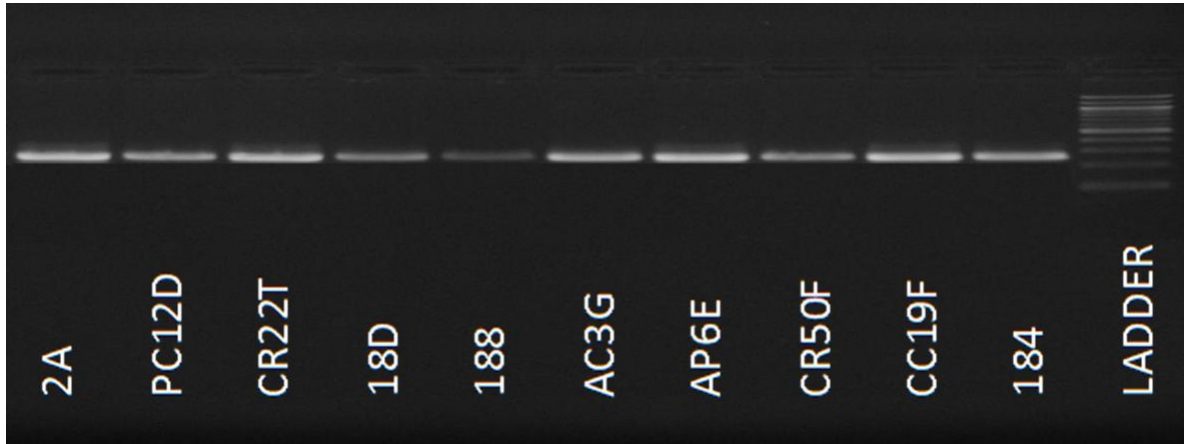


Figura 7. Visualización de los productos generados mediante PCR usando los partidores BcAR-F y BcAR-R en los aislados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Así mismo, la comparación de las secuencias entre aislados resistentes y el gen de referencia (con la mutación G143A) muestra que una de las bases de la secuencia nucleotídica GGT, en el codón 143, presente originalmente, es reemplazada por GCT en los aislados resistentes, lo cual produce un cambio de Glicina por Alanina. Por lo tanto la secuencia de los diez aislados analizados es idéntica a la secuencia genética de referencia (figura 8) (Jiang *et al.*, 2009).

	3650	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740
B. Fuckeliana cytb gen FJ217741	3650	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
PC12D-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
CR50F-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
CR22T-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
CC19F-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
ANP6E-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
AC3G-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
2A-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
18D-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
188-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT
184-BcAR	1	GCAAATGTCAC	TGTGAGCT	SCTACAGTTATT	TACAAATCTT	TAGAGTGCTGT	TACCATGAATT	GGACAAGATATT	GTTGAGTCA	AACCAACACA	AAATATATAT

Figura 8. Alineamiento mutación posición 143 en aislados resistentes. Existe reemplazo de Glicina por Alanina (codón GGT cambia a GCT), no existen diferencias entre la secuencias de los 10 aislados resistentes y el gen de referencia puesto que este último presenta la mutación G143A.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten demostrar que los aislados chilenos de *Botrytis cinerea* que presentan pérdida de sensibilidad a azoxystrobin presentan sólo la mutación G143A, los cuales fueron categorizados inicialmente como resistentes y que en las pruebas de sensibilidad obtuvieron valores EC_{50} de germinación conidial superior al punto de corte de sensibilidad establecido para esta molécula (EC_{50} = 10 ppm), por lo tanto

esta mutación (G143A) sería el mecanismo de resistencia en los aislados chilenos analizados. Por otro lado según la literatura las otras mutaciones asociadas a pérdida de sensibilidad a estrobilurinas (F129L y G137R) confieren niveles menores de resistencia y han sido detectados sólo en hongos fitopatógenos diferentes a *B. cinerea* (Leroux *et al.*, 2010). Situación que se ha confirmado también con los aislados chilenos utilizados para este trabajo (ausencia de éstas en aislados resistentes).

Correspondencia genotípica

Como muestra la figura 9, los 20 aislados de *B. cinerea* de distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin analizados, correspondieron a aislados *transposa* (*Boty+;Flipper+*) que es el genotipo que predomina en las poblaciones del hongo en uva de mesa de exportación en Chile (Esterio *et al.*, 2011) y en vides viníferas en Francia. Aunque el número de aislados analizados es pequeño, y por lo tanto no existe una certeza absoluta, este resultado aparentemente indicaría que no existiría asociación alguna con la presencia de los transposones y nivel de sensibilidad a azoxystrobin. Además, como se desconoce el comportamiento de aislados pertenecientes a los otros genotipos de botrytis, no se puede postular que la pertenencia a un determinado genotipo éste o no asociada a un mayor o menor riesgo de generar pérdida de sensibilidad a este tipo de fungicidas, lo cual debiera ser sometido a análisis en futuras investigaciones.

