

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE AGRONOMIA

Características morfológicas y patogénicas de aislamientos de *Botrytis cinerea*
Pers. ex Fries desde arándano (*Vaccinium corymbosum* L. y *Vaccinium*
virgatum Ait.) resistentes a benomilo

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Agronomía

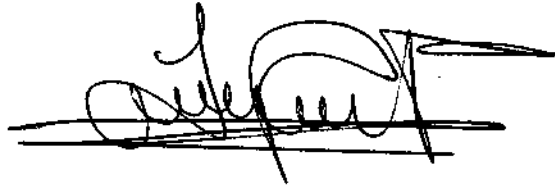
Carola Alejandra Villalobos Alvarez

VALDIVIA - CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE:

Sr. Luigi Ciampi P.
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

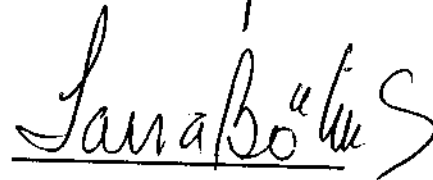
A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Luigi Ciampi', written over a horizontal line.

PROFESORES INFORMANTES:

Sr. Roberto Carrillo LI.
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Roberto Carrillo', written over a horizontal line.

Sra. Laura Böhm S.
Ing. Agr.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Laura Böhm', written over a horizontal line.

“LA FALTA DE LUCHA ENFLAQUECE EL ALMA”

A mí madre Eliana
Por todo su amor y enseñanzas

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al profesor patrocinante, Ing. Agr., M. Sc., Ph. D. Sr Luigi Ciampi P., por su ayuda, paciencia en la espera del término de este trabajo y sus interesantes conversaciones, que brindaron los momentos de distensión durante esta tesis.

A los profesores informantes Ing. Agr., M. Sc., Ph. D. Sr Roberto Carrillo Ll., por la colaboración brindada en la realización de la discusión de esta tesis, por sus interesantes y valiosos aportes y correcciones. A la Ing. Agr., Laura Böhm S. por su cooperación y corrección en el informe y defensa de tesis.

Agradezco la buena disposición de parte del personal del Laboratorio de Fitopatología, en especial a la Srta Hortensia y Don Ramón.

A Deny por su apoyo y ánimo durante esta etapa. A mi hijo Martín, por su infinito amor.

A mi familia por todo su cariño y comprensión, especialmente mis padres, Eliana y Blas, hermanos Rubén, Patricia y Antonio y mis cinco sobrinos. Los quiero mucho.

A la familia Sandoval Navarro, por su amorosa acogida durante todos estos años.

A todos mis amigos y amigas, quienes con su compañía y palabras de apoyo me hicieron sentir muy afortunada de tenerlos.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1	Antecedentes generales del arándano	4
2.1.1	Arándano en Chile	4
2.1.2	Enfermedades en arándano	8
2.1.2.1	<i>Botrytis cinerea</i> en arándano	9
2.2	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fries	10
2.2.1	Clasificación	11
2.2.2	Síntomas	11
2.2.3	Características morfológicas	12
2.2.3.1	Micelio y conidióforo	12
2.2.3.2	Conidias	12
2.2.3.3	Esclerocios	13
2.2.4	Infección	13
2.2.5	Control	14
2.3	Benzimidazoles	15
2.3.1	Resistencia a benzimidazoles	16
2.3.1.1	Antecedentes de resistencia a benzimidazoles en Chile	18
2.3.1.2	Estrategias para evitar la resistencia	18

Capítulo		Página
3	MATERIAL Y METODO	20
3.1	Ubicación del ensayo	20
3.2	Materiales	20
3.2.1	Material de laboratorio y equipos	21
3.2.2	Material biológico	21
3.3	Método	22
3.3.1	Aislamiento de cepas de <i>Botrytis cinerea</i>	22
3.3.2	Preparación del material para el comienzo del estudio	23
3.3.3	Características consideradas en el estudio	25
3.3.3.1	Crecimiento diario del micelio	25
3.3.3.2	Esporulación	25
3.3.3.2.1	Rapidez de esporulación	26
3.3.3.2.2	Nivel de esporulación	26
3.3.3.3	Número de esclerocios	26
3.3.3.4	Color del micelio	26
3.3.3.5	Virulencia	27
3.3.3.6	Análisis estadístico	28
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	29
4.1	Cepas de <i>Botrytis cinerea</i>	29
4.2	Relación entre crecimiento diario del micelio y resistencia a benomilo	30
4.3	Relación entre esporulación y resistencia a benomilo	38
4.3.1	Rapidez de esporulación	38
4.3.2	Niveles de esporulación	41
4.4	Relación entre producción de esclerocios y resistencia a benomilo	44

Capítulo		Página
4.5	Relación entre color del micelio y resistencia a benomilo	48
4.6	Relación entre virulencia y resistencia a benomilo	51
5	CONCLUSIONES	56
6	RESUMEN	58
	SUMMARY	59
7	BIBLIOGRAFIA	60
8	ANEXOS	67

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Zona y época de producción de plantaciones de arándano en Chile e incremento de la superficie desde el año 2000 al 2005	7
2	Aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> provenientes de localidades ubicadas desde la V a la IX región, obtenidas de <i>V. corymbosum</i> y <i>V. ashei</i> , utilizados en este trabajo	22
3	Aislamientos que presentan resistencia y sensibilidad a 5 µg/mL de benomilo	23
4	Aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> resistentes y sensibles a 5µg/mL de benomilo y nomenclatura utilizada en el presente estudio	30
5	Crecimiento diario de cepas de <i>B. cinerea</i> resistentes y sensibles a benomilo, expresado en mm/día	32
6	Prueba de t-student para el crecimiento diario de cepas de <i>B. cinerea</i> resistentes y sensibles a benomilo	33
7	Esporulación diaria acumulada (%) de 13 aislamientos de <i>B. cinerea</i> , resistentes y susceptibles a benomilo	40
8	Porcentaje de esporulación, evaluada a los 21 días de cultivo, en aislamientos resistentes y sensibles a benomilo, de <i>B. cinerea</i>	43

Cuadro

Página

9	Número de esclerocios promedio para 13 aislamientos de <i>B. cinerea</i> resistentes y sensibles a benomilo, contabilizados a los 20 días de cultivo	45
10	Color del micelio de las cepas resistentes y sensibles a benomilo, de <i>Botrytis cinerea</i>	50
11	Resistencia eléctrica (k.Ω) de aislamientos de <i>B. cinerea</i> resistentes y sensibles a benomilo y del testigo de las prueba	52

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Número de bandejas de arándanos despachados desde Chile entre los años 2000-2001 al 2004-2005	8
2	Presencia de <i>Botrytis cinerea</i> Pers, ex Fries, en hojas y formación de esclerocios en caña de arándano	10
3	Atizonamiento de estructuras florales y moho gris en frutos, provocado por <i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fries	10
4	Esquema representativo de la forma de siembra de los aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> sobre placas de agar papa dextrosa (APD)	24
5	Esporulación acumulada (%) de aislamientos resistentes y sensibles a benomilo	41
6	Cantidad de esclerocios producidos a los 20 días, por 13 aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i>	44
7	Formación de esclerocios en dos aislamientos sensibles a benomilo de <i>Botrytis cinerea</i>	46
8	Diferentes tonos de gris presentes en los aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i>	49

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Principales características del medio de cultivo agar papa dextrosa (APD)	68
2	Crecimiento micelar diario (mm) de cada aislamiento durante 3 días, en los diámetro polar (DP) y diámetro ecuatorial (DE) de la placa	69
3	Crecimiento micelar mínimo, medio y máximo, con la desviación estándar y covarianza de cada aislamiento	71
4	Análisis de varianza para el crecimiento micelar diario (mm), para los aislamientos	71
5	Esporulación diaria (%) de 13 aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> , por 21 días de observación	72
6	Esporulación mínima, máxima y media, con la desviación estándar y covarianza para los 13 aislamientos	74
7	Análisis de varianza para el nivel de esporulación (%), presentado por los 13 aislamientos	74
8	Prueba de t-student para el nivel de esporulación en aislamientos resistentes y sensibles a benomilo de <i>B. cinerea</i>	75
9	Producción de esclerocios mínima, media y máxima, con la desviación estándar y covarianza para cada aislamiento	75

Anexo		Página
10	Resistencia eléctrica (k.Ω), presentada por los 13 aislamientos	76
11	Resistencia eléctrica mínima, media y máxima (k.Ω), con la desviación estándar y covarianza para cada aislamiento y testigo de la prueba	76
12	Análisis de varianza de la conductividad eléctrica (k.Ω) para los aislamientos	77

1 INTRODUCCION

Chile se encuentra en un momento favorable, en lo que se refiere a comercio exterior, proyectando sus cultivos a nuevas condiciones de producción, como es la utilización programada de plaguicidas, a fin de garantizar la conservación de la calidad del producto hasta la llegada al consumidor.

En Chile, el control de los hongos en cultivos intensivos, se basa fundamentalmente en el empleo de fungicidas preventivos, aplicados varias veces durante la temporada del cultivo. El uso de estos productos está limitado por las normas de registro de los países importadores, lo que reduce las posibilidades de alternancia de plaguicidas, favoreciendo el fenómeno de resistencia del hongo a fungicidas. Es importante mencionar que esto conlleva un costo adicional para la obtención del rendimiento deseado.

Botrytis cinerea Pers. ex Fries es un hongo con un alto potencial de resistencia, debido a sus características genéticas y a su fisiología, mas aún considerando su alta polifagia y los estragos en pre y post cosecha que causa en ciertos cultivos; ello hace necesario la utilización de un programa de control, que permite la manifestación de cepas resistentes a algunos grupos de plaguicidas, comúnmente utilizados contra este hongo.

El arándano, es uno de los berries con mayor proyección en el exterior; esto ha ubicado a Chile como el principal productor en contraestación, permitiendo percibir un buen precio por las exportaciones de este fruto. Aunque las inversiones y costos de producción son más bien elevados, los ingresos justifican su cultivo. Uno de los patógenos que generalmente provoca la

preocupación de los productores en este rubro, es *B. cinerea*. Como se mencionó en el párrafo anterior, este hongo tiene una tendencia a manifestar resistencia, especialmente en químicos como los benzimidazoles, que han sido ampliamente usados en el control de *Botrytis cinerea*. Después de años de utilización de benzimidazoles, en el combate de hongos con ciclos cortos y altos niveles poblacionales dentro de una temporada, es posible que las cepas resistentes hayan manifestado una variación morfológica y fisiológica.

Para lograr una producción más eficiente, se hace necesario promover estudios para conocer el estado de resistencia a botricidas que presentan las poblaciones de *Botrytis* y adoptar nuevas técnicas de manejo, contemplando un manejo integrado, así evitar pérdidas innecesarias de recursos en químicos que ya no son útiles para el combate de esta enfermedad.

En la presente tesis se desea establecer la variación fenotípica que presentan las cepas resistentes con respecto de las sensibles a benomilo, corrientemente utilizado en arándano, tanto a nivel de campo como en post-cosecha.

La hipótesis planteada postula que aislamientos sensibles a benomilo de *Botrytis cinerea*, desde arándano (*Vaccinium corymbosum* y *Vaccinium ashei*), se diferencian morfológica y patogénicamente de los aislamientos resistentes.

Como objetivo general se plantea determinar la existencia de diferencias morfológicas y patogénicas de aislamientos de *B. cinerea*, con resistencia a benomilo.

Los objetivos específicos propuestos son:

- Caracterizar morfológicamente a cepas resistentes y susceptibles a benomilo, determinando las diferencias que puedan existir entre ellas.
- Establecer en los distintos aislamientos el grado de virulencia, medido a través de la conductividad eléctrica.
- Determinar la relación entre crecimiento diario, número de esclerocios y esporulación con el grado de resistencia a benomilo.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Antecedentes generales del arándano.

El arándano pertenece a la familia Ericaceae, y ha sido clasificado en la subfamilia Vacciniaceae subgénero *Cyanococcus*. A esta familia pertenecen algunas especies ornamentales como las azaleas y el rododendro. El arándano muestra, en general, un crecimiento arbustivo que puede alcanzar, de acuerdo al tipo de arándano, 3 metros de altura, pudiendo llegar a conformar, como hábito de crecimiento, un seto continuo dentro de la plantación. El principal consumo de este fruto se realiza en su estado fresco, en postres preparados, solo o en combinación con otros frutos (BUZETA, 1997).

El arándano es un frutal menor nativo de Norteamérica considerado dentro del grupo de los berries; fue introducido en Chile a principios de la década de los ochenta. Existen tres tipos: arándano “alto” (highbush), *Vaccinium corymbosum* L.; el arándano “ojo de conejo” (rabbiteye) *V. ashei* J.M. Reade; y el arándano “bajo” (lowbush), *V. angustifolium* Aiton (BUZETA, 1997).

2.1.1 Arándano en Chile. El arándano fue introducido a Chile por investigadores de la Universidad Austral de Chile en el año 1978. A partir de 1979, el INIA, fue introduciendo progresivamente otros cultivares, tanto de arándano alto como del tipo ojo de conejo (SUDZUKI, 1993).

VIAL (2005), indica que en el año 1989 se contó con los primeros huertos comerciales de cierta relevancia, en Chile; no obstante, las primeras producciones importantes comenzaron recién a mediados de la década de los '90. Dentro de las condiciones climáticas favorables de Chile para el cultivo del arándano, están los inviernos suaves, primaveras templadas y veranos secos.

Estas condiciones se dan en gran parte de la VIII y IX Región de Chile. Actualmente gracias al desarrollo del negocio y la introducción de nuevas variedades, se incorporaron nuevas zonas de producción, tanto en el norte como el sur del país.

El arándano es una de las especies frutícolas que ha tenido un crecimiento explosivo, situando a Chile como el principal exportador de esta fruta en el Hemisferio Sur. En las exportaciones de este producto, Chile se posiciona en el tercer lugar del ranking de exportadores mundiales. Los principales destinos para el producto son Estados Unidos (82%), Japón (5%) e Inglaterra (4%) (DIARIO PYME, 2004). Además, Chile es el líder en el abastecimiento de contraestación en fresco, teniendo hasta ahora muy poca competencia (URRUTIA, 2000).

La superficie plantada en el país alcanza las 2.648 hectáreas aproximadamente, de las cuales 378 corresponden a las regiones IV, V y RM; 1.150 hectáreas a la VI, VII y VIII Región y 1.120 hectáreas a la IX y X Región. (VIAL, 2005). Los principales huertos de cultivo de este fruto en Chile se encuentran entre la VII y la X Región, y a menor grado entre la IV y VI. Su producción ha aumentado de 6.400 toneladas en el año 2001 a 8.000 en el 2004, proyectándose a 16.000 toneladas para el 2013. A lo largo del territorio nacional, la Región de Los Lagos lleva el primer lugar en cuanto al porcentaje de hectáreas cultivadas con un 32%; la Región de la Araucanía, un 22%; la Región del Bío Bío 18%; la Región del Maule un 15%; y entre la IV, V, VI y Área Metropolitana, un 13% (PROCHILE, 2005).

El punto de mayor producción de arándanos comienza a partir del octavo año de plantación, cuando los volúmenes de producción varían entre las 9 y 15 toneladas según el cultivar. En el país existe un alto nivel de desarrollo

tecnológico sobre la materia, importado desde Estados Unidos (CHILE, INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO, INDAP, 2005).

El Cuadro 1 indica la fluctuación entre superficie y zonas de producción, en los últimos cinco años en Chile; los resultados muestran incrementos en las distintas zonas, pero la distribución porcentual no muestra variaciones de importancia.

El tipo de arándano más plantado en el mundo y también en Chile es el highbush (arándanos altos). De este tipo existe un gran número de variedades plantadas en Chile, las cuales tienen distintos requerimientos de horas de frío, fechas de producción, características productivas y comerciales, y son específicas para cada zona. No obstante, la mayor parte de la superficie plantada corresponde a las variedades: O'Neal, Misty, Duke, Berkeley, Bluecrop, Briggitta, y Elliot (VIAL, 2005).