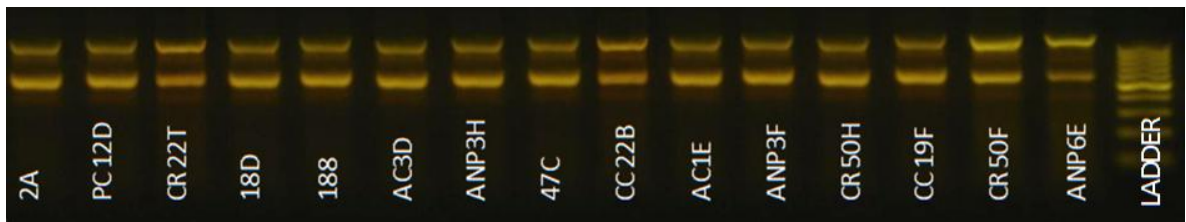


Figura 9. Visualización de los productos generados mediante PCR usando los partidores LTR 98, LTR 728, F14 y F304 en los aislados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Cuadro 4. Lista de los aislados de *Botrytis cinerea* usados en este estudio.

Aislados <i>B.</i> <i>cinerea</i>	Sensibilidad a azoxystrobin ¹	Producto de PCR generado por los partidores cytb-BcR y cytb-BcF	PCR con los partidores BcAR-F y BcAr-R ²	Genotipo
1E	AS	564	-	<i>transposa</i>
CR50H	AS	1792	-	<i>transposa</i>
2A	AR	564	+	<i>transposa</i>
PC12D	AR	564	+	<i>transposa</i>
CR22T	AR	564	+	<i>transposa</i>
18D	AR	564	+	<i>transposa</i>
188	AR	564	+	<i>transposa</i>
AC3G	AR	564	+	<i>transposa</i>
ANP6E	AR	564	+	<i>transposa</i>
CR50F	AR	564	+	<i>transposa</i>
CC19F	AR	564	+	<i>transposa</i>
184	AR	564	+	<i>transposa</i>
AC3D	AS	564	-	<i>transposa</i>
ANP3F	AS	564	-	<i>transposa</i>
47C	AS	1792	-	<i>transposa</i>
CC22B	AS	1792	-	<i>transposa</i>
AC1E	AS	564	-	<i>transposa</i>
ANP3H	AS	1792	-	<i>transposa</i>
ANP2C	AS	564	-	<i>transposa</i>
22F	AS	1792	-	<i>transposa</i>

¹ AR y AS indican azoxystrobin resistente y azoxystrobin sensible respectivamente

² + y - indican la presencia y la ausencia de la amplificación de 260 pb respectivamente, usando los partidores BcAR-R y BcAR-F.

Caracterización fenotípica de los aislados seleccionados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin

Caracterización morfológica

Según los parámetros evaluados de caracterización morfológica la totalidad de los aislados analizados, correspondieron a la categoría miceliar; ninguno de los 20 aislados analizados presentó desarrollo de esclerocios luego de veinte días de incubación en AM.

Dentro de la categoría miceliar, los aislados se clasificaron en 4 clases morfológicas (M-I, M-II, M-III y M-IV), presentándose el comportamiento promedio en el cuadro 5. En éste se puede apreciar que los 20 aislados se clasificaron en tres de las cuatro clases: M-I (micelio corto), M-II (micelio suelto) y M-III (crecimiento en masa). Según el análisis estadístico

Chi-cuadrado (X^2) realizado no se presentó ningún grado de asociatividad entre la sensibilidad del aislado y la pertenencia a alguna clase miceliar (Chi-sq = 1,986 asociado a un p-value > 0,05).

Cuadro 5. Distribución de los 20 aislados analizados de *B. cinerea* en clases miceliar según nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Sensibilidad aislados <i>B.cinerea</i>	Total aislados analizados	Clases miceliar			
		M-I	M-II	M-III	M-IV
Resistentes	10	5	2	3	0
Sensibles	10	2	3	5	0
Total	20	7	5	8	0

Para nivel de esporulación los 20 aislados se clasificaron en dos de las 4 clases consideradas (€-2 y €-3) correspondientes a esporulación débil ($10\% < \epsilon < 50\%$) y esporulación abundante ($\epsilon > 50\%$), respectivamente (Cuadro 6). El análisis estadístico (ANDEVA) muestra que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) para el nivel de esporulación entre aislados sensibles y resistentes en los 20 aislados analizados, por lo tanto el nivel de sensibilidad a azoxystrobin no afecta el nivel de esporulación de los aislados de *Botrytis*.

Cuadro 6. Nivel de esporulación presentada en los 20 aislados analizados de *B. cinerea* según nivel de sensibilidad a azoxystrobin.

Sensibilidad aislados <i>B. cinerea</i>	Total aislados analizados (%)	Nivel de esporulación € (%)			
		€-0	€-1	€-2	€-3
Resistentes	100	0	0	60	40
Sensibles	100	0	0	50	50

Con respecto a capacidad formadora de esclerocios, como ya se ha indicado, durante las tres evaluaciones realizadas la totalidad de los aislados analizados (sensibles y resistentes) no se comportaron como esclerociales.