Si bien cerca del 90% de los embarques de arándanos cultivados de nuestro país se dirigen a Estados Unidos, los exportadores chilenos están buscando nuevos mercados para seguir creciendo (PROCHILE, 2005).

En cuanto a los precios, VIAL (2005) indica que en los primores, fruta cosechada desde mediados de octubre hasta fines de noviembre, son bastante altos. Luego de "Acción de Gracias" el precio cae y llega a rangos cercanos a US\$12 FOB puerto de destino. La recuperación de precios se produce a mediados y finales de febrero y se mantiene alto hasta mediados de abril. El piso de precios no ha seguido bajando, pero se ha extendido por un mayor período de tiempo. Se debe esperar que las ventajas de producir primores o fruta tardía fueran desapareciendo y el negocio debería ajustarse a una situación de precios en los que será de vital importancia contar con altos niveles de producción y costos razonables.

CUADRO 1 Zona y época de producción de plantaciones de arándanos en Chile y variación de la superficie plantada entre los años 2000 al 2005.

ZONA	Épocas de Producción	Año 2000		Año 2002		Año 2003		Año 2004		Año 2005		VARIACION 2005	
		ha	% del total	ha	% del total	ha	% del total	ha	% del total	ha	% del total	ha	% del total
IV, V y Metropolitana	Mediados de octubre a fines de diciembre	250	15%	290	15%	325	15%	378	14%	473	13%	95	20%
VI, VII y VIII	Ultima semana de noviembre al 1º de febrero	680	42%	810	41%	935	42%	1150	43%	1598	45%	448	28%
IX y X	Mediados de diciembre al 2 de abril	690	43%	875	44%	955	43%	1120	42%	1447	41%	327	23%
TOTAL		1620	100%	1975	100%	2215	100%	2648	100%	3518	100%	870	25%

FUENTE: VIAL y ALLENDE (2005).

En la Figura 1, se aprecia la evolución de los despachos desde la temporada 2000-2001 a 2004-2005, en bandejas (aproximadamente de 2 kg/ bandeja)

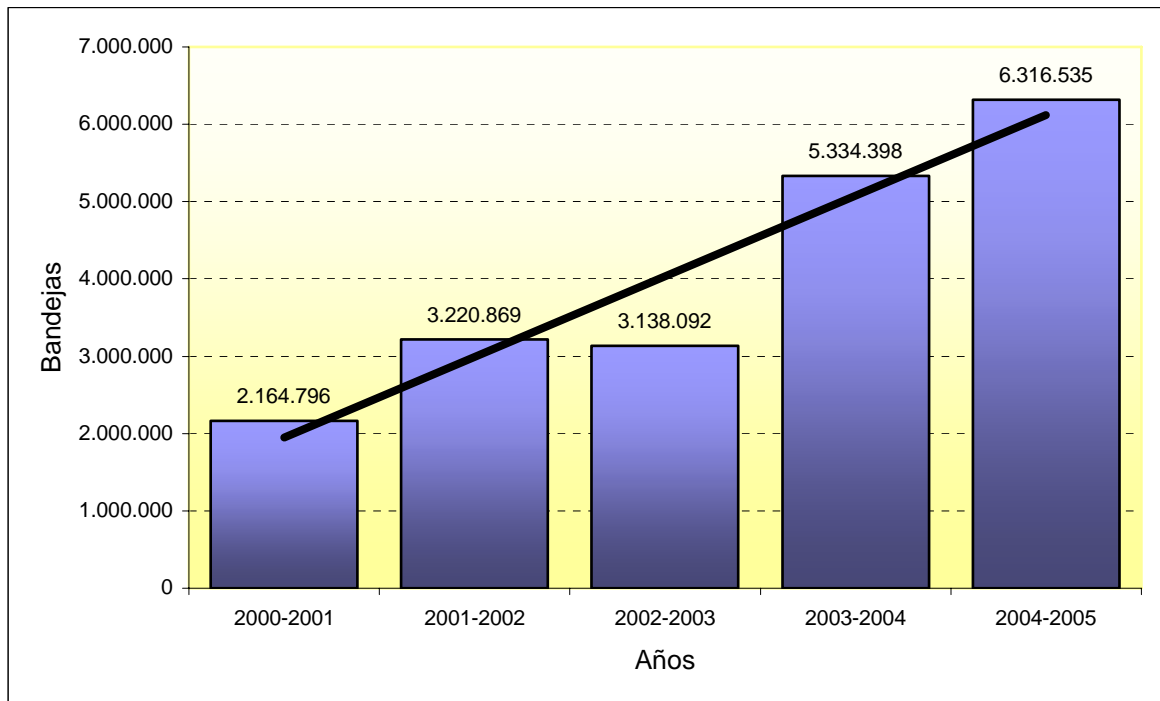


FIGURA 1 Número de bandejas de arándano despachados desde Chile entre los años 2000-2001 al 2004-2005.

FUENTE: VIAL y ALLENDE (2005).

2.1.2 Enfermedades en arándano. En el follaje, la mayor incidencia de enfermedades corresponde a las causadas por los hongos *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries., *Fusicocum putrefaciens* Shear, *Phomopsis vaccini* Shear. y *Fusarium* spp., y por la bacteria *Pseudomonas syringae* van Hall. En la fruta, durante el proceso de selección, embalaje y guarda se han identificado *B. cinerea*, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler., *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link., *Stemphylium botryosum* Wallr., *Colletotrichium gloeosporioides* Penz., *Rhizopus stolonifer* (Ehremb.) Lind., *Penicillium* sp., *Epicoccum nigrum* Link ex Fr y *Fusarium* spp.. De todos éstos, los tres primeros han tenido importancia económica, siendo necesario recurrir a su control, tanto en pre como en

postcosecha. A nivel de huerto, el control químico esta orientado principalmente hacia *B. cinerea*, *F. putrefaciens* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (GUERRERO, 2000).

2.1.2.1 *Botrytis cinerea* en arándano. Los síntomas observados en precosecha se caracterizan por un rápido atizonamiento de brotes, marchitez y necrosis foliar y floral. En post-cosecha afecta a las bayas en el almacenamiento, produciendo una podredumbre gris.

El ataque del hongo se favorece con climas húmedos y templados fríos, la existencia de lluvias y rocíos frecuentes son causas predisponentes, condiciones habituales en el sur de Chile. Las conidias son diseminadas por el viento y el salpicado de la lluvia. Sobrevive como conidias, micelio o esclerocios en tejido enfermo o como saprófito en materia orgánica en tejidos muertos. Para su control se recomiendan tratamientos químicos de preinfección con los siguientes fungicidas: benomilo, carbendazima, iprodione, procimidone, vinclozolin, entre otros (GUERRERO, 1988). Los estados fenológicos de mayor susceptibilidad a *B. cinerea* son flor-cuaja y madurez (BENSCH y GUERRERO, 2001).

En las Figuras 2 y 3 se aprecian los daños provocados por este patógeno en arándano, observándose atizonamientos foliares y florales, como también el típico moho gris de los frutos en post cosecha y en las épocas invernales la presencia de esclerocios en cañas.



FIGURA 2 Presencia de *Botrytis cinerea* Pers ex Fries, en hojas y formación de esclerocios en caña de arándano.

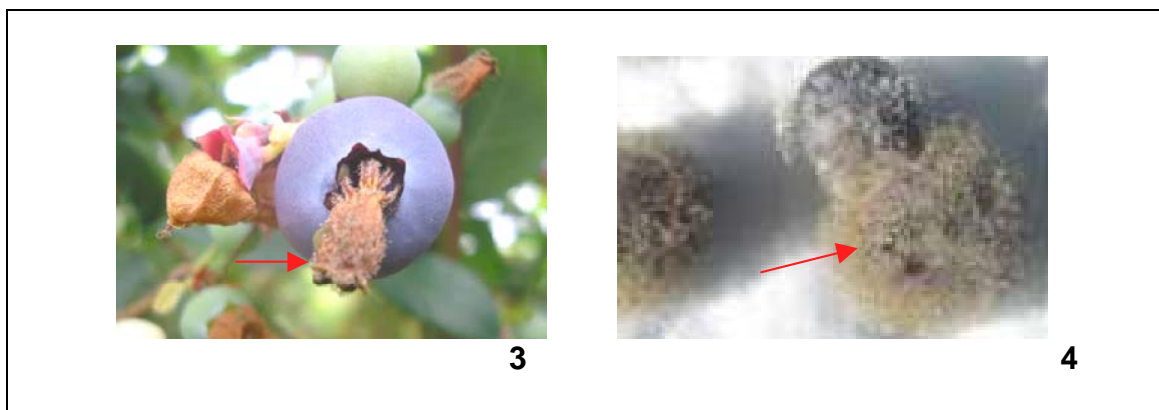


FIGURA 3 Atizonamiento de estructura florales de arándano y moho gris en frutos de arándano, provocado por *Botrytis cinerea* Pers ex Fries.

2.2 *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries .

B. cinerea el agente causal de la enfermedad del “moho gris”, puede infectar a muchas frutas, vegetales y cultivos ornamentales. Por los problemas que provoca en postcosecha y almacenaje de los frutos, es reportado como el patógeno más importante en el cultivo de arándano.

Puede atacar plantas enteras o sus partes en el campo, como también sus productos después de cosechados, dando lugar a la llamada pudrición gris o moho gris. Probablemente la mayoría de las pudriciones que ocurren en

productos almacenados comienzan en el campo y escapan a la detección, debido a que muchas de esas infecciones son latentes (CIAMPI *et al.*, 1993).

Este hongo aparece abundantemente a través del año como un saprófito y parásito facultativo, volviéndose en ocasiones muy agresivo si las condiciones son favorables (Jarvis, 1962, citado por TORTORA, 1993).

2.2.1 Clasificación. La clasificación taxonómica de este hongo, según Ulloa y Hanlin (2000) citados por MILANCA (2001), es la siguiente:

Dominio Eucariota

Reino Mycota

Phylum Ascomycota

Clase Deuteromycete

Familia Moniliaceae

Género *Botrytis*

Especie *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea es la expresión de la fase imperfecta o asexual (anamorfa) del género *Botryotina*, al cual corresponde a la fase perfecta o sexual (telomorfa) (AGRIOS, 1997).

2.2.2 Síntomas. *B. cinerea* produce un rápido atizonamiento, marchitamiento y necrosis de los brotes foliares y florales; en frutos, causa la “pudrición gris” en postcosecha. Estas infecciones, se producen principalmente en ambientes fríos y húmedos, condiciones en las cuales el micelio del hongo produce numerosas conidias, que ocasionan luego más infecciones (Moore-Landecker, 1972 citado por MILANCA, 2001).

La presencia *B. cinerea* en las plantas, provoca cantidades de exudados, liberados desde los tejidos. En las hojas, se forman áreas necróticas en

diferentes partes. La acción de *Botrytis*, predispone a la incidencia de otros agentes fitopatógenos como *Rhizopus* y *Monilinia* (Blakeman, 1980 citado por MILANCA, 2001).

2.2.3 Características morfológicas. Dentro de las estructuras morfológicas de la especie *Botrytis cinerea*, se puede destacar micelio, conidióforos, conidias y esclerocios.

2.2.3.1 Micelio y conidióforo. La morfología del talo es sencilla y del tipo de los ascomycetes, el crecimiento hifal es en forma ramificada, las extensiones suceden en el ápice hifal, donde germinan las esporas (Jarvis, 1977 citado por MOLINA, 1994). Los conidióforos se presentan en formas libres, formando estructuras delgadas y del tipo ramificado (Ellis, 1971; citado por TORTORA, 1993). El crecimiento aumenta con el tiempo, hasta que un nivel constante es alcanzado. Las septas son frecuentes, perforadas por poros simples. La colonia se desarrolla ampliamente, llegando a un diámetro de 6 cm o más en 10 días a 20 °C, donde en un comienzo el micelio es hialino, para tornarse luego en gris a gris cafésoso (Domsch y Gams, 1980 citado por MOLINA, 1994).

El micelio de *B. cinerea* está formado por segmentos que contienen numerosos núcleos. Estos núcleos pueden pasar entre los poros de la membrana celular que separa estos segmentos. En la naturaleza existe una gran variación desde el punto de vista morfológico; pero sobre todo desde el punto de vista fisiológico (adaptaciones al pH del medio nutritivo, temperatura, humedad del aire, etc) (Brechtbuhler, 1977 citado por GOMEZ, 1984)

2.2.3.2 Conidias. *B. cinerea* produce conidias hialinas o levemente coloreadas, unicelulares, ovoides o esféricas, sobre pequeños esterigmas en el extremo de conidióforos ramificados, los cuales son desarrollados libremente sobre el sustrato. A diferencia de las conidias, las ascosporas rara vez ocurren en la

naturaleza y éstas no se han reportado en Chile. Por este motivo la pudrición gris causada por *B. cinerea* en numerosos cultivos anuales, bianuales y perennes tendría su origen en la infección iniciadas por las conidias (LATORRE y RIOJA, 2002).

Las células hifales como las conidias de *B. cinerea*, son multinucleadas y el tamaño conidial está directamente relacionado con el número de núcleos que este tenga (Domsch y Gams, 1980; citado por MOLINA, 1994). TORTORA (1993) menciona a Douglas *et al* (1987), el cual señala que el tamaño de las conidias depende mucho del pH del medio, relación C:N, nutrientes del medio de cultivo, año del cultivo y de la humedad relativa del aire.

2.2.3.3 Esclerocios. Está constituido por filamentos de micelio entrelazado, formando una estructura de consistencia dura de color negro (Ellis, 1971; citado por MOLINA, 1994).

Según COLEY-SMITH (1980), existen tres estados en el crecimiento de los esclerocios de *B. cinerea*: iniciación (formación de pequeños y discretos cuerpos incipientes), desarrollo (crecimiento total del esclerocio) y la maduración (delimitación de la superficie, cambios internos y pigmentación de las hifas periféricas). El autor además agrega que la formación de estos esclerocios, pueden estar influida por la temperatura, pH y sustrato.

2.2.4 Infección. Las fases de infección de *B. cinerea*, según BENITO *et al* (2000) son las siguientes:

- La adhesión al hospedero y la germinación de las esporas sobre la superficie del hospedero.

- Su penetración en el tejido vegetal, ocurre a través de heridas o de aberturas naturales, mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración de algunos sistemas.
- El establecimiento del patógeno en la zona de penetración, causando la muerte de células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta
- En muchos casos se inicia una fase de latencia, durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en las áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias.
- Transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias, el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación en el tejido vegetal circundante a partir de aquellas, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve período de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.

2.2.5 Control. Los fungicidas han pasado a constituir una pieza clave en la obtención de buenos rendimientos y productos de calidad. Actualmente en el mercado se encuentra una amplia gama de estos, pudiendo satisfacer las expectativas de control al ataque de diferentes hongos.

La aplicación de fungicidas en tratamientos de pre y postcosecha al huerto de arándanos y tratamientos de postcosecha a la fruta, mejoran la

calidad del producto durante su almacenamiento y comercialización (Auger, 1987, citado por BENSCH y GUERRERO, 2001).

En Chile, los botricidas más eficientes y por consiguiente más usados son los benzimidazoles, las dicarboximidias, dicloran y captan. El uso de estos productos está limitado por las normas de tolerancia en residuos de los países importadores, lo que reduce las posibilidades de uso, favoreciendo el fenómeno de resistencia del hongo a fungicidas (CARREÑO y ALVAREZ, 1989).

Es importante recalcar que el control químico como única medida no es suficiente para una efectiva prevención de *B. cinerea*, siendo necesario de considerar otros aspectos en un programa de lucha contra éste patógeno (CIAMPI *et al.*, 1993). Para el caso de la uva, ESTERIO *et al.* (2003) han considerado tres medidas distintas para un programa de control integrado:

- uso del aire forzado como agente minimizador de pudriciones por *Botrytis* sp.;
- incorporación de fungicidas orgánicos naturales no sintéticos en el programa de manejo de la enfermedad, como es el caso de BC-1000, fungicida elaborado en base a extractos de pulpa y semilla de pomelo, y
- el uso de fungicidas biológicos como Trichodex, producto formulado en base a micelio y propágulos del aislado T39 del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai.

2.3 Benzimidazoles.

Estos fueron introducidos hace 30 años en muchos viñedos de Europa contra el “moho gris”.

Según su mecanismo de acción, LEROUX *et al.* (2002), clasifican a los benzimidazoles carbendazim o MBC y tiofanato-metil, como fungicida anti-

microtubulos. CARRILLO (1992) indica que estos productos comparten como sitio de acción la formación de un complejo con la tubulina, bloqueando de esta forma la mitosis. Tanto benomilo como tiofanato metil se transforman en la planta en carbendazima. La carbendazima es muy activa contra Ascomycetes y Deuteromycetes, menos activa contra Basidiomycetes y con una actividad nula contra Oomycetes y Zygomycetes. Las plantas superiores y los mamíferos no son afectados por la carbendazima.

Los benzimidazoles tienen un escaso efecto inhibitor sobre la germinación de las esporas, pero alteran el desarrollo del tubo germinativo, la multiplicación celular y crecimiento de los haustorios y de las hifas (CARRILLO, 1992). Los benzimidazoles entran a la célula del hongo y se ligan al tubulin (una subunidad de microtubulos) de formas sensibles. Esto inhibe el ensamble de los microtubulos e interfiere con varios procesos en los que los microtubulos están involucrados, así como la división celular y crecimiento de la hifa. La división celular del hongo es inhibida en la metafase (cuando los cromosomas son separados). Una mutación que disminuya los puentes de afinidad de la tubulina a un benzimidazol crea cepas de resistencia (DELP, 1988).

Debido a la alta especificidad en cuanto a su sitio de acción, cambios de un solo aminoácido en la estructura de la β tubulina altera el sitio de unión y de esta manera se desarrollan formas resistentes en los hongos, las cuales presentan un alto potencial biológico (CARRILLO, 1992).

2.3.1 Resistencia a benzimidazoles. La resistencia se define como aquel cambio heredable y estable de un hongo a la acción de un fungicida que se traduce en una menor sensibilidad al compuesto químico (Delp y Dekker, 1985 citado por ALVAREZ, 1991).

La resistencia a fungicidas no era un factor de preocupación, hasta que en 1970 comenzaron a ser comercializadas sustancias muy activas con sitios de acción específicos. Tales productos son la base de fungicidas como los benzimidazoles, dicarboximidas, pipeazinas piridinas, triazoles, imidazoles, pirimidinas y fenilamidas (CIAMPI, 2002). Con respecto a esto mismo, AUGER (1991) menciona que los fungicidas inhibidores de muchos sitios de acción no tienen una forma específica de actuar, por lo tanto, la resistencia aparecerá con menor probabilidad y el hongo necesitará mutar varias vías a la vez. En el caso de los fungicidas que actúan en un sitio específico del metabolismo del hongo, basta una mutación para que la resistencia se produzca. En este grupo se encuentran los benzimidazoles y tiofanatos que tienen como principio tóxico el metil-benzimidazol-2-il carbamato (MBC).

Las razas de *Botrytis* resistentes a benzimidazoles pueden presentarse a niveles bajos en la población, sin embargo, por acción del fungicida que reduce selectivamente a los individuos sensibles, los escasos resistentes se adaptan y sobreviven, aumentando considerablemente en ese medio, perdurando en la población por un largo periodo, a pesar de no haberse considerado la aplicación de benzimidazoles. En cambio, las razas resistentes a dicarboximidas disminuyen su frecuencia dentro de la población natural en invierno, una vez que cesan las aplicaciones de estos fungicidas; pero aunque disminuyen no desaparecen por varios años (AUGER y ESTERIO, 1997).

Patógenos que presentan una alta frecuencia de mutaciones dentro de su población, ciclos cortos y una masiva producción de esporas, tienen una mayor probabilidad de adquirir resistencia cuando actúa un agente selectivo. Las razas resistentes a estos fungicidas, con excepción de pocos casos, tienen un potencial biológico similar a las razas sensibles y pueden competir con éxito contra ellas. Una población resistente a los benzimidazoles persiste cuando se establece en un área (AUGER, 1991).

2.3.1.1 Antecedentes de resistencia a benzimidazoles en Chile. En Chile, la primera detección de cepas de *B.cinerea* resistentes a benzimidazoles fue informada en 1979, encontrándose cepas que fueron capaces de crecer y esporular abundantemente en un medio que contenía una concentración 4.000 veces mayor que la necesaria para inhibir las cepas sensibles. Estas provenían de parronales donde se había usado benomilo en forma exclusiva y repetidamente (Montealegre, 1991 citado por MONTEALEGRE y VASQUEZ, 1995)

Por otro lado, se indica que por lo menos un 33% de las cepas de *B. cinerea* que producen la pudrición de la cavidad calicinal en peras, son resistentes a las dosis comerciales de benomilo y tiabendazol, limitando el control de este hongo en postcosecha (Montealegre, 1991 citado por MONTEALEGRE y VASQUEZ, 1995).

2.3.1.2 Estrategias para evitar la resistencia. Según AUGER (1991), las estrategias más recomendadas son:

- los fungicidas no deben utilizarse en forma exclusiva e intensiva por períodos largos. Deben administrarse en forma que reduzca al mínimo la presencia selectiva. Los fungicidas que pueden presentar problemas de resistencia deben ser aplicados sólo durante los períodos más susceptibles de la planta, y
- usar mezclas o recurrir al empleo alternativo de fungicidas, para retardar la aparición de resistencia. La efectividad de esta estrategia va a depender de la habilidad parasítica que puedan desarrollar las razas resistentes.

Una de las formas de lucha contra la presencia de razas resistentes es el empleo de fungicidas hacia los cuales ellas presentan resistencia cruzada negativa (Kato *et al.*, 1984; Nakamura *et al.*, 1986, citados por ALVAREZ,

1991). Resistencia cruzada negativa (RCN) es aquel fenómeno en que el gen de un hongo confiere resistencia a un determinado fungicida y a su vez extrema sensibilidad a otro (Leroux *et al.*, 1985, citados por ALVAREZ, 1991).

El empleo alternativo de fungicidas de diferente modo de acción, presenta la posibilidad que durante la ausencia del fungicida de riesgo, la fracción susceptible de la población fungosa tendrá tiempo para recuperarse y desplazar a la fracción resistente. Pero existen evidencias que las razas resistentes siguen predominando en las poblaciones fungosas durante largos períodos luego que cesa la selección (AUGER, 1991).

El empleo de una mezcla de un producto químico de eficacia multilocal y otro fungicida de especificidad unilocal, tendría la ventaja de mantener baja la población del patógeno, sin embargo, la selección de razas resistentes frente al fungicida de acción unilocal sería continua (AUGER, 1991).

3 MATERIAL Y METODO

De acuerdo al objetivo general planteado en este trabajo, se estudió la morfología de distintos aislamientos de *B. cinerea* tanto resistentes como sensibles a benomilo, estas fueron obtenidas a partir de ceparios de investigaciones anteriores, en los cuales se había dilucidado su condición de resistencia o sensibilidad a benomilo.

Esta tesis es parte de una investigación realizada en conjunto con dos estudiantes más, los cuales realizaron análisis moleculares de los aislamientos resistentes a benomilo (PEREZ, 2004) y evaluación del grado de resistencia a los fungicidas captan, benomilo e iprodiona de estos aislamientos (ZAMORANO, 2005). La presente tesis contempla las observaciones morfológicas y patogénicas de los diferentes aislamientos considerados en los estudios anteriormente mencionados.

A continuación, se detallan las actividades, materiales y el método de análisis de los resultados del presente estudio.

3.1 Ubicación del ensayo.

La investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, Valdivia.

3.2 Materiales.

Los materiales que se detallan a continuación, fueron necesarios para el desarrollo de este ensayo.

3.2.1 Material de laboratorio y equipos. Los implementos que se usaron en laboratorio se indican a continuación: placas Petri de 10mm y de 6mm de diámetro; tubos de ensayo 14x1,5 y de 10x1,2mm; portaobjetos y cubreobjetos; matraces, vasos precipitados, pipetas y probetas; tubos de vidrio; autoclave manual, autoclave (Quimis ISO 9002), estufa de cultivo (Memmert); estufa esterilizadora de aire caliente (Memmert) y (Orthmann), microondas (Somela), refrigerador (Fensa), agitador magnético (Sybron), balanza analítica (Sartorius), microscopio óptico: aumento máximo 1000X (Matic), lupa estereoscópica: aumento máximo 50X, pie de metro digital (Mitutoyo), contador de colonias (Leica), cámara de flujo laminar (Labconco), ohmímetro digital, higrómetro, termómetro, bolsas plásticas, papel absorbente, algodón hidrófilo y cardé, papel aluminio y plástico (Alusa foil y Alusa plas), agar papa glucosa (Merck), carta de color Munsell® 1 For Gray, etanol al 96%, alcohol de quemar, mechero a alcohol y a gas, aguja enmangada, lápiz marcador permanente, cinta adhesiva de papel, parafilm, sacabocado de 9 y 4mm, agua destilada, papel filtro, ácido láctico al 25%, cloruro de sodio (sal común).

3.2.2 Material biológico. Para realizar el presente estudio, el material biológico de *B. cinerea* se obtuvo de ceparios *in vitro* almacenados en frío en el Laboratorio de Fitopatología. Estos aislamientos del hongo fueron utilizados recientemente en estudios de resistencia a fungicidas por otros alumnos de la misma Facultad. De estos fueron seleccionados 13 aislamientos de *B. cinerea* recolectados en febrero del 2003, desde plantas de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. y una de *Vaccinium ashei* Reade). Estos ejemplares del patógeno son provenientes de la Región metropolitana, VIII y IX, de estructuras vegetativas y reproductivas de la planta; para la prueba de virulencia se utilizó manzanas cv. Granny Smith.

3.3 Método.

En este punto se describe la metodología que se usó para realizar la parte práctica, la cual consta de las siguientes actividades:

3.3.1 Aislamiento de cepas de *B. cinerea*.

Se procedió a repicar el material biológico desde los tubos de cepario, conservados en medio de cultivo en el laboratorio, en cámaras refrigeradas.

En el Cuadro 2 se detallan la procedencia y cultivares de los aislamientos en estudio:

CUADRO 2 Aislamientos de *Botrytis cinerea* provenientes de localidades ubicadas desde la V a la IX Región, obtenidas de cultivares de *V. corymbosum* y *V. virgatum*, utilizados en este trabajo.

Aislamiento	Región	Localidad	Especie	Cultivar
1	Metropolitana	Lampa	<i>V.corymbosum</i>	O`Neal
2	V	Petorca	<i>V.corymbosum</i>	Marimba
3	VIII	Los Angeles	<i>V.corymbosum</i>	Blueray
4	IX	Collipulli	<i>V.corymbosum</i>	Bluecrop
5	VIII	Chillán	<i>V. virgatum</i>	Premier
6	VIII	Los Angeles	<i>V.corymbosum</i>	O`Neal
7	VIII	Los Angeles	<i>V.corymbosum</i>	Bluejay
8	VIII	Arauco	<i>V.corymbosum</i>	Bluejay
9	VIII	Chillán	<i>V.corymbosum</i>	Elliot
10	IX	Collipulli	<i>V.corymbosum</i>	Bluejay
11	IX	Collipulli	<i>V.corymbosum</i>	O`Neal
12	IX	Angol	<i>V.corymbosum</i>	Bluehaven
13	IX	Angol	<i>V.corymbosum</i>	Patriot

(Material e información facilitada por Laboratorio de Fitopatología)

El aislamiento consistió en repicar estos tubos a placas Petri con agar papa dextrosa y colocarlas en una estufa de cultivo a una temperatura de 22 ± 2 °C; así se obtuvieron los cultivos de *Botrytis*. Luego fueron repicados varias veces hasta constatar su pureza a través de observaciones macro y microscópicas; se finalizó sembrando en tubos de 10 x 1,2mm de agar inclinado, los cuales fueron tapados con algodón cardé y llevados a la estufa a 22 ± 2 °C, por tres días. Se mantuvieron en refrigerador a 4°C. De los trece aislamientos utilizados, 5 son sensibles y 8 resistentes a benomilo.

En el Cuadro 3, se observa el comportamiento de resistentes o susceptibles a la dosis crítica de 5 ug/ml de benomilo, probada por PEREZ (2004) y ZAMORANO (2005), de los aislamientos utilizados en el presente estudio.

CUADRO 3 Aislamientos que presentan resistencia y sensibilidad a 5 ug/mL de benomilo.

Resistencia a	Aislamientos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
5ug/mL de benomilo	X	X	S	X	X	S	S	S	X	S	X	X	X

X= resistente, S= sensible

3.3.2 Preparación del material para el comienzo del estudio

Las cepas mantenidas en tubos se repicaron en placas Petri de la siguiente forma:

- de cada tubo se repicó la cepa en placas con agar papa dextrosa (APD) en duplicado, las cuales se mantuvieron en una estufa de cultivo a 22 ± 2 °C por dos días. Al cabo de este tiempo se tomó una placa y se obtuvo dos trozos de agar con micelio desde la zona de crecimiento de la colonia, mediante un sacabocado de 4mm de diámetro;

- este disco fue depositado en el centro de 2 placas Petri de (7cm de diámetro), las cuales tenían 10 mL de medio APD (Difco), dejando el micelio en contacto con el agar, estas fueron incubadas en la estufa de cultivo a 22 ± 2 °C por dos días.
- finalmente para estudiar las características de las cepas se usó uno de estos cultivos puros por cepa, desde esa placa se obtuvo de la zona de crecimiento 4 discos de agar con un sacabocado de 8 mm, los cuales fueron depositados en el centro de 4 placas Petri de 10mm, en contacto con el agar, con 20 mL de agar papa dextrosa (Figura 4).

Por cada cepa se tenían 4 repeticiones o sea 4 placas, estas fueron incubadas en el laboratorio a temperatura ambiente ($\pm 17^{\circ}\text{C}$), selladas con parafilm y envueltas en bolsas plásticas, en las que cabían 16 placas aproximadamente. La disposición de las repeticiones fue al azar en las bolsas y día a día se fueron cambiando las placas de lugar entre ellas; luego de las anotaciones.

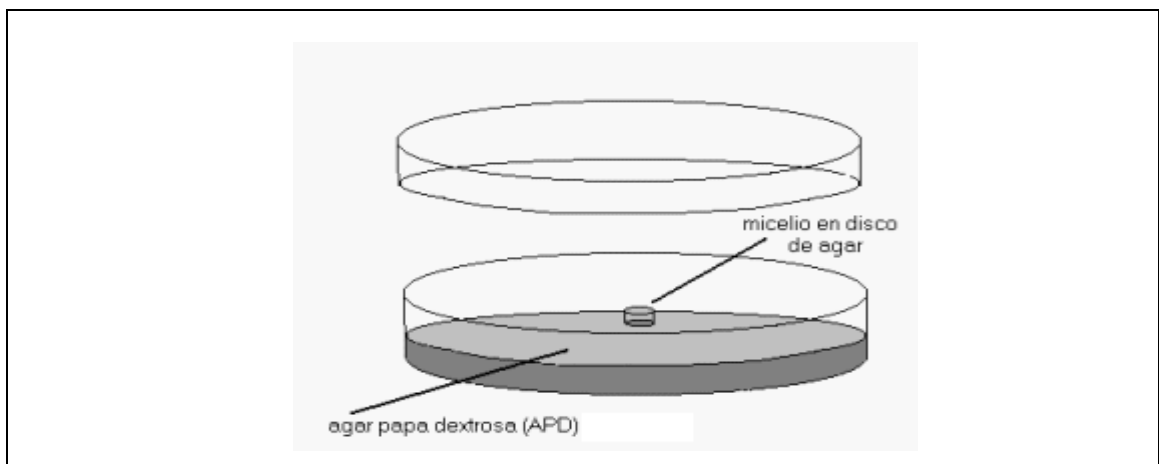


FIGURA 4 Esquema representativo de la forma de siembra de los aislamientos *Botrytis cinerea* sobre placas de agar papa dextrosa (APD).

FUENTE: Adaptado de PEREZ (2004).