Los resultados presentados anteriormente concuerdan con los obtenidos por Ma *et al.* (2003) el cual concluye que las mutaciones F129L y G143A confieren niveles elevados de resistencia pero no presentan efectos negativos en la actividad enzimática, por lo tanto estos cambios no generan alteraciones en la capacidad de sobrevivencia del hongo, sin embargo Markoglou *et al.* (2006) menciona que parámetros como esporulación, germinación de esporas y producción de esclerocios, se ven significativamente reducidos en aislados resistentes.

Finalmente se realizó un análisis estadístico para el crecimiento miceliar (mm) en base al cuarto día de medición en los 20 aislados analizados, para las tres temperaturas (15, 20 y 25°C), no detectándose interacción alguna entre los factores sensibilidad y temperatura a un nivel de significancia de $\alpha=0,05$, por lo tanto, ambos factores fueron evaluados separadamente.

Al analizar el factor nivel de sensibilidad (sensibles y resistentes) se presentaron diferencias estadísticamente significativas sólo a 20°C, donde los aislados resistentes tuvieron una tasa de crecimiento menor ($p \leq 0,05$) (Cuadro 7; Figura 10). Este resultado concuerda con Markoglou *et al.* (2006) quienes mencionan que los costos en términos de adaptabilidad generados por el desarrollo de resistencia pueden ser alterados por las condiciones medioambientales como la temperatura y que éstos costos pueden ser mayores bajo condiciones óptimas. Por lo tanto, es importante considerar que cambios en la sensibilidad sí pueden alterar la tasa de crecimiento del hongo, aspecto que incidiría en la etapa de colonización del patógeno en la planta hospedera.

Para las temperaturas de 15 y 25°C no se presentaron diferencias significativas ($p>0,05$), con respecto a crecimiento miceliar, entre aislados sensibles y resistentes a azoxystrobin.

Para el factor temperatura se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) en ambas categorías de sensibilidad (Cuadro 8; Figura 11). Se mostró una respuesta diferente para 15°C (menor tasa de crecimiento miceliar que a 20 y 25°C), estos resultados son similares a los obtenidos por Martínez *et al.* (2003), pero difieren con los obtenidos por Esterio (2005), en donde a 15°C los aislados presentaron mayores tasas de crecimiento miceliar que a 25°C, sin embargo, es importante destacar que el origen de los aislados fue distinto, ya que estos fueron recuperados desde esclerocios.

Cuadro 7. Crecimiento miceliar promedio (mm) según categoría de sensibilidad de los aislados de *B. cinerea* a azoxystrobin a 20°C.

Sensibilidad aislado <i>B. cinerea</i>	Diámetro miceliar (crecimiento promedio en mm)
Resistente	57,567 a
Sensible	60,467 b

Promedios unidos por letras iguales en sentido vertical indican diferencias estadísticamente no significativas entre los tratamientos según Prueba de Tukey ($p > 0,05$).