3.3.3 Características consideradas en este estudio

En la presente tesis se contemplaron cinco características, tanto morfológicas y patogénicas, para los aislamientos de *B. cinerea* utilizados: crecimiento diario del micelio, esporulación, número de esclerocios, color del micelio y virulencia medida a través de la conductividad eléctrica. Estas mediciones se llevaron a cabo en un mes aproximadamente. Contabilizando el día de siembra de las cepas como día cero.

3.3.3.1 Crecimiento diario del micelio. Para establecer cuánto era el crecimiento diario de cada cepa, se realizaron mediciones a las 24, 48 y 72 horas desde que se depositó el disco de micelio en el centro de cada placa. Se trazó dos rectas que se cruzan en el centro de la placa, justo donde se depositó el disco con micelio; de esa manera, por cada placa se tomó dos mediciones, la primera en forma horizontal y la segunda en forma vertical con respecto de la identificación de cada repetición la cual estaba al borde de la placa; para luego ser promediadas. Las mediciones se hicieron con ayuda de un contador de colonia que permitió marcar claramente el borde de la colonia y el pie de metro digital que entregaba los datos en milímetros.

3.3.3.2 Esporulación. Esta característica fue estimada visualmente en porcentaje de cada cepa a través de sus cuatro repeticiones, las observaciones se comenzaron desde el día 1 hasta el día 21. Las observaciones macroscópicas fueron realizadas en la cámara de flujo laminar para evitar todo tipo de contaminación, ya que se debió observar destapando las placas Petri bajo la lupa, así constatar la presencia de conidióforos con sus conidias. Se dividió el análisis de esta prueba en dos ítem, rapidez de esporulación y nivel de esporulación.

3.3.3.2.1 Rapidez de esporulación. Se observó el tiempo en días que tomaron cada aislamiento en comenzar a esporular. Considerando esporulación el momento en que se observaban los conidióforos con presencia de conidias.

3.3.3.2.2 Nivel de esporulación. Se le otorgó un porcentaje correspondiente al nivel de esporulación observada con respecto a la superficie de la placa, que ocupa la cepa, el criterio fue siempre el mismo. Se facilitó este procedimiento gracias a la división realizada por las rectas trazadas en la base de la placa, ya que la superficie de esporulación del hongo quedaba dividida en cuatro secciones. Al no observar esporulación se les otorgó el 0%, si un cuarto de la superficie de la colonia del hongo, presentaba conidioforos con conidias, se le asignaba un 25 % de esporulación y así sucesivamente, ya sea con menores o mayores niveles de esporulación.

Para cierto tipo de micelio de un color más oscuro o más bajo en altura, fue necesario realizar observaciones microscópicas, ya que bajo la lupa era difícil pronunciarse.

3.3.3.3 Número de esclerocios. Se contabilizaron a simple vista el día 20 desde la siembra, cuando estos se encontraban maduros, evidente por su coloración oscura. Fueron contados en la base de la placa, y se fueron marcando para facilitar el recuento.

3.3.3.4 Color de micelio. Fue evaluado el día 10, después de la siembra, a través de una carta de color Munsell® 1 For Glay. Esta evaluación consistió en ir comparando el micelio de las cepas con la tabla de color, una vez recogidos estos datos, se le otorgó a cada color un número según la intensidad de éste.

3.3.3.5 Virulencia. Para esta prueba se utilizaron trozos de manzana cv. Granny Smith de una misma dimensión. Todos los materiales ocupados estaban estériles para evitar la contaminación, exceptuando las manzanas que fueron desinfectadas en una solución de alcohol al 70% para después ser sumergidas en agua destilada estéril, secadas con papel absorbente estéril. Con ayuda de un sacabocado de 10 mm de diámetro se obtuvo trozos de manzana de un mismo grosor, luego se cortaron con un bisturí a un largo de 4,5 cm, es importante mencionar que todas estas labores fueron realizadas en la cámara de flujo laminar, flameando con alcohol tanto el sacabocado como el bisturí en cada uso. Luego se obtuvo de la zona de crecimiento de la colonia un disco de micelio de 4mm, el cual se depositó en el centro del trozo de manzana y en contacto con el trozo de manzana, estos fueron colocados sobre portaobjetos en cámaras húmedas estériles, hechas con papel filtro, sobre tubos en U; para que la humedad se mantuviera en las cámaras se colocaron 4 ml de agua destilada estéril. Estas cámaras fueron dispuestas al azar dentro de campanas de vidrio sobre un mesón del Laboratorio de Fitopatología, disponiendo de a seis placas en cada una de ellas.

En el centro de las campanas se ubicó un vaso precipitado con 100 mL de agua destilada estéril y 50 g de cloruro de sodio para obtener una solución saturada, esto permitió mantener una humedad relativa del 100% medida con ayuda de un higrómetro. Para evitar escapes de humedad de las campanas se sellaron los bordes de éstas con cinta adhesiva. Al tercer día se desmontó el experimento y se procedió a hacer las mediciones de resistencia eléctrica con ayuda de un ohmiómetro digital, a través de la introducción de electrodos en los dos extremos del trozo de manzana, de esta manera se fueron registrando las mediciones en kilohmios ($k \Omega$). Posteriormente se realsó el hongo en placas de APD para cumplir con los postulados de Koch (TORTORA, 1993).

3.3.3.6 Análisis estadístico. Las variables de este experimento presentan un diseño completo al azar. Los análisis estadísticos (transformaciones, homogeneidad y análisis de varianza) fueron realizados mediante el programa computacional Statgraphics Plus 2.0.

La única variables no paramétrica fue el número de esclerocios. En cuanto a la esporulación al ser medida en porcentaje fue transformada a $\arcsen \sqrt{x/100}$ (MORALES, 2005).

La prueba de rango múltiple utilizada, en los casos de encontrar valores F significativos, correspondió a de Duncan al 95% de confianza y el Test de comparaciones múltiples de Dunn en la variable no paramétrica.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

Este trabajo es parte de un estudio general sobre la prevalencia de cepas de *B. cinerea* en medios productivos. Especialmente cuando esta presencia del patógeno, está relacionada con la aparición de resistencia a fungicidas como benomilo, comúnmente utilizado en Chile. Las investigaciones realizadas recientemente, indican que aislamientos de *B. cinerea* resistentes a fungicidas, pueden ser detectados molecularmente (PEREZ, 2004) o bien realizando pruebas de resistencia en medios de cultivo con distintas dosis de fungicidas (ZAMORANO, 2005). El presente trabajo experimental trató de determinar si las características morfológicas y patogénicas permiten diferenciar entre aislamientos resistentes y sensibles a benomilo.

Es así como se presentan y discuten a continuación los resultados obtenidos en los ensayos relacionados con las características morfológicas y de patogenicidad de los aislamientos y su resistencia a benomilo.

4.1 Cepas de *Botrytis cinerea*.

Se utilizaron 13 cepas desde tubos de cepario mantenidos en el Laboratorio de Fitopatología, los cuales ya habían sido utilizados anteriormente por otros estudiantes para la realización de sus tesis de grado, en temas relacionados a *B. cinerea* y su resistencia a fungicidas. Tanto PEREZ (2004) como ZAMORANO (2005), realizaron pruebas de resistencia a benomilo a la dosis crítica de 5 µg/mL de ingrediente activo con las cepas empleadas en este estudio. Por consiguiente, se cuenta anticipadamente con la información de que ocho de ellas son resistentes y cinco sensibles a ésta dosis.

A modo de facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, en el Cuadro 4 se presentan los aislamientos que son resistentes y sensibles a la dosis crítica de 5 µg/mL de i.a de benomilo, así como la nomenclatura utilizada para distinguir a los aislamientos en la evaluación de los resultados.

CUADRO 4 Aislamientos de *Botrytis cinerea* resistentes y sensibles a 5 µg/mL de benomilo y nomenclatura utilizada en el presente estudio.

Resistencia a 5 µg/mL de benomilo	Aislamientos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	X	X		X	X				X		X	X	X
Nomenclatura	R1	R2	S3	R4	R5	S6	S7	S8	R9	S10	R11	R12	R13

X = resistentes a benomilo

Antes de comenzar los análisis considerados en este estudio, es importante mencionar que *B. cinerea*, es una especie que se presenta con numerosas variaciones fenotípicas con respecto a su morfología, crecimiento micelial, intensidad de esporulación, virulencia, producción enzimática o resistencia a fungicidas tanto como diverso genéticamente (Chardonnet *et al.*, 2000; Di Lenna *et al.*, 1981; Leroux *et al.*, 2002 y Movahedi *et al.*, 1990, citados por MARTINEZ *et al.*, 2005).

4.2 Relación entre crecimiento diario del micelio y resistencia a benomilo.

En este punto se presenta el grado de avance micelial de los aislamientos, medido en milímetros (mm/día). Tanto aislamientos sensibles como resistentes muestran un crecimiento acelerado, alcanzando algunas cepas el borde de la placa al tercer día, por esta razón se realizaron tres mediciones por repetición.

Los resultados (Cuadro 5) muestran que no existen diferencias en el crecimiento de las cepas resistentes y las susceptibles a benomilo. Estos datos confirman que las cepas resistentes a este fungicida pueden alcanzar altos niveles de crecimiento y ser competitivas con las especies sensibles, aún en ausencia de la presión causada por los plaguicidas. Esto explica que estas cepas puedan mantenerse en el medio ambiente largo tiempo después del retiro de este fungicida.

Los resultados de la prueba sobre crecimiento diario de las cepas, se resumen en el Cuadro 5, donde se presentan el crecimiento diario de cada aislamiento y los grupos conformados por estos. La media del crecimiento para tres días, osciló entre 15,03 mm (aislamiento S10) y 24,01 mm (aislamiento S7). Además, se pueden apreciar dos grandes grupos, ambos constituídos por aislamientos resistentes y sensibles. Uno en que se observó un crecimiento diario más lento, presentando promedios entre 15,03 a 18,8 mm/día. El otro grupo, manifiesta un crecimiento más rápido, con promedios que van desde 19,91 a 24,01mm/día.

El crecimiento diario se presenta en el Anexo 2 los resultados de la tasa de crecimiento diario de las cepas y en el Anexo 3 referidas al máximo, medio y mínimo del crecimiento micelial diario.

A diferencia del presente trabajo, GOMEZ (1984), en su estudio observó que el crecimiento promedio de las cepas resistentes fue ligeramente inferior al crecimiento de la cepa sensible sobre el medio de agar papa dextrosa sin fungicida, en cambio en el presente estudio no se presentaron diferencias entre ambas, incluso dos aislamientos sensibles presentan un crecimiento inferior a varias cepas resistentes, como lo fueron las cepas S3 y S10.

CUADRO 5 Crecimiento diario de cepas de *B. cinerea* resistentes y sensibles a benomilo, expresado en mm/día.

Cepa	Crecimiento diario	Grupos*
S7	24,01	a
S8	22,46	a b
S6	22,26	a b
R5	22,15	a b
R4	21,44	a b c
R12	21,19	a b c
R1	19,91	a b c
R11	19,91	a b c
R2	18,88	b c d
S3	18,75	b c d
R13	18,24	b c d
R9	17,84	c d
S10	15,03	d

* Letras distintas en la columna indican diferencias significativas al 95% de confianza (P-valor<0.05).
DUNCAN

S = sensible y R = resistente

GOMEZ (1984), cita a Bollen y Scholten (1971), para indicar que el crecimiento más bien lento, en cultivo, de las cepas resistentes a benomilo, hace cuestionar la habilidad de las cepas resistentes para competir y sobrevivir en la naturaleza en ausencia del fungicida. Esta aseveración, se pondría en duda al observar los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que aislamientos resistentes, presentan un rápido crecimiento miceliar sin diferencias con los aislamientos sensibles. En cuanto a los resultados obtenidos por GOMEZ (1984), éste concuerda con lo planteado por Cohen y Dennis (1975), en relación a la alta variabilidad en el crecimiento de las cepas sensibles y resistentes, por lo cual la exclusión de una forma por la otra sería improbable. Coincidiendo con lo obtenido en el presente estudio, encontrando tanto cepas resistentes como sensibles con diferentes niveles de crecimiento miceliar. Por lo tanto es imposible categorizar el grado de resistencia o sensibilidad a benomilo, en base a su velocidad de crecimiento del micelio en placas.

Como se puede constatar con los resultados del Cuadro 5, no existen diferencias estadísticamente significativas, al considerar el crecimiento promedio de resistentes y sensibles. Las diferencias obtenidas en el análisis de varianza, están dadas entre aislamientos, pero no entre los aislamientos resistentes y sensibles, para corroborar este resultado, se realizó una prueba de t-student (referirse al Cuadro 6), la cual no fue significativa, indicando en definitiva que tanto cepas sensibles como resistentes, presentan un crecimiento miceliar similar, y los diferentes grupos presentados en el Cuadro 5, están constituidos tanto por aislamientos resistentes como sensible.

CUADRO 6 Prueba de t- student para el crecimiento diario de cepas de *B.cinerea* resistentes y sensibles a benomilo.

Resistentes	Susceptibles	t-student	p-valor
19,9443	20,5032	-0,701	0,4863

Por lo tanto, los resultados indican que las cepas resistentes crecen con igual rapidez que las sensibles. Sin embargo, para entender como es que una cepa resistente puede competir con una sensible, se debe definir el término “habilidad”. AUGER (1991) se refiere a la habilidad de las cepas resistentes, definido como “la capacidad del hongo para perpetuarse en el campo en ausencia del funguicida”, incluyendo este concepto propiedades como tasa de crecimiento, esporulación, sobrevivencia invernal y patogenicidad.

La razón de que estas cepas resistentes tengan un potencial biológico similar a la de las sensibles, pudo deberse a dos razones. Primero, que la presión de selección ejercida por benomilo, por prolongados períodos de tiempo y en reiteradas ocasiones, fue seleccionando estas cepas resistentes con un alto potencial biológico, similar a las sensibles. Es así como los autores AUGER y ESTERIO (1997) se refieren a la capacidad de las cepas resistentes a

benzimidazoles igualando a las sensibles, referidas a la tasa de crecimiento y esporulación, y compiten con éxito con ellas. Esta capacidad quedó demostrada en huertos del país en que se presenta un alto porcentaje de cepas resistentes de *Botrytis* a los benzimidazoles a pesar de evitar su uso por periodos de varios años de estos fungicidas, la frecuencia de la resistencia permanece alta.

De igual manera, ALVAREZ (1996) señaló que las razas resistentes a los benzimidazoles como benomilo son estables en su resistencia e igualmente competitivas que las razas sensibles. Por lo tanto una población resistente a benzimidazoles persiste cuando se establece en un área (ESPEJO, 1995 citando a Zadocks, 1982 y Auger, 1991). Incluso en observaciones realizadas por Schuepp y Kung (1981) y Davidse (1988) citados por ESPEJO (1995), a pesar de la ausencia de tratamientos con fungicidas benzimidazólicos durante cuatro años, los niveles de persistencia de la resistencia eran entre 50-60%.

YOURMAN, *et al.*, (2001) en un estudio sobre la inestabilidad fenotípica de *B. cinerea* en ausencia de fungicidas benzimidazoles y dicarboximidas, indican que en sus experimentos la resistencia a tiofanato metil fue una característica estable, mientras que la respuesta a vinclozolin fue inestable. Además no existieron poblaciones que inicialmente fueran resistentes a tiofanato metil que llegaran a ser sensibles a este fungicida durante repetidos subcultivos, pero nueve poblaciones sensibles desarrollaron resistencia. En resumen, los autores antes mencionados, señalan que aislamientos resistentes a ambos fungicidas tienen un fenotipo más estable y que todas las poblaciones que inicialmente fueron resistentes a tiofanato metil y vinclozolin conservan este fenotipo después de 20 generaciones sobre PDA o 15 generaciones sobre plántulas de geranio. Además, indican que algunas poblaciones resistentes a ambos fungicidas llegan temporalmente a ser sensibles a vinclozolin, durante generaciones intermedias sobre PDA, pero aquellas poblaciones mantienen la resistencia a tiofanato metil.