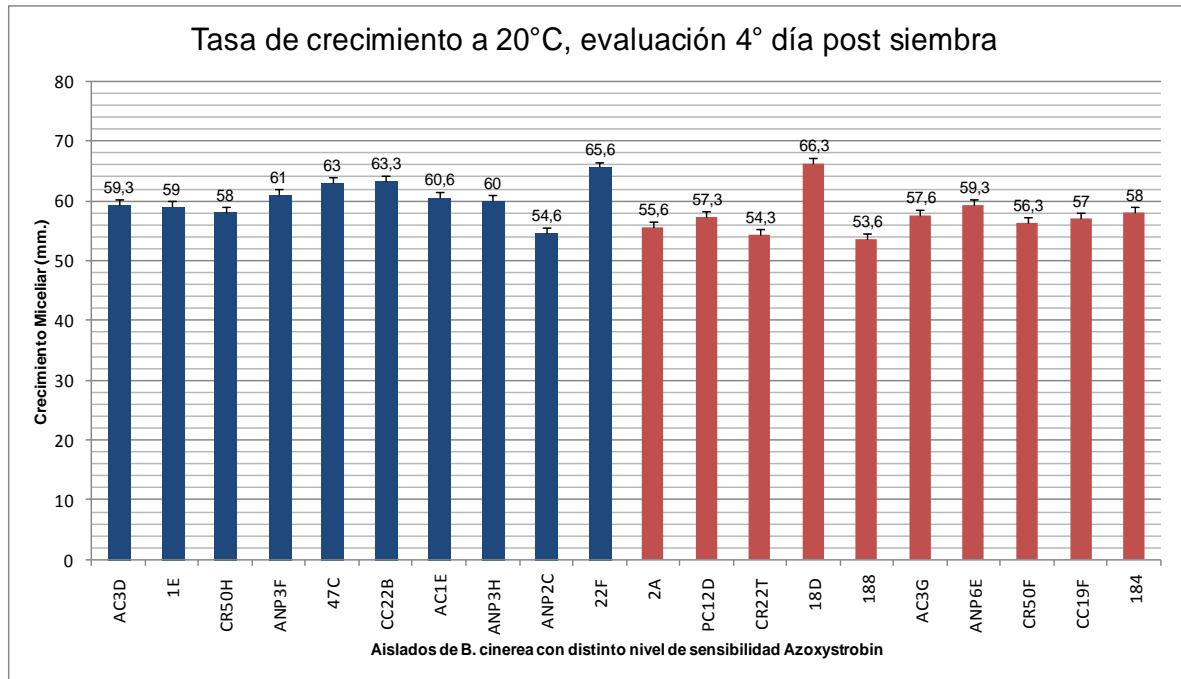


Figura 10. Tasa de crecimiento micelial (mm) a 20°C, de aislados de *B. cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin, evaluado al 4° día post siembra. Barras azules: aislados sensibles a azoxystrobin; barras rojas: aislados resistentes a azoxystrobin.

Cuadro 8. Tasa de Crecimiento micelial promedio (mm) de *B. cinerea* según temperatura de incubación.

Temperatura	Promedio (mm)	
15°C	43,43	a
20°C	58,87	b
25°C	59,12	b

Promedios unidos por letras iguales en sentido vertical indican diferencias estadísticamente no significativas entre los tratamientos según Prueba de Tukey ($p > 0,05$).

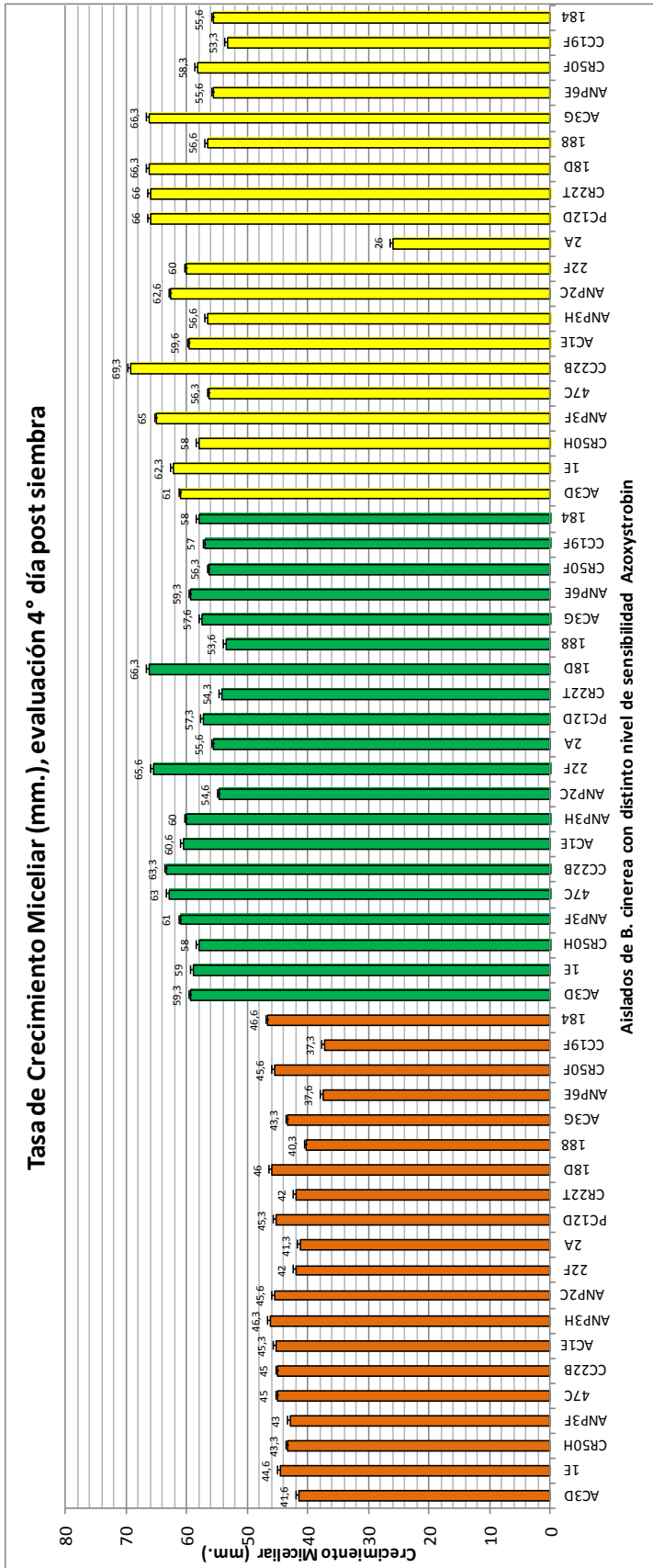


Figura 11. Tasa de crecimiento miceliar (mm) de aislados de *B. cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin, evaluado al 4° día post siembra. Barras naranjas: 15°C; barras verdes: 20°C; barras amarillas: 25°C.

Capacidad de virulencia

Los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico (ANDEVA), realizado separadamente para ambas temperaturas y en base a los datos obtenidos al tercer día post inoculación para 20°C y al décimo día post inoculación para 0°C, muestran que en ambos ensayos (0 y 20°C) no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para la interacción entre los factores, tipo de exposición al inóculo-sensibilidad del aislado, por lo tanto ambos factores se analizaron por separado.

Para el factor tipo de exposición al inóculo (con y sin herida) a las dos temperaturas evaluadas (0 y 20°C) sí se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el diámetro de la lesión en la baya (Cuadros 9 y 10), siendo mayor en las bayas con herida. El comportamiento obtenido es lógico ya que la lesión provocada favorece la penetración del patógeno (Figuras 12 y 14) concordando con los resultados obtenidos por varios autores (Esterio, 2005; Pozo, 2009).

Cuadro 9. Nivel promedio de virulencia (mm) de *B. cinerea* a 20°C, según su exposición al inóculo.

Exposición al inóculo	Promedio (mm)
Con herida	19,4 a
Sin herida	1,717 b

Promedios unidos por letras iguales en sentido vertical indican diferencias estadísticamente no significativas entre los tratamientos según la Prueba de Tukey ($p > 0,05$).

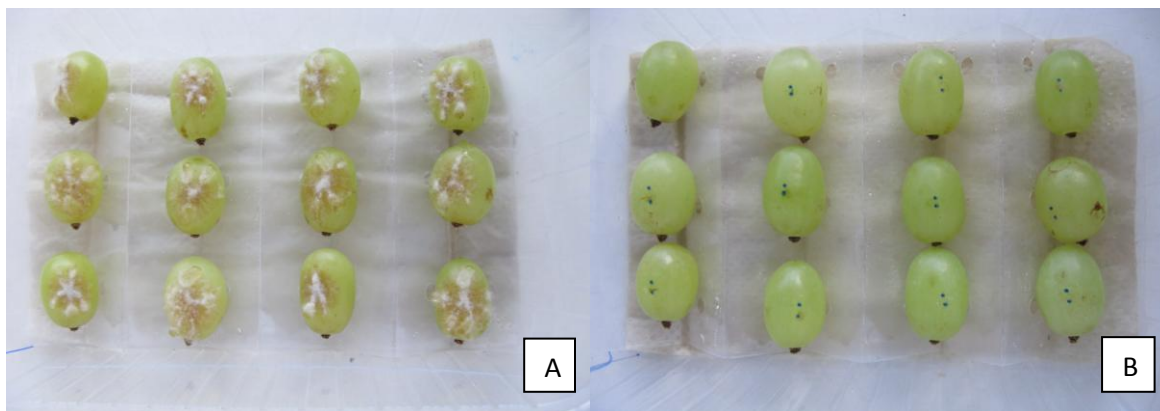


FIGURA 12. Pruebas de virulencia realizada sobre bayas del cv. Thompson Seedless, se muestra lesión provocada al tercer día post inoculación a 20°C. A: con herida, B: sin herida.