Estas apreciaciones, resultan preocupantes debido a la estabilidad fenotípica presentada por aislamientos resistentes a benzimidazoles; incluso en ausencia de la presión de selección del fungicida, donde se ha observado en la población un cambio de tipos sensibles a tipos resistentes. Por lo tanto, es necesario tomar las precauciones necesarias ante el uso de este tipo de fungicida, considerando la presencia estable de las poblaciones resistentes a benzimidazoles y la frecuencia con que poblaciones resistentes a dicarboximidas son también resistentes a benzimidazoles; por el fenómeno de resistencia múltiple.

La segunda explicación del porqué tanto cepas sensibles, como resistentes no presentan diferenciación en cuanto al crecimiento micelial, podría ser el hecho de que la mutación de un codón puede no ser importante como gasto energético por lo tanto, la habilidad de las cepas resistentes es alta. DELP (1988) indica que los fungicidas inhibidores de muchos sitios de acción no tienen una forma específica de actuar, luego, la resistencia aparecerá con menor probabilidad y el hongo necesitará mutar varias vías a la vez.

En el caso de los fungicidas que actúan en un sitio específico del metabolismo del hongo, basta una mutación para que la resistencia se produzca (AUGER, 1991). A este respecto, CARRILLO (1992) indica que los fungicidas del tipo benzimidazoles, comparten como sitio de acción la formación de un complejo con la tubulina, bloqueando de esta forma la mitosis. Es así, que debido a la alta especificidad en cuanto a su sitio de acción, cambios de un solo aminoácido en la estructura de la β tubulina altera el sitio de unión, desarrollándose formas resistentes en los hongos, las cuales presentan un alto potencial biológico. Concordante a estas apreciaciones JUTSUM, *et al.* (1998) citan a Dekker (1976), Faretra y Pollastro (1991) ya que en sus estudios confirmaron que la resistencia a benzimidazoles fue controlado usualmente por

un gen simple y las formas resistentes fueron a menudo tan virulentas como los tipos silvestres.

DELP (1988) coincide en que poblaciones de hongos patógenos donde el control del fungicida depende de un gen simple o un paso de mutación puede mostrar un dramático cambio de sensibilidad a resistencia. Antes de usar el fungicida, la población dominante está compuesta de razas silvestres (sensibles) y de muy pocas formas resistentes. Luego de una reducción en la población sensible por el uso de fungicidas, la población resistente emerge y domina. Esto deja en claro lo sucedido por el uso continuo de benzimidazoles. En cambio, con otros fungicidas, el hongo debe recurrir a procesos bioquímicos de detoxificación o realizar varias mutaciones como en los fungicidas multisitios para lograr la resistencia.

En el caso de *B. cinerea*, la resistencia a benzimidazoles es estable en el tiempo. Esto es el resultado de la habilidad competitiva de los aislamientos resistentes frente a las poblaciones silvestres. Schuerp y Kung (1981), citados por SMITH (1998), compararon aislamientos con niveles de resistencia colectados en 1974, los que se mantuvieron sin aplicaciones de benzimidazoles por cuatro años y que al término de ese período mostraron una persistencia de la resistencia entre un 50 a 60 %. Leroux y Clerjeu (1985) citados por SMITH (1998) encontraron poblaciones de *B. cinerea* en el norte de Francia que fueron entre un 50 a 90 % resistentes seis años después de que los fungicidas benzimidazólicos fueran retirados del mercado

DELP (1988), concuerda con el hecho de que los fungicidas inhibidores de muchos sitios de acción no tienen una forma específica de actuar, por lo tanto la resistencia aparecerá con menor probabilidad y el hongo necesitará mutar varias vías a la vez. Posiblemente estos procesos al implicar un mayor gasto energético, provocarían formas resistentes menos vigorosas y con menor

perdurabilidad en el tiempo que las formas sensibles. DELP (1988) también indica, que esto es lo que sucede con la mayoría de las dicarboximidias, donde su uso no es todavía severamente limitado por problemas de resistencia. Las razas resistentes, que son fácilmente seleccionados en laboratorio y frecuentemente aislados desde el campo, son menos vigorosos que las formas silvestres y deficientemente adaptados para sobrevivir. Típicamente la resistencia llega a ser un problema después de varias estaciones de múltiples tratamientos. Si el uso de dicarboximidias es frenado, la población se puede revertir a las razas mayormente sensibles y los productos pueden llegar a ser efectivos nuevamente. Una táctica efectiva ha sido el reducir el número de aplicaciones a un tiempo crítico.

MARTINEZ *et al.* (2005) en su estudio sobre los principales tipos genéticos presentes en viñedos de Francia, señala que dentro del Grupo II, los tipos *transposa* y *vacuma*, presentan características opuestas, ya que los aislamientos *vacuma* demuestran un rápido crecimiento micelial y un bajo nivel de resistencia y viceversa para los aislamientos *transposa*. Lo que sustenta su hipótesis de que la diferencia en habilidad entre aislamientos resistentes y sensibles puede ser causa de la base genética de los aislamientos más que de su capacidad de desarrollarse en un medio. Esto sugiere la importancia del estudio de la estructura y dinámica poblacional de *B. cinerea*, ante el uso de fungicidas, en un área.

Por estas razones son tan importantes las estrategias de prevención y acción ante la posibilidad de resistencia a fungicidas. Tales como no utilizar en forma exclusiva e intensiva por períodos largos un tipo de fungicida; utilizar mezclas de fungicidas; emplear alternadamente estos productos de diferente modo de acción (AUGER, 1991) y el empleo de fungicidas hacia los cuales se presente resistencia cruzada negativa (Kato *et al.*, 1984; Nakamura *et al.*, 1986, citados por ALVAREZ, 1991). La resistencia puede ser mitigada o prevenida por

el uso temprano de diseño de programas de aspersión al prevenir la exposición de los patógenos por largo tiempo a un funguicida simple (DELP, 1988).

En definitiva no existe relación alguna entre crecimiento miceliar y la resistencia a benomilo, donde estas últimas compiten con igual capacidad que las sensibles, determinándose que no existen diferencias entre cepas sensibles y resistentes en lo que se refiere al crecimiento miceliar .

4.3 Relación entre esporulación y resistencia a benomilo.

La dispersión de *B. cinerea* se realiza a través de conidias, micelio y esclerocios, siendo la primera la principal fuente de dispersión del patógeno (GOMEZ, 1984, citando a Epton y Richmond, 1980).

En esta sección del estudio, se intentó evaluar la rapidez en esporulación y los niveles de esporulación expuestos por los aislamientos durante 21 días de observación.

4.3.1 Rapidez de esporulación. En este punto se puso atención en las cepas que expusieron una mayor rapidez en manifestar esporulación. En el Cuadro 7 se presentan los porcentajes de esporulación diaria acumulada de cada cepa, donde cada dato es el promedio de esporulación de las cuatro repeticiones por cepa. Cada porcentaje es la presencia de conidióforos con conidias, según la superficie que ocupa dentro de la placa cada cepa.

En el Cuadro 7 se aprecia que no existe diferencia alguna entre los aislamientos sensibles y resistentes, siendo cada porcentaje independiente de esta condición.

Las primeras en comenzar a esporular fueron dos de las cepas sensibles, S8 el tercer día después de la siembra y S6 al cuarto día. Sin

embargo, una de las dos últimas en esporular fue también sensible. Ya desde el quinto día, tres de los aislamientos resistentes (R2, R4 y R11) evidenciaban esporulación. Hasta el octavo día todas las cepas en estudio estaban esporulando.

En cuanto a la rapidez de esporulación de *B. cinerea*, SILVA (1992) en un estudio sobre “control biológico de *Botrytis cinerea* en frambueso”, luego de verificar la pureza de los cultivos de este hongo, observó características notablemente diferentes entre ellas, encontrando cepas de una coloración más oscura y con abundante esporulación a los 7 días de cultivo, contrastando con otras de coloración muy clara, que no presentaron conidióforos durante el mismo período de incubación pero que posteriormente, también esporularon. En el presente trabajo, también se observaron aislamientos que esporulaban un poco más lento que los otros, pero que al pasar los días también llegaron a esporular, como lo sucedido con la cepa S3, la cual comenzó a esporular lentamente, al igual que R13 que recién al quinto día comenzaron a esporular. Por lo tanto esta situación se presentó sin diferencia entre cepas sensibles y resistentes.

De igual manera sucedió con los aislamientos que esporularon más rápido, donde también existieron tanto aislamientos resistentes como sensibles. Es el caso de la cepa S8 , S6, R4 y R11 que al quinto día ya evidenciaban esporulación.

Por lo tanto, no se puede categorizar el nivel de resistencia presentado por los aislamientos y la rapidez de esporulación, siendo esta independiente de la resistencia a benomilo.

CUADRO 7 Esporulaci3n diaria acumulada (%) de 13 aislamientos de *Botrytis cinerea*, resistentes y susceptibles a benomilo

Cepa	Días																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
R1	0	0	0	0	0	1,25*	1,75	5,0	6,5	7,5	10,0	13,8	13,8	16,3	20	26,3	27,5	32,5	37,5	40,0	42,5
R2	0	0	0	0	5,0	10,0	18,8	30,0	33,8	38,8	50,0	60,0	60,0	60,0	63,8	71,3	76,3	78,8	82,5	87,5	95,0
S3	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1,5	2,5	4,25	7,5	8,75	13,8	15,0	23,8	23,8
R4	0	0	0	0	5,0	11,3	21,3	33,8	40,0	52,5	57,5	67,5	72,5	75,0	76,3	77,5	80,0	82,5	86,3	90,0	91,3
R5	0	0	0	0	0	2,5	7,5	18,8	21,3	26,3	37,5	42,5	47,5	52,5	60,0	71,3	75,0	77,5	78,8	87,5	93,8
S6	0	0	0	5,0	10,0	17,5	32,5	43,8	57,5	61,3	71,3	72,5	73,8	73,8	75,0	75,0	78,8	78,8	80,0	82,5	82,5
S7	0	0	0	0	0	0	3,75	3,75	6,25	6,25	11,3	12,5	16,3	20,0	25,0	27,5	28,8	38,8	40,0	41,3	46,3
S8	0	0	5,0	10,0	22,5	28,8	42,5	48,8	57,5	58,8	75,0	75,0	76,3	76,3	76,3	76,3	78,8	80,0	82,5	82,5	82,5
R9	0	0	0	0	0	0	3,0	13,8	16,3	17,5	26,3	27,5	27,5	27,5	35,0	35,0	35,0	37,5	38,8	38,8	40,0
S10	0	0	0	0	0	1,75	6,25	13,8	16,8	17,5	31,3	35,0	37,5	38,8	40,0	42,5	42,5	45,0	47,5	50,0	50,0
R11	0	0	0	0	0,5	4,25	8,75	16,3	20,0	25,0	36,3	41,3	45,0	50,0	55,0	61,3	67,5	77,5	81,3	90,0	92,5
R12	0	0	0	0	0	0	1,75	3,5	4,0	5,25	10,0	12,5	16,3	20,0	22,5	40,0	58,8	68,8	68,8	71,3	73,8
R13	0	0	0	0	0	0	0	1,75	1,75	1,75	3,0	3,0	5,0	7,5	13,8	18,8	21,3	25,0	32,5	36,3	40,0

(*) Cada cifra es el promedio del porcentaje de esporulaci3n, de las cuatro repeticiones, para cada aislamiento.

4.3.2 Niveles de esporulación. En cuanto a este punto, se midió diariamente el porcentaje de esporulación expuesto por cada aislamiento, con respecto a la superficie ocupada por cada uno en la placa Petri. Estas observaciones se realizaron durante 21 días (Anexo 5).

La Figura 5, representa gráficamente la esporulación acumulada de aislamientos sensibles y resistentes, expresada en porcentaje, durante 21 días.

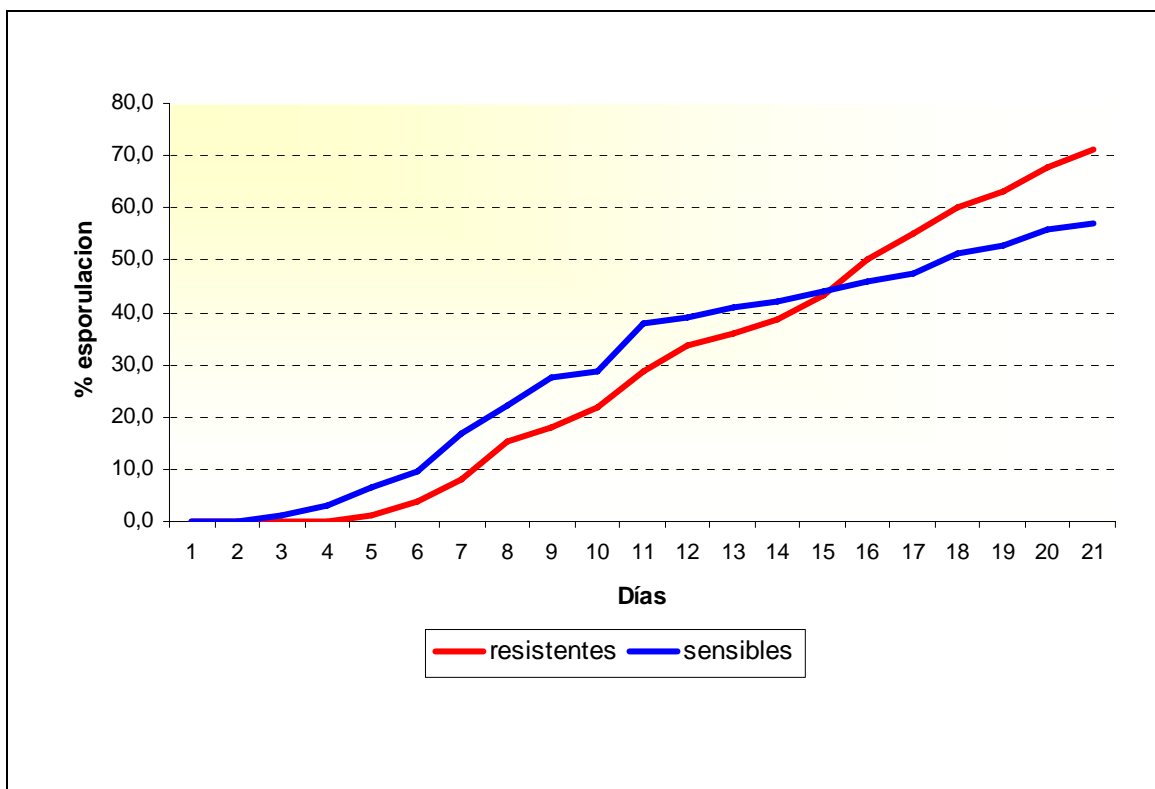


FIGURA 5 **Esporulación acumulada (%) de aislamientos resistentes y sensibles a benomilo.**

Claramente se expone como las cepas sensibles lideran los mayores porcentajes de esporulación durante los primeros 15 días, para luego los aislamientos resistentes superen los niveles expuestos por los otros aislamientos, llegando aproximadamente a un 70% a diferencia de los sensibles con un 57% de esporulación, hasta el final de este estudio. Es

interesante lo exhibido en esta gráfica, ya que puede ser indicativo, de cómo se manifiestan de mejor manera los aislamientos considerados resistentes en sustratos menos favorables, en lo que se refiere a nutrientes para el crecimiento, desarrollándose de mejor manera en condiciones adversas. Los valores utilizados en esta Figura, son los porcentajes de esporulación acumulados y promediados de todos los aislamientos sensibles y de todos los aislamientos resistentes, por lo tanto manifiestan un cierto sesgo al tomarlos como tal, ya que individualmente las cepas resistentes y sensibles presentan niveles de esporulación altos y bajos sin diferencias entre estas dos categorías.

En el Cuadro 8 es posible apreciar que existe un grupo que puede ser catalogado como buen esporulador y los otros presentan una esporulación más baja. Considerando una esporulación media de 95,0% para la cepa R2 con mayor capacidad de esporulación y 23,8% para la cepa S3 siendo la de menor esporulación. El grupo considerado como buen esporulador está constituido tanto por cepas sensibles como por resistentes. Lo mismo se observa entre el grupo de los menos esporuladores. Por lo tanto, el grado de esporulación es independiente a la resistencia a fungicidas, lo que concuerda con lo obtenido por GOMEZ (1984), donde las diferencias observadas en esta característica depende principalmente de la cepa, que de su comportamiento a benomilo. Este mismo autor cita a Sozzi y Gessler (1980), para corroborar que las cepas sensibles y resistentes a este fungicida no presentan diferencias en cuanto a la esporulación.

No obstante, lo planteado en el párrafo anterior, al realizar una prueba de t-student, donde cada grupo constituye una muestra, o sea sensibles y resistentes, se encuentran diferencias significativas para 95 % de confianza (Anexo 8). Similar a lo planteado en la Figura 5, el conjunto de promedios de esporulación exhibidos por los aislamientos resistentes, son mayores que los sensibles.

CUADRO 8 Porcentaje de esporulación, evaluada a los 21 días de cultivo, en aislamientos resistentes y sensibles a benomilo, de *B. cinerea*.

Aislamientos	% de esporulación	arc seno	Grupos*
R5	93,8	1,391	a
R2	95,0	1,378	a
R11	92,5	1,335	a b
R4	91,3	1,316	a b
S6	82,5	1,140	a b
S8	82,5	1,140	a b
R12	73,8	1,098	b
S10	50,0	0,785	c
S7	46,3	0,749	c d
R1	42,5	0,705	c d
R13	40,0	0,684	c d
R9	40,0	0,680	c d
S3	23,8	0,492	d

*: Letras distintas en la columna indican diferencias significativas al 95% de confianza (p-valor<0.05) DUNCAN

Lo exhibido por el Cuadro 8, estaría indicando que dentro de una población existen ciertos aislamientos resistentes que pueden competir en la diseminación de sus conidias y expansión dentro de un área igualando e incluso superando a cepas sensibles, en los casos donde la niveles de resistencia sean altos. Esto conlleva a problemas para el manejo y control de *B. cinerea*. Al respecto, GOMEZ (1984) cita a Fletcher y Scholefield (1976) para señalar que las cepas resistentes a benomilo dentro de un área tratada con el fungicida pueden extenderse a cultivos y zonas donde el fungicida no se ha utilizado, principalmente por la dispersión de las conidias. Esta situación es especialmente clara en el caso de *B. cinerea*, que no presenta especificidad en cuanto a hospedero.

4.4 Relación entre producción de esclerocios y resistencia a benomilo.

Los esclerocios considerados como la principal estructura de sobrevivencia invernal de esta especie, fueron cuantificados al día 20, cuando estos obtuvieron la madurez, es decir cuando alcanzan una coloración oscura (TORTORA, 1993 citando a Backhouse y Willets, 1984).

En la Figura 6 donde se representa gráficamente la producción de esclerocios por parte de las 13 cepas en estudio, se puede apreciar que la mayoría de los aislamientos presenta un alto número de esclerocios, indistintamente que sea sensible o resistente; excepto cuatro cepas que se encuentran bajo los 40 esclerocios, dentro de las cuales también existen cepas sensibles y resistentes a benomilo.

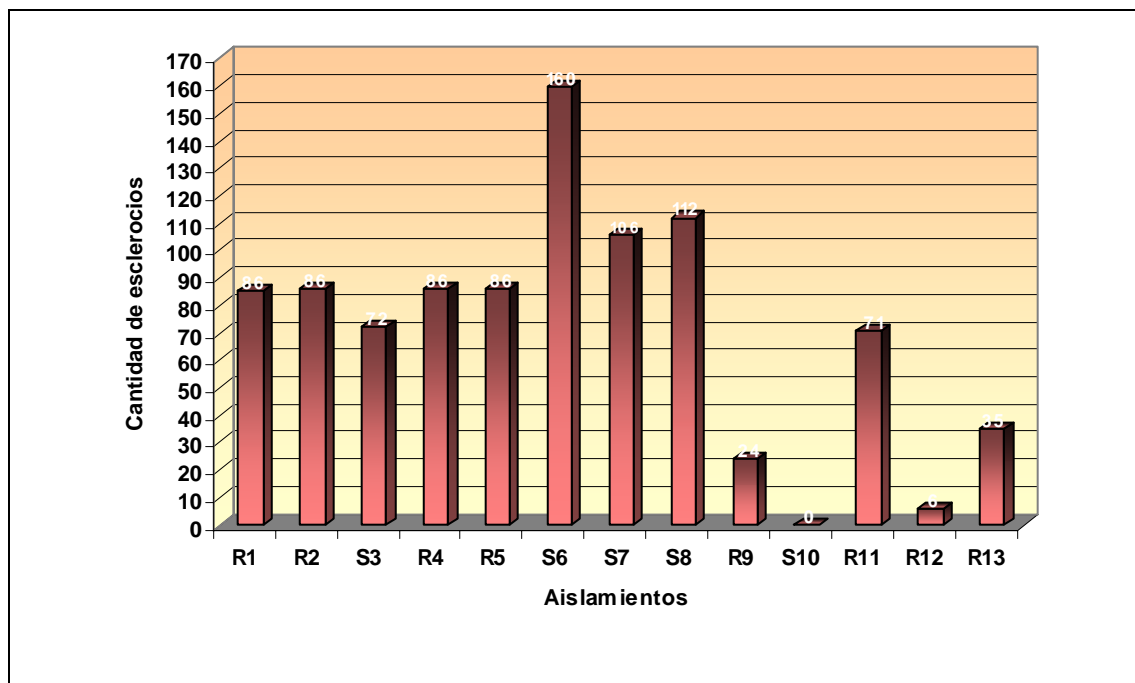


FIGURA 6 Cantidad de esclerocios producidos a los 20 días, por 13 aislamientos de *Botrytis cinerea*.

Además, en la Figura 6, se observa la nula producción de estas estructuras de resistencia, por parte del aislamiento 10, el cual presenta además otras singulares características que lo diferencian de los demás aislamientos, como lo son el color, el bajo nivel de esporulación presentado y el bajo crecimiento diario. Esta es una cepa sensible a benomilo.

En el Cuadro 9 se presenta el número de esclerocios promedio por cada aislamiento.

CUADRO 9 Número de esclerocios promedio para 13 aislamientos de *B. cinerea* resistentes y sensibles a benomilo, contabilizados a los 20 días de cultivo.

Aislamientos	Nº de esclerocios promedio	Grupos *
S6	160,0	a
S8	112,0	a b
S7	106,0	a b
R5	86,3	a b
R2	86,0	a b
R4	86,0	a b
R1	85,5	a b
S3	72,3	a b
R11	71,0	a b
R13	35,0	a b
R9	24,0	a b
R12	5,8	b
S10	0,0	b

*: Letras distintas en la columna indican diferencias significativas al 95% de confianza (p -valor<0,05) DUNN.

Es evidente en su análisis, que la mayoría de los aislamientos presentan una gran cantidad de estas estructuras, por lo tanto su formación es independiente de la sensibilidad y resistencia a benomilo; ya que las formas sensibles fueron las que presentaron un mayor número de esclerocios, pero también fueron las que presentaron un menor número de ellos. Las cepas con

mayor diferenciación, en la producción de esclerocios, fueron las cepas S6 y S10.

Similar a lo expuesto en este estudio, GOMEZ (1984), no encontró diferencia alguna entre la cepa sensible y las resistentes a benomilo, en lo que se refiere a la producción de esclerocios. Por lo tanto, cepas resistentes tienen igual capacidad que cepas sensibles de permanecer presentes, en épocas invernales o en períodos adversos, de allí la importancia de conocer los niveles de resistencia de las áreas donde ha existido exposición del patógeno a benomilo, para poder manejar a *Botrytis*.

La Figura 7, ilustra la diferencia en producción de esclerocios entre el aislamiento S6, con un promedio de 160 esclerocios y para el aislamiento S10, el que presentó nula formación de estos.



FIGURA 7 Formación de esclerocios en dos aislamientos sensibles a benomilo de *Botrytis cinerea*, A la izquierda la cepa S6 con una abundante producción de esclerocios y a la derecha la S10 con nula producción.

Con respecto a esta situación, donde la cepa S10, no formó esclerocios, MOLINA (1994) en su estudio de 114 cepas, 10 de ellas, no formaron esclerocios, proporción similar a la presentada en el presente trabajo. Esta autora cita a Agrios, 1988 y Ellis, 1971, para indicar que la producción, tamaño, y forma de los esclerocios en un sustrato natural y en medio de cultivo es extremadamente variable y que en cultivo algunos aislamientos del hongo no forman esclerocios y en cambio otros son abundantes. Como explicación a este fenómeno TORTORA (1993) cita a Paul (1929) el cual hizo una clasificación de las razas morfológicas de *Botrytis*, indica que la raza esclerotial forma una gran cantidad de esclerocios, sin embargo, las otras dos razas, la micelial y esporuladora, no necesariamente desarrollan estas estructuras, de esta forma es posible encontrar en los aislamientos ausencia de esclerocios. De igual manera, SILVA (1992), encontró aislamientos que desarrollaron en una semana numerosos esclerocios, en tanto otros no lo formaron durante el mismo período de tiempo y en la tasa de crecimiento se encontró diferencias de hasta casi nueve veces entre algunas cepas.

En lo que se refiere al rango promedio de esclerocios por cepa de este estudio, este va desde 160 a 5,8 donde sólo cuatro aislamientos están por debajo de los 70 esclerocios promedio; lo cual supera a lo expuesto por GÓMEZ (1984), el cual observó en sus aislamientos que la mayor parte de ellos presentaron producciones inferiores a 50 esclerocios/placa. Esto podría deberse a que el autor antes mencionado mantuvo sus aislamientos en condiciones de estufa de crecimiento a una temperatura constante, condición óptima para el desarrollo del hongo. Los esclerocios son estructura de resistencias formadas por el hongo, determinantes en su habilidad para sobrevivir a condiciones adversas (LOORBER, 1980); razón que explicaría que en el presente estudio se obtuviera una mayor producción de estas estructuras, al permanecer bajo condiciones ambientales menos estables y por ello probablemente más adversas para el hongo.

Con respecto a la formación de esclerocios, Paul (1929) citado por LORBEER (1980), señala que aunque el autor reconoce tres formas de *Botrytis* en cultivo, encontró que la mayor formación esclerotial en cultivo ocurre cuando la temperatura fue reducida a 12°C y cuando los cultivos fueron incubados en oscuridad o en alta humedad. Coincidiendo con TORTORA (1993) la cual menciona varios autores para apoyar la hipótesis de que la temperatura favorece la producción de micelio en *B. cinerea* y generalmente deprime la formación de esclerocios y vice-versa, donde el rango óptimo de temperatura obtenido para la producción de esclerocios es de 11 a 30 ° C y para la esporulación es de 12 a 22°C .

En resumen, no existiría un comportamiento definido en la producción de estructuras de resistencia, según sea el aislamiento sensible o resistentes a benomilo, presentándose en ambas condiciones una producción abundante de estas estructuras.

4.5 Relación entre color del micelio y resistencia a benomilo.

El objetivo de esta parte del estudio, fue encontrar diferencias entre los aislamientos resistentes y sensibles, en cuanto a la coloración del micelio. Con ayuda de la carta Munsell®, se pudo establecer el color de cada aislamiento, utilizando de preferencia los colores grises, característico de este hongo, por lo cual es llamado comúnmente “moho gris”, esto permitió categorizar cada aislamiento de una manera mas objetiva.

Todos los aislamientos presentaban colores en la escala de los grises, aunque la coloración presentada por los aislamientos, no siempre era una sola tonalidad por colonia, ya que en muchas ocasiones variaba según el crecimiento del micelio, algunas en forma de espiral, presentaba dos coloraciones, otras en que el tipo de crecimiento miceliar era en forma de cojinetes, los cuales generalmente eran un tono mas oscuro que la otras zonas

de la colonia. El criterio utilizado fue observar la coloración en mayor proporción presente en la placa.

En la Figura 8, se puede visualizar las diferentes tonalidades que presentaron las cepas estudiadas:



FIGURA 8 Diferentes tonos de gris presentes en los aislamientos de *Botrytis cinerea*, (1) gris claro, cepa S10 (2) gris verdoso claro, cepa R2 y (3) gris verdoso, cepa S7.

En el Cuadro 10 se señalan la coloración y clave para cada color, presentada por cada aislamiento, según la carta Munsell. Como se puede observar la coloración es completamente independiente de la resistencia o sensibilidad de los aislamientos.

La coloración común fue el gris verdoso, presentado por la mayoría de los aislamientos, estas tonalidades se van empardeciendo a medida que el cultivo va envejeciendo. Según lo expuesto en el Cuadro 10, no existe diferencia alguna entre los aislamientos sensibles y resistentes a benomilo en relación a esta característica.

CUADRO 10 Color del micelio de las cepas resistentes y sensibles a benomilo, de *Botrytis cinerea*.

Aislamientos	Color	Clave
R1	gris verdoso	6/10Y
R2	gris verdoso claro	7/10Y
S3	gris verdoso claro	7/10Y
R4	gris verdoso	6/10Y
R5	gris verdoso	6/10Y
S6	gris verdoso	6/10Y
S7	gris verdoso	6/10Y
S8	gris verdoso	6/10Y
R9	gris verdoso	6/10Y
S10	gris claro	7/2
R11	gris verdoso	6/10Y
R12	gris verdoso	6/10Y
R13	gris verdoso	6/10Y

Sólo una de las cepas fue gris claro (S10), además fue la única cepa que no formó esclerocios, esto coincide con TORTORA (1993), la cual, en cepas de la localidad de Cayumapu, obtuvo aislamientos con micelio blanquecino, semejante a la cepa antes mencionada, pero éstas no esporularon *in vitro*; en este caso el aislamiento mencionado, logró esporular, llegando a un 50% a los 21 días, pero no formó esclerocios. Salinas y Schot (1987) citados por TORTORA (1993), también encontraron un aislamiento de similares características que incluso tampoco formó esclerocios.

La proporción de cepas blanquecinas observada en este trabajo fue de 7,7% similar a lo expuesto por MOLINA (1994), la cual indica que un 8,7% de la población estudiada en su investigación, presenta un micelio del grupo de los colores blancos, cuya característica principal es no haber esporulado. Concluyendo que todas las cepas con una coloración gris, presenta una óptima capacidad de producir esclerocios; sin embargo, en aquellas cepas blancas esta capacidad estaba ausente.

A diferencia del presente estudio donde se establecieron tres tonalidades de grises, SILVA (1992) hizo seis categorizaciones del color del micelio partiendo por el blanco crema, crema, gris crema, gris, gris muy oscuro y pardo muy oscuro. Donde los más comunes eran gris crema y el color crema. La autora consideró la observación de 31 aislamientos, por lo tanto la variación visible de colores es mucho mayor, a comparación del presente estudio que sólo consideró 13 cepas. Además SILVA (1992), no contempló una tabla de color para guiarse en sus observaciones, lo cual puede haber llevado a una categorización poco objetiva.

Por lo tanto, de esta sección se puede deducir que la coloración de las cepas de *B. cinerea*, no tiene relación alguna con el nivel de resistencia o sensibilidad a benomilo, presentando ambas en su mayoría un color gris verdoso; además la existencia de cepas con un color mas blanquecino que el resto, las cuales no tienen la capacidad de formar esclerocios en cultivos *in vitro*.

4.6 Relación entre virulencia y resistencia a benomilo.

El método para esta prueba fue el utilizado por TORTORA (1993), el objetivo de esta prueba era obtener una idea de la patogenicidad de los distintos aislamientos. A través de un trozo de manzana que va a evidenciar, con el pasar de las horas, la maceración debido a la acción del complejo enzimático provocado por el hongo, lo que conduciría a una liberación del contenido de las vacuolas a nivel celular y por lo tanto esto provocaría una mayor conductividad eléctrica. Obviamente mientras mayor sea la resistencia, menor es la maceración y menos patogénico es el aislamiento.

Se obtuvo una gran variabilidad, incluso entre repeticiones del mismo aislamiento, esto puede ser corroborado en el Anexo 10, donde se presenta las resistencias eléctricas de las 13 cepas.