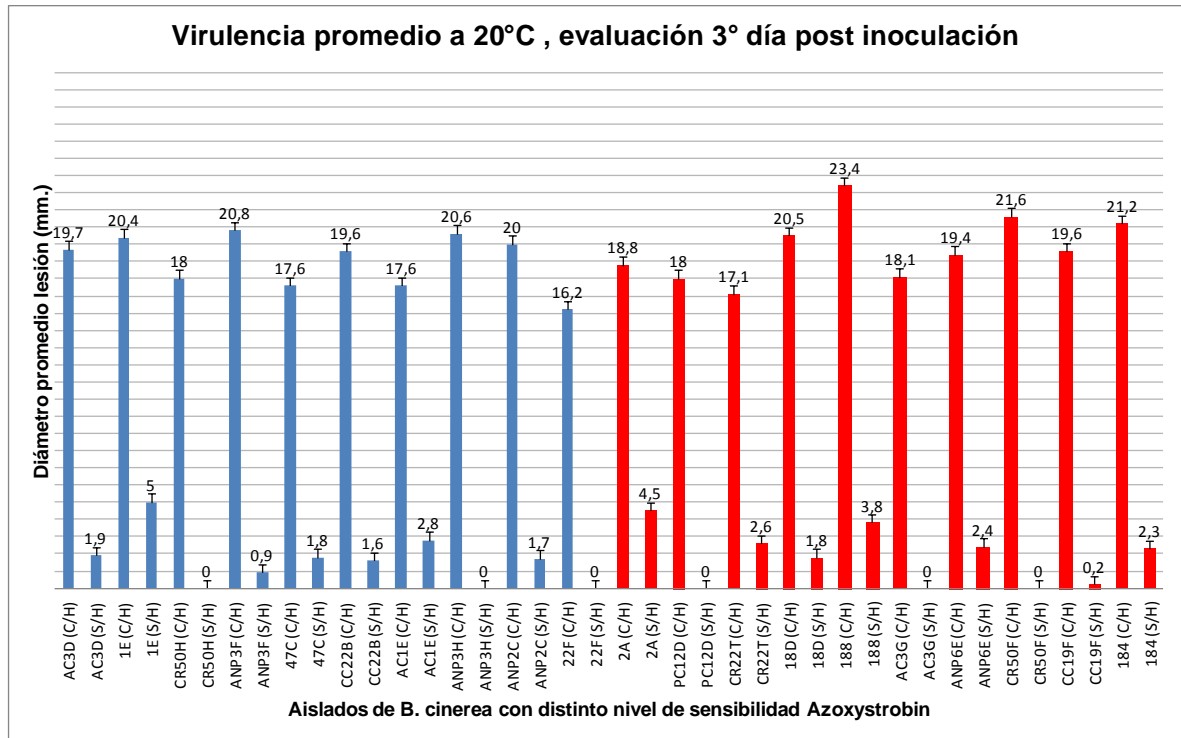


Figura 13. Nivel de virulencia (mm) a 20°C, de aislados de *B. cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin, evaluado a 3° día post inoculación. Barras azules: aislados sensibles; barras rojas: aislados resistente. C/H: con herida; S/H: sin herida.

Cuadro 10. Nivel promedio de virulencia (mm) de *B. cinerea* a 0°C, según tipo de exposición al inóculo.

Exposición al inóculo	Promedio (mm)
Con herida	17,773 a
Sin herida	2,483 b

Promedios unidos por letras iguales en sentido vertical indican diferencias estadísticamente no significativas entre los tratamientos según la Prueba de Tukey ($p > 0,05$).

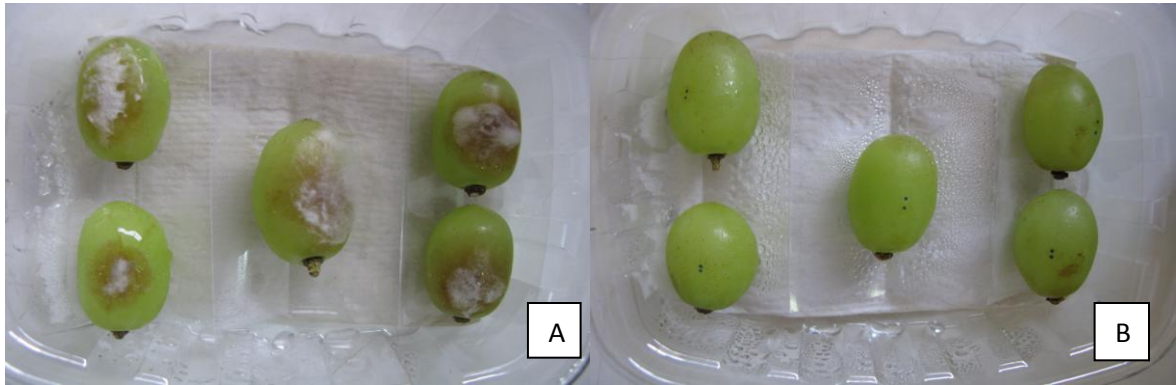


Figura 14. Pruebas de virulencia realizada sobre bayas del cv. Thompson Seedless, se muestra lesión provocada al décimo día post inoculación a 0°C. A: con herida, B: sin herida.