En el Cuadro 11 se presentan los promedios de las resistencias eléctricas de las muestras. Como se observa, no existe relación alguna entre la conductividad eléctrica y la sensibilidad o resistencia a benomilo, constatado por el hecho que en los aislamientos con mayor resistencia eléctrica existen indistintamente cepas resistentes y sensibles; lo mismo sucede en los aislamientos con menor resistencia eléctrica. Según los resultados obtenidos en esta prueba, las cepas más patogénicas serían la R1, S8, R11, R2, S10, R9 y S7, debido a los bajos niveles de resistencia a la conductividad eléctrica presentados.

CUADRO 11 Resistencia eléctrica (k Ω) de aislamientos de *Botrytis cinerea* resistentes (R) y sensibles (S) a benomilo y del testigo de la prueba.

Aislamientos	Resistencia eléctrica promedio (k Ω)	Grupos*
S6	72,8 ⁽¹⁾	a
R12	56,7	a b
R5	53,2	a b
R13	37,1	b c
R4	35,7	b c
Testigo	31,1	c
S3	31,0	c
S7	22,6	c d
R9	20,7	c d
S10	19,0	c d
R2	18,9	c d
R11	15,4	c d
S8	15,1	c d
R1	8,3	d

*: Letras distintas en la columna indican diferencias significativas al 95% de confianza (p-valor \leq 0,05) DUNCAN.

(1) Cada cifra es el promedio de 3 observaciones

Lo que resulta mas extraño es que el testigo presenta una resistencia menor que tres aislamientos, ya que debería haber sido el de más alta resistencia, debido a la ausencia del patógeno donde a simple vista se

manifestaba una oxidación del trozo de manzana, sin la presencia de los signos característicos de *B. cinerea*, hecho comprobado con la posterior realización de los postulados de Koch. Esto indicaría que no es una prueba altamente confiable o que hubo contaminación.

Según TORTORA (1993), al no ser afectado el tejido vegetal por las enzimas, la resistencia eléctrica es mayor debido a que no hay un medio líquido con electrolitos suficientes para que se produzca una mayor conductividad eléctrica.

En efecto, el testigo utilizado por TORTORA (1993), obtuvo una mayor resistencia al paso de la electricidad, pero estadísticamente sin diferenciación con algunas cepas de las localidades de Ancud y Panguipulli. Sin embargo, las cepas de estas dos localidades son a su vez, estadísticamente igual que el resto de las cepas de las localidades estudiadas, con excepción de las cepas de la localidad de Pichoy; lo que indicaría que no existe mayor diferencia, estadísticamente hablando, entre el trozo de manzana testigo (sin inocular) y los demás con presencia del hongo. De igual forma, en el presente estudio existen aislamientos que presentan una resistencia estadísticamente igual al testigo. Sobre el testigo existen 5 aislamientos, los cuales en el trozo de manzana presentan el micelio característico de *Botrytis*; esto podría indicar que el complejo enzimático de estos aislamientos difieran del resto de las cepas y el método de invasión sea distinto. Ante esta situación TORTORA (1993) indica que esto se debe a las distintas capacidades de las cepas en la producción de la enzima poligalacturonasa.

Dilenna *et al.*,(1980) citados por TORTORA (1993), establecieron que el aislamiento de *B. cinerea* más virulento produjo más poligalacturonasa extracelular que los otros. Por lo tanto, el análisis de las enzimas que participan

en el proceso de infección es un ítem más interesante y un buen indicador de patogenicidad.

En un estudio realizado por REBORDINOS *et al.*, (2000), se expone una caracterización de cepas de *B. cinerea* mediante técnicas de biología molecular, permitiendo relacionar estas características con los niveles de patogenicidad del hongo, los resultados evidencian que cepas que mostraban una morfología del tipo conidial, resultaron ser las menos agresivas, mientras que las que producían esclerocios eran las que formaban manchas necróticas de mayor tamaño sobre las hojas.

Aunque el método difiere al probado en este trabajo, no es posible relacionar el mayor número de esclerocios con una mayor patogenicidad, por el hecho de que el aislamiento S6 es el que mayor número de esclerocios presentó en este estudio, y a la vez el de mayor resistencia eléctrica. Por otro lado, REBORDINOS *et al.*, (2000), mencionan que las cepas más agresivas presentaban conidios de mayor tamaño que las restantes y las menos infectiva contenía los conidios de menor tamaño, además comprobaron que las cepas que contenían un menor número de núcleos en sus conidios eran las con menor capacidad infectiva, resultando ser que las más infectivas presentaban un mayor número de núcleos al interior de sus conidios. A pesar de estas observaciones, REBORDINOS *et al.*, (2000) concluyeron que *B. cinerea* muestra un alto grado de diversidad que la convierte en una especie en la cual es difícil establecer relaciones entre patogenicidad y otras características, a menos que un alto número de cepas sean estudiadas. Por lo tanto, independiente de la sensibilidad o resistencia a un fungicida, existen otros factores que pueden llevar a la variación en cuanto a la patogenicidad de este hongo.

En consecuencia, se concluye de manera general y para las cepas analizadas en este estudio, que la virulencia evaluada por el presente método, no muestra diferencias entre cepas sensibles y resistentes a benomilo. Sin embargo, sería importante medir este aspecto a través de otro método donde se pudiera evaluar el complejo enzimático utilizado por cada cepa, de esta manera aclarar situaciones como lo sucedido en este estudio donde existen cepas que escapan al común de la muestra.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y bajo las condiciones en que se realizaron los experimentos se puede concluir lo siguiente:

El crecimiento micelial medido entre aislamientos sensibles y resistentes, no arrojó diferencias entre ellos.

La rapidez de esporulación, es independiente del nivel de resistencia a benomilo.

En cuanto a los niveles de esporulación, considerando las cepas individualmente no hay diferencias entre resistentes y sensibles. Al evaluar en conjunto los aislamientos resistentes y sensibles, estos últimos presentan menores promedios acumulados de esporulación, a los 21 días de cultivo.

Las cepas sensibles y resistentes a benomilo, no presentan diferencias en cuanto a la producción de esclerocios.

La coloración característica entre los aislamiento fue el gris verdoso. Esta variable es independiente de los niveles de sensibilidad a benomilo.

El análisis de la resistencia eléctrica de las cepas fue independiente de la condición de resistencia del aislamientos.

La metodología utilizada en la presente tesis, basada en la caracterización morfológica y patogénica de las cepas, no es la adecuada para poder diferenciar a las cepas resistentes de sensibles,

Se rechaza la hipótesis de esta investigación ya que no existieron diferencias significativas entre aislamientos de *B. cinerea* sensibles y resistentes entre sus características morfológicas y patogénicas.

6 RESUMEN

Botrytis cinerea Pers ex Fries, es un hongo con un alto potencial de resistencia, debido a sus características genéticas, fisiológicas, y polifagia. El arándano (*Vaccinium corymbosum* L. y *Vaccinium ashei* Reade) no escapa a los daños provocados por este patógeno, siendo necesario recurrir a la aplicación de fungicidas para su control, entre los cuales benomilo ha sido ampliamente utilizado. Este producto ha provocado la manifestación de razas resistentes que perduran en un área, incluso sin la presión del fungicida.

En el presente estudio se evaluaron las diferencias morfológicas y patogénicas de aislamientos resistentes y susceptibles a la dosis crítica de 5 µg i.a de benomilo. Para esto se utilizaron 13 aislamientos de *Botrytis cinerea*, provenientes de varios huertos, de distintas regiones de Chile. Estos aislamientos fueron incubados sobre placas Petri, con un medio de agar papa dextrosa. Los parámetros considerados fueron crecimiento micelial, esporulación, producción de esclerocios, coloración del micelio y virulencia.

Los resultados indicaron que los aislamientos resistentes presentan igual capacidad en las características biológicas estudiadas, en cultivos *in vitro* que los aislamientos sensibles, ya que no existieron diferencias entre ambos tipos de aislamientos.

SUMMARY

Botrytis cinerea Pers ex Fries is a fungus with high resistance potential, due to its genetic and physiological characteristics, and high polyphagia. Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. y *Vaccinium ashei* Reade) does not escape to the damages produced by this pathogen, being necessary the application of fungicides to its control, within which benomyl has been widely used. The continuous use of this fungicide has caused the manifestation of resistant strains, that remain in an area, even without the pressure of the fungicide.

In the present study, the morphological and pathogenic differences were evaluated, considering resistant and sensitive isolates to the critical dose of 5 µg a.i of benomyl. To do the research, 13 types of *B. cinerea* from several sources of different regions of Chile, were used. These isolates were incubated on potato dextrose agar (PDA) on petri dishes. The parameters considered were: mycelial growth, sporulation, production of sclerotia, mycelial coloring and virulence.

Results indicated that the resistant isolates presented equal capacity of biological characteristics during in cultivation *in vitro*, than the sensitive ones. There were no differences between the two kinds of isolates, in relation to the evaluated characteristics.

7 BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G. 1997. Plant pathology. 4^a ed. New York. Academic Press. 635 p.
- ALVAREZ, M. 1991. Resistencia cruzada negativa entre los fungicidas benomilo y dietofencarb en aislamientos de *Botrytis cinerea* de vides. Agricultura Técnica (Chile). 51: 171-176.
- ALVAREZ, C. 1996. Utilización de la técnica de germinación conidial para determinar el grado de resistencia de distintas cepas de *Botrytis cinerea*, a tres grupos de fungicidas (benzimidazoles, dicarboximidas y dicluofluanidos). Tesis Ing. Agr. Quillota. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 98 p.
- AUGER, J. 1991. Estrategias de manejo de la resistencia a fungicidas benzimidazoles y dicarboximidas en frutales. In: Avances en el control de plagas y enfermedades. Publicaciones Misceláneas Agrícolas nº 37. Santiago de Chile. pp. 67-73.
- AUGER, J y ESTERIO, M. 1997. Botrytis en vides de Chile: Epidemiología y resistencia a fungicidas. In: Botrytis: nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa. Santiago (Chile). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. pp: 3-9.
- BENITO, E., ARRANZ, M. y ESLAVA, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. (On line). Universidad de Salamanca. Revista Iberoamericana de Micología (España). 17: S43-S46.
<<http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S43S46.pdf>> (21. jun. 2003).

- BENSCH, E. y GUERRERO, J. 2001. Eficacia de benomilo+captan y BC1000 en el control de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* en arándano alto (*Vaccinium corymbosum*) cv. Bluejay. AgroSur (Chile). 29 : 12-19.
- BUZETA, A. 1997. Chile: Berries para el 2000. Santiago. Fundación Chile, Departamento Agroindustrial. 135p.
- CARREÑO, I. y ALVAREZ, M. 1989. Razas resistentes de *Botrytis cinerea* a fungicidas dicarboximidas. Aconex.(Chile). 26: 17-20.
- CARRILLO, R. 1992. Características de los principales grupos de fungicidas. In: Curso de uso y manejo de plaguicidas. Valdivia. Univ. Austral de Chile. pp: 122-163.
- CHILE, INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO INDAP, 2005. Berries. (On line).
<<http://serinfo.indap.cl/Doc/DOCUMENTO%20rubro%20berries.doc>>.
(5. sept. 2005).
- CIAMPI, L. 2002. Introducción a la Patología Vegetal. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. Nuova Firenze. 232p.
- CIAMPI, L., GONZALEZ, S. y SCHNETTELER, E. 1993. Enfermedades de arbustos en frutales menores. In: Cultivos no tradicionales Barriga, P. y Neira, M. (eds).. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Serie Avances en Producción y Sanidad Vegetal. pp: 39-62.

COLEY-SMITH, J. 1980. Sclerotia and other structures in survival. In: Coley-Smith, J. R.; Verhoeff, K. y Jarvis, W. R. (eds). The biology of *Botrytis cinerea*. London. Academic Press. pp: 85-114

DELP, C.1988. Fungicide resistance. Washington APS press slide collections. USA.

DIARIO PYME. 2004. Exportación rinde sus frutos. (On line)
<<http://www.diariopyme.cl/newtenberg/1667/article-63295.html>>
(22. jul. 2005).

ESPEJO, R. 1995. Efecto del curado en la maduración y pudrición por *Botrytis cinerea* Pers en kiwi. Control con iprodione y determinación de resistencia a benzimidazoles y dicarboximidas. Tesis Ing. Agr. Valdivia. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 139p.

ESTERIO, M.; AUGER, J. y DROGUETT, A. 2003. Producción de uva orgánica: control integrado de *Botrytis cinerea* Pers. en vides de uva de mesa y vinífera (*Vitis vinifera* L.) en Chile. (On line) In: Objetivos y estado de avance de Proyectos de Investigación.
<http://www.uchile.cl/facultadescs_agronomicas/sanidadvegetal/proyectosinvestigaciona1.htm>. (10. mar. 2005).

GOMEZ, M. 1984. Caracterización y estudio del sinergismo entre razas resistentes y susceptibles de *Botrytis cinerea* a benomyl.. Tesis Ing. Agr. Santiago. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 82p.

- GUERRERO, J. 1988. Enfermedades del arándano. In: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Carillanca El cultivo del arándano. Temuco, Chile. pp. 99-107.
- GUERRERO, J. 2000. Situación fitopatológica del arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.) en la IX y X Región. In: Resúmenes X congreso Nacional de Fitopatología. Valdivia – Chile. 18-20 oct. p: 21.
- JUTSUM, A; HEANEY, S; MERRIN, B y WEGE, P. 1998. Pesticide resistance: assessment of risk and the development and implementation of effective management strategies. *Pesticide Science (USA)*. 54: 435-446.
- LATORRE, B y RIOJA, M. 2002. Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. *Ciencia e Investigación Agraria*. (on line).
<<http://www.faif.puc.cl/postgrado/cienciaeinv/pdf/29-2/efectotemp.pdf>>
(10. mar. 2005).
- LEROUX, P; FRITZ, R; DEBIEU, D; ALBERTINI, C; LANEN, C; BACH, J; GRETT, M y CHAPELAND, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science (USA)*. 58: 876-888.
- LORBEER, J. 1980. Variation in Botrytis and Botryotina. In: Coley-Smith, J. R.; Verhoeff, K. y Jarvis, W. R. (eds). *The biology of Botrytis cinerea*. London. Academic Press. pp: 19-40.
- MARTINEZ, F; DUBOS, B y FERMAUD, M. 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology (USA)*. 95: 692-700.

- MILANCA, J. 2001. Estudio del desarrollo de *Botrytis cinerea*, en plantas de arándano cv. O'neal y Patriot, y su relación con algunos aspectos ambientales. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 96p.
- MOLINA, A. 1994. Presencia de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. endógena y exógena en frutos de frambueso (*Rubus idaeus* L.) recolectados en tres localidades de la X región. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 39p.
- MONTEALEGRE, J. y VASQUEZ, G. 1995. Resistencia a benzimidazoles, carboximidaz y dicarboximidaz en cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de peras. Fitopatología. (Chile). 31: 59-65.
- MORALES, E. 2005. Diseño experimental a través del análisis de varianza y modelo de regresión lineal. Valdivia, Chile. Ed. Consultora Carolina. 248p.
- PEREZ, J. 2004. Detección molecular del alelo de resistencia a benomilo en cepas de *Botrytis cinerea* Pers ex Fr., aisladas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 52 p.
- PROCHILE, 2005. Insospechadas Proyecciones del Arándano en Región de Coquimbo. (On line)
<http://www.prochile.cl/coquimbo/ver_noticia.php?IdNoticia=189>.
(5. sept. 2005).

- REBORDINOS, L; VALLEJO, I; SANTOS, M; COLLADO, I; CARBU, M y CANTORAL, J. 2000. Análisis genético y relación con patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Revista Iberoamericana de Micología (España). 17: 37-42.
- SILVA, J. 1992. Control biológico de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. en frambueso (*Rubus idaeus* L.) mediante bacterias antagonistas. Tesis Mag. en Cs. mención Protección Vegetal. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 178 p.
- SMITH, C. 1998. History of benzimidazole use and resistance. In: Fungicide Resistance in North America. St. Paul, Minnesota. USA. APS Press. The American Phytopathological Society. pp: 23-24.
- SUDZUKI, F. 1993. Frutales menores: Nuevas alternativas de cultivo. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 286 p.
- TORTORA, A. 1993. Prospección del hongo causante del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 139p.
- URRUTIA, G. 2000. Arándanos: un mercado en expansión. Agroeconómico (Chile). (on line). <<http://www.sitec.cl/pf/Nº21%20Arándano%20en%20expansión.doc>> (12. Oct. 2004).
- VIAL, C. 2005. Arándanos: un mercado en aumento. Revista Tattersall (Chile). (On line). <<http://www.tattersall.cl/revista/Rev188/arandanos.htm>> (18. Dic. 2005).