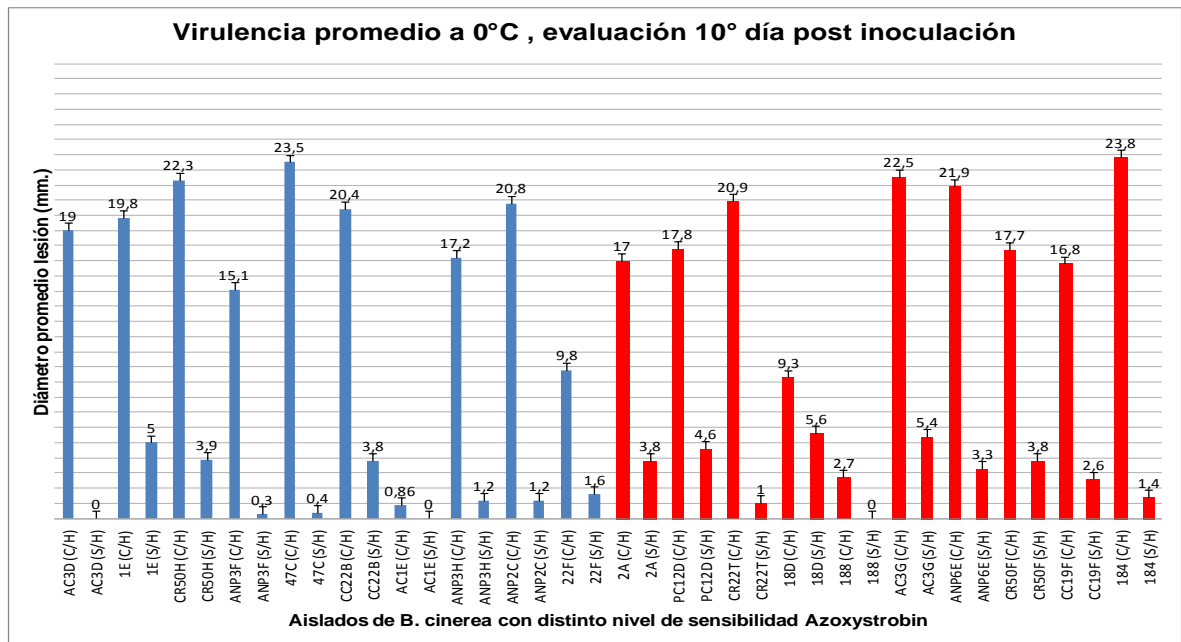


Figura 15. Nivel de virulencia (mm) a 0°C, de aislados de *B. cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a azoxystrobin, evaluado a 10° día post inoculación. Barras azules: aislados sensibles; barras rojas: aislados resistentes. C/H: con herida; S/H: sin herida.

Para el factor sensibilidad, no se observó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre aislados resistentes y sensibles, en ambos ensayos (0 y 20°C), obteniéndose una agresividad similar para ambas condiciones (sensibles y resistentes), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Markoglou *et al.* (2006) y Banno *et al.* (2009), en donde los aislados mutantes no perdieron la habilidad para infectar plantas de Zapallo en comparación con aislados sensibles (Figuras 13 y 15).

CONCLUSIONES

Mediante la metodología utilizada en este estudio, los resultados permiten concluir que:

- La mutación G143A sería la responsable de la resistencia a azoxystrobin en los aislados chilenos de *B. cinerea* analizados. Las mutaciones F129L y G137R, asociadas a leves pérdidas de sensibilidad a azoxystrobin en otros patógenos, que no han sido descritas en *B. cinerea*, no fueron detectadas en ninguno de los aislados analizados.

En base a lo anterior el mecanismo de resistencia de aislados chilenos de *B. cinerea* a azoxystrobin estaría exclusivamente asociado a la mutación G143A.

- La detección de un intrón extra en el gen del citocromo b de *B. cinerea* de 1205 pb inserto entre el codón 143 y 144, en 5 de los 10 aislados sensibles y ausente en todos los aislados resistentes constituye un importante antecedente, ya que un predominio de aislados sensibles con esta condición impediría el desarrollo e incremento de resistencia a este tipo de fungicidas. Porque la presencia de éste intrón en los aislados resistentes tendría un efecto letal.

- Todos los aislados de *B. cinerea* analizados, tanto sensibles como resistentes a azoxystrobin, correspondieron al genotipo *transposa* que es el que predomina en uva de mesa en Chile.

- La ausencia de aislados de *Botrytis cinerea* del genotipo *vacuma* resistentes a azoxystrobin fundamenta la recomendación de esta molécula en los periodos de pre y post flor en los programas de control químico de Botrytis en la vid.

- Los veinte aislados de *B. cinerea* se comportaron similarmente con respecto a aspecto miceliar (Clases M-I, M-II y M-III), esporulación (Clases €-2 y €-3) y capacidad formadora de esclerocios. Lo cual sugiere que en general los cambios en el nivel de sensibilidad de los aislados a azoxystrobin no afectarían la adaptabilidad del patógeno, salvo en el crecimiento miceliar a 20°C (aislados resistentes < sensibles).

- Por otro lado es importante señalar que cambios en el nivel de sensibilidad de los aislados a azoxystrobin en modo alguno afectan el nivel de agresividad de los aislados tanto a 0° como a 20°C. Los aislados sensibles y resistentes presentaron similar nivel de virulencia.

- Finalmente es importante señalar que de acuerdo a los resultados obtenidos se comprueba parcialmente la hipótesis planteada en esta investigación dado que sí bien los aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de diferente sensibilidad a azoxystrobin presentan diferencias genéticas, éstos presentan en general, con la sola excepción del diámetro miceliar a 20°C, un comportamiento fenotípico similar.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. 1996. Fitopatología. 2ª ed. Editorial Limusa, S. A. México D. F., 838p.
- Agrios, G. 1997. Plant Pathology. 4ª ed. Academic Press. San Diego. 635p.
- Ammermann, E., G. Lorenz, K. Schelberger, B. Mueller, R. Kirstgen and H. Sauter. 2000. BAS 500 F – The new broadspectrum strobilurin fungicide. In: Proceedings of Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases. Vol. 2. 541–548 pp.
- Auger, J. 1981. La pudrición gris de la vid. Revista Frutícola 2(2): 7-9.
- Auger, J. 1983. La pudrición gris de la vid, *Botrytis cinerea* Pers. Algunos aspectos epidemiológicos de importancia para su control. Rev. Aconex (4): 15-18.
- Auger, J. 1987. La Botrytis o pudrición gris, permanente amenaza para la uva de mesa de exportación. Norte Agrofrutícola 1(2): 4-6.
- Auger, J. y M. Esterio. 1997 (a). Botrytis en vides en Chile: Epidemiología y resistencia a fungicidas. 3-9p. In: Esterio, M y Auger, J. Botrytis: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago- Chile. 125p.
- Auger, J. y M. Esterio. 1997 (b). Control integrado de *Botrytis cinerea* Pers. En vid (*Vitis vinífera* L.). 14-25 p. In: Esterio M. y J. Auger. Botrytis: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago- Chile. 125p.
- Banno, S., K. Yamashita, F. Fukumori, K. Okada, H. Uekusa, M. Takagaki, M. Kimura and M. Fujimura. 2009. Characterization of QoIs resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome b gene. Plant Pathology 58: 120-129.
- Brent, K. and D. Hollomond. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed In: FRAC Monografía n° 1. Global Crop Protection Federation. Bruselas, Bélgica. 1-56p.
- Chin, K. M., D. Chavaillaz, M. Kasbohrer, T. Staub, and F. Felsenstein. 2001. Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* to strobilurins. Crop Protection 20: 87-96.

Dioloz, 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 de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención producción Frutícola. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias agronómicas. Santiago, Chile. 114p.

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

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

FRAC, 2006. Mutations associated with QoI-resistance. Disponible en http://www.frac.info/frac/meeting/2007/Mutations_associated_with_QoI_resistance.pdf. Leído el 15 de Diciembre 2011.

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

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

Gisi, U., H. Sierotsky, A. Cook and A. McCaffery 2002. Mecanismos influencing the evolution of resistance to QoI inhibitor fungicides. Pest Management Science 58: 859-867.

Grasso, V., S. Palermo, H. Sierotzki, A. Garibaldi y U. Gisi. 2006. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. Pest Management Science. 62: 465-472.

Grossmann, K. and G.Reztlaff. 1997. Bioregulatory effects of the fungicide strobilurin, kersoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). Pesticide Science. 50: 11-20.

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

Jarvis, W. R. 1977. Botryotinia and Botrytis species. Taxonomy, physiology and pathogenicity. Reserch Station Harrow, Ontario, Canada. Monografía N°15. 195p.

- Jiang, J., L. Ding, T. Michailides, H. Li, and Z. Ma. 2009. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Pesticide Biochemistry and Physiology 93: 72-76.
- Keller, M., O. Viret, and M. Cole. 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. Phytopathology, Vol. 93. N°3: 316-322.
- Latorre, B. 1986. Manejo de *Botrytis cinerea* en uva de mesa. Revista Frutícola 7(3): 75-83.
- Leroux P., M. Gredt, M. Leroch and A-S. Walker. 2010. Exploring mechanisms to respiratory inhibitors in Field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of Gray mold. Applied and environmental microbiology. 6615-6630p.
- 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.
- Ma, Z., D. Felts and T. Michailides. 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. Pesticide Biochemistry and Physiology 77: 66–74.
- Ma, Z. and T. Michailides. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection. 853-863p.
- 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.
- Martinez, F., D. Blancard, P. Lecomte, C. Levis, B. Dubos and M. Fermaud. 2003. Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulation of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 109: 479-488.
- 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.
- Muñoz, G., P. Hinrichsen y M. Alvarez. 1999. Variabilidad genética de cepas de *Botrytis cinerea* resistente a dicarboximidias provenientes de vid y tomate. Agricultura técnica (Chile) (59): 1-12.
- Muñoz, G., P. Hinrichsen, Y. Bryngoo and T. Giraud. 2002. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. Mycological Research 106(5): 594-601.
- Pastor, E. 1980. Período de infección y latencia de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. en *Vitis vinifera* L. cv Sultanina. Tesis Ing. Agr. Universidad de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago. 70p.

- 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 Agronomía, Santiago. 48p.
- Raposo, R., T. Gomez and P. Melgarejo. 2001. Survival of *Botrytis cinerea* in Southeastern Spanish greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* 107: 229-236.
- 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.
- Semar M., D. Strobel, A. Koch, K. Klappach and G. Stammler. 2007. Field efficacy of pyraclostrobin against populations of *Pyrenophora teres* containing the F129L mutation in the cytochrome b gene. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 114: 117-119.
- Sierotzki H., R. Frey, J. Wullschleger, S. Palermo, S Karli, J. Godwin and U. Gisi 2007. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Management Science* 225-233.
- Thompson, J. and B. Latorre. 1999. Characterization of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile using RAPD-PCR. *Plant Disease* 83(12): 1090-1094.