VIAL, C y ALLENDE, J. 2005. Análisis comercial y visión general del arándano en Chile. Santiago, Chile. Seminario de actualización técnico comercial de berries. (On line). < http://www.asoex.cl/index_actividades.html> (5. Sep. 2005).

YOURMAN, L; NEFFERS, S y DEAN, R. 2001. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* (USA). 91: 307-315.

ZAMORANO, M. 2005. Determinación del grado de resistencia en cepas de *Botrytis cinerea* Pers ex Fr. A iprodiona, benomilo y captan en arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. y *Vaccinium ashei* Reade). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 113pp.

8 ANEXOS

ANEXO 1 Principales características del medio de cultivo agar papa dextrosa (APD).

Agar papa dextrosa (Mikrobiologie) Merck.

Composición típica (g/L): Infusión de patata 4,0 (infusión de 200 g patata).
D´(+)-glucosa 20,0; agar agar 15,0.

Preparación: disolver 39 g en 1 litro de agua desmineralizada calentando en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor; tratar en la autoclave (15 minutos a 121 ° C). Ph: 5 - 6 ± 0,2 a 25 ° C.

ANEXO 2 Crecimiento micelial diario (mm) de cada aislamiento durante 3 días, en los diámetro polar (DP) y diámetro ecuatorial (DE) de la placa.

Nº de cepa	Repetición	Crecimiento diario micelial (mm)					
		día 1		día 2		día 3	
		D.P	D.E	D.P	D.E	D.P	D.E
1	1	15,94	15,74	22,67	22,74	15,67	15,47
	2	17,33	17,17	21,4	21,66	20,24	21,57
	3	16,15	15,41	21,62	22,39	25,87	25,43
	4	15,75	15,42	22,23	22,92	23,13	23,97
2	1	15,2	13,83	20,33	20,63	25,4	25,13
	2	13,91	13,48	20,47	18,52	22,92	23,58
	3	13,37	13,97	19,91	16,79	21,98	22,09
	4	12,97	13,11	18,71	18,65	24,22	23,83
3	1	16,48	18,11	25,47	26,75	16,65	16,06
	2	19,2	17,48	26,38	26,25	19,68	18,88
	3	4,26	2,76	4,4	4,47	4,02	4,04
	4	16,8	18,93	21,99	24,04	8,56	4
4	1	18,47	18,18	24,75	24,24	16,8	16,26
	2	18,09	18,2	25,71	25,69	24,41	28,18
	3	19,57	19,19	24,61	25,56	21,82	21,1
	4	17,57	16,26	24,1	23,83	22,47	22,4
5	1	19,47	19,24	25,01	26,03	20,58	19,81
	2	17,93	18,13	24,87	24,03	22,37	23,56
	3	19,78	19,2	25,32	25,5	23,04	23,26
	4	20,05	20,1	25,6	26,08	21,26	21,46
6	1	18,28	20,19	27,33	27,48	20,17	18,16
	2	20,24	19,93	22,94	24,24	26,07	26,1
	3	22,09	20,93	24,7	24,38	19,51	18,81
	4	19,95	20,46	25,13	25,76	21,88	19,62
7	1	20,34	18,44	28,14	28,04	25,46	24,5
	2	19,14	19,06	26,97	27,74	28,53	27,95
	3	19,98	20,29	26,76	25,96	23,44	23,99
	4	18,89	19,45	25,92	27,02	26,35	23,79
8	1	18,24	18,73	28,17	28,21	27,46	26,26
	2	17,52	17,19	23,58	23,61	10,98	11,08
	3	19,17	19,93	28,06	27,61	25,82	24,22
	4	17,53	18,15	28,53	28,37	24,92	25,7

Continuación ANEXO 2

Nº de cepa	Repetición	Crecimiento diario miceliar (mm)					
		día 1		día 2		día 3	
		D.P	D.E	D.P	D.E	D.P	D.E
9	1	18,86	18,89	24,26	24,15	20,75	22,15
	2	17,96	17,52	17,35	17,32	6,55	10,08
	3	17,48	16,89	20,67	21,37	15,93	15,3
	4	17,81	16,83	19,31	18,66	14,8	17,33
10	1	7,67	8,52	22,76	23,27	16,72	15,44
	2	10,36	12,24	20,69	20,53	16,51	16,27
	3	3,75	4,12	17,82	20,7	18,57	18,09
	4	2,63	2,8	19,6	20,88	20,61	20,25
11	1	16,04	16,11	22,55	22,83	19,2	18,65
	2	16,22	17,85	20,36	21,89	23,13	22,48
	3	17,21	17,57	22,45	21,37	22,01	23,53
	4	14,21	14,71	23,57	24,51	19,81	19,58
12	1	17,76	16,6	22,12	22,91	20,98	23,17
	2	17,8	17,82	24,59	23,88	22,4	23,14
	3	16,49	17,81	23,31	21,88	21,44	21,79
	4	17,08	18,15	25,03	24,21	23,97	24,11
13	1	12,44	11,31	25,02	23,78	20,44	21,28
	2	12,47	15,25	22,43	20,75	20,6	22,52
	3	10,75	13,56	23,96	23,72	22,34	23,81
	4	7,2	9,85	20,61	20,68	16,42	16,68

ANEXO 3 Crecimiento micelar mínimo, medio y máximo (mm), con la desviación estándar y covarianza de cada aislamiento.

Aislamiento	Mínimo	Media	Máximo	Desviación Estándar	Covarianza %
R1	18,04	19,91	21,15	1,35	6,8
R2	18,02	18,88	20,09	0,87	4,6
S3	3,99	15,24	21,31	7,86	51,6
R4	19,78	21,44	22,88	1,32	6,2
R5	21,69	22,15	22,68	0,48	2,2
S6	21,74	22,26	23,25	0,68	3,0
S7	23,40	24,01	24,90	0,68	2,8
S8	17,33	22,46	24,51	3,43	15,3
R9	14,45	17,84	21,51	2,89	16,2
S10	13,84	15,03	16,10	1,06	7,1
R11	19,23	19,91	20,69	0,71	3,6
R12	20,45	21,19	22,09	0,79	3,7
R13	15,24	18,24	19,69	2,03	11,1

ANEXO 4 Análisis de varianza para el crecimiento micelar diario (mm), para los aislamientos.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	P-valor
Aislamientos	281,048	12	234,207	8,04	0.0000**
Error	113,57	39	291,205		
Total Corregido	394,618	51			

** : altamente significativo al 99% de confianza (P-Valor <0,01)

ANEXO 5 Esporulación diaria (%) de 13 aislamientos de *Botrytis cinerea*, por 21 días de observación.

Nº de cepas	Repetición	Días																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	1	0	0	0	0	0	0	2	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	20	20	20	20
	2	0	0	0	0	0	5	5	10	10	10	15	25	25	25	30	30	30	40	40	40	40
	3	0	0	0	0	0	0	0	5	10	10	15	15	15	15	15	40	40	40	50	50	60
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	5	10	10	20	25	25	30	30	40	50	50
2	1	0	0	0	0	5	10	25	30	30	30	50	60	60	60	60	75	75	80	80	90	90
	2	0	0	0	0	5	10	15	40	50	50	50	70	70	70	75	75	80	80	90	90	95
	3	0	0	0	0	5	15	25	30	30	50	60	60	60	60	60	75	75	80	80	90	100
	4	0	0	0	0	5	5	10	20	25	25	40	50	50	50	60	60	75	75	80	80	95
3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	5	10	10	20	20
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	10	10	10	10
	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	5	5	5	10	10	15	15	15
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	15	15	25	25	50	50
4	1	0	0	0	0	5	10	15	25	30	50	60	60	75	75	75	80	80	90	90	95	100
	2	0	0	0	0	5	10	20	30	50	50	60	75	75	75	80	80	80	80	85	85	85
	3	0	0	0	0	5	10	20	50	50	60	60	75	70	75	75	75	80	80	80	85	85
	4	0	0	0	0	5	15	30	30	30	50	50	60	70	75	75	75	80	80	90	95	95
5	1	0	0	0	0	0	5	10	30	30	35	50	60	60	70	70	75	75	80	80	90	100
	2	0	0	0	0	0	0	5	10	10	25	40	40	40	50	60	75	75	80	80	95	100
	3	0	0	0	0	0	5	10	25	30	30	40	50	50	50	60	60	75	75	75	85	85
	4	0	0	0	0	0	0	5	10	15	15	20	20	40	40	50	75	75	75	80	80	90
6	1	0	0	0	5	10	15	30	50	50	60	60	60	65	65	65	65	75	75	75	80	80
	2	0	0	0	5	10	15	25	50	70	75	75	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	3	0	0	0	5	10	15	25	25	50	50	75	75	75	75	80	80	80	80	85	85	85
	4	0	0	0	5	10	25	50	50	60	60	75	75	75	75	75	75	80	80	80	85	85
7	1	0	0	0	0	0	0	3	3	5	5	5	10	10	10	15	15	20	20	25	25	40
	2	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	10	10	10	10	20	20	20	25	25	25	30
	3	0	0	0	0	0	0	2	2	10	10	20	20	25	40	40	50	50	70	70	75	75
	4	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	10	10	20	20	25	25	25	40	40	40	40
8	1	0	0	5	10	15	15	15	30	60	60	70	70	70	70	70	70	75	75	80	80	80
	2	0	0	5	10	20	30	55	55	60	60	80	80	80	80	80	80	80	85	85	85	85
	3	0	0	5	10	30	40	50	60	60	60	75	75	80	80	80	80	80	80	85	85	85
	4	0	0	5	10	25	30	50	50	50	55	75	75	75	75	75	75	80	80	80	80	80

Continuación del ANEXO 5

Nº de cepas	Repetición	Días																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
9	1	0	0	0	0	0	0	3	15	15	20	40	40	40	40	50	50	50	50	50	50	50
	2	0	0	0	0	0	0	2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	15	15	20
	3	0	0	0	0	0	0	5	20	30	30	30	30	30	30	40	40	40	40	40	40	40
	4	0	0	0	0	0	0	2	10	10	10	25	30	30	30	40	40	40	40	50	50	50
10	1	0	0	0	0	0	0	5	10	15	15	40	40	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	2	0	0	0	0	0	5	10	20	25	25	25	40	40	40	40	50	50	50	50	50	50
	3	0	0	0	0	0	0	0	5	7	10	25	25	25	25	30	30	30	40	40	50	50
	4	0	0	0	0	0	2	10	20	20	20	35	35	35	40	40	40	40	40	40	50	50
11	1	0	0	0	0	0	0	0	5	5	10	25	25	40	40	50	50	60	75	75	80	90
	2	0	0	0	0	2	10	10	25	35	35	40	50	50	60	60	75	75	80	80	95	95
	3	0	0	0	0	0	2	10	10	15	30	50	50	50	50	60	60	75	80	90	100	100
	4	0	0	0	0	0	5	15	25	25	25	30	40	40	50	50	60	60	75	80	85	85
12	1	0	0	0	0	0	0	2	2	2	5	10	15	15	20	20	40	60	75	75	75	75
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	10	15	15	15	15	30	50	60	60	60	60
	3	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	5	5	15	15	25	50	75	80	80	90	100
	4	0	0	0	0	0	0	3	10	10	10	15	15	20	30	30	40	50	60	60	60	60
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	20	25	25	40	40	40
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	10	10	25	25	30	30
	3	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7	7	10	10	25	25	30	30	40	50	50
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	10	10	20	20	20	20	25	25	40

ANEXO 6 Esporulaci3n m3nima, m3xima y media, con la desviaci3n est3andar y covarianza para los 13 aislamientos.

Aislamiento	M3nimo	Media	M3ximo	Desviaci3n estandar.	Covarianza (%)
R1	20,0	42,5	60,0	17,08	40,2
R2	90,0	95,0	100,0	4,08	4,3
S3	10,0	23,8	50,0	17,97	75,7
R4	85,0	91,3	100,0	7,50	8,2
R5	85,0	93,8	100,0	7,50	8,0
S6	80,0	82,5	85,0	2,89	3,5
S7	30,0	46,3	75,0	19,74	42,7
S8	80,0	82,5	85,0	2,89	3,5
R9	20,0	40,0	50,0	14,14	35,4
S10	50,0	50,0	50,0	0,00	0,0
R11	85,0	92,5	100,0	6,45	7,0
R12	60,0	73,8	100,0	18,87	25,6
R13	30,0	40,0	50,0	8,16	20,4

ANEXO 7 An3lisis de varianza para el nivel de esporulaci3n (%), presentado por los 13 aislamientos.

Fuente de variaci3n	SC	GL	CM	F	P-valor
Aislamientos	484,574	12	0,403812	13,72	0,000**
Error	114,756	39	0,029425		
Total Corregido	59,933	51			

** : altamente significativo al 99% de confianza (P-valor <0,01)

ANEXO 8 Prueba de t- student para el nivel de esporulación en aislamientos resistentes y sensibles a benomilo de *B. cinerea*.

Resistentes	Susceptibles	t-student	p-valor
1,07307	0,861367	2,25131	0,0287923

ANEXO 9 Producción de esclerocios mínima, media y máxima, con la desviación estándar y covarianza para cada aislamiento.

Aislamiento	Mínimo	Media	Máximo	Desviación estándar	Covarianza (%)
R1	38,0	85,5	128,0	43,37	50,7
R2	56,0	86,0	112	28,19	32,8
S3	25,0	72,3	160,0	62,06	85,9
R4	40,0	86,0	128,0	42,65	49,6
R5	52,0	86,3	108,0	27,11	31,4
S6	108,0	160,0	244,0	60,75	38,0
S7	76,0	106,0	148,0	31,75	30,0
S8	72,0	112,0	144,0	33,94	30,3
R9	8,0	24,0	36,0	11,69	48,7
S10	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0
R11	52,0	71,0	108,0	25,59	36,0
R12	0,0	5,8	16,0	7,59	132,0
R13	20,0	35,0	60,0	18,00	51,4

ANEXO 10 Resistencia eléctrica (kΩ), presentada por los 13 aislamientos.

Repetición	Aislamientos													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	T
1	7,4	23,1	32,6	19	74	75,4	29,9	8,4	29,1	20,5	7,5	53,5	36,9	33,3
2	5,3	17,2	29,2	72,3	33,8	71,9	18,3	19,6	12,9	23,7	20,7	72,5	34,6	33,6
3	12,2	16,5	31,2	15,9	51,9	71,2	19,5	17,4	20	12,7	18	44	39,8	26,4

ANEXO 11 Resistencia eléctrica mínima, media y máxima (kΩ), con la desviación estándar y covarianza para cada aislamiento y testigo de la prueba.

Aislamiento	Mínimo	Media	Máximo	Desviación estándar	Covarianza %
R1	5,3	8,3	12,2	3,54	42,6
R2	16,5	18,9	23,1	3,63	19,1
S3	29,2	31,0	32,6	1,71	5,5
R4	15,9	35,7	72,3	31,71	88,7
R5	33,8	53,2	74,0	20,13	37,8
S6	71,2	72,8	75,4	2,25	3,1
S7	18,3	22,6	29,9	6,38	28,3
S8	8,4	15,1	19,6	5,93	39,2
R9	12,9	20,7	29,1	8,12	39,3
S10	12,7	19,0	23,7	5,66	29,8
R11	7,5	15,4	20,7	6,97	45,3
R12	44,0	56,7	72,5	14,51	25,6
R13	34,6	37,1	39,8	2,61	7,0
T	26,4	31,1	33,6	4,07	13,1

ANEXO 12 Análisis de varianza de la resistencia eléctrica ($k\Omega$) para los aislamientos.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	P-valor
Aislamientos	13321,50	13	1024,73	7,55	0,000**
Error	3801,36	28	135,76		
Total Corregido	17122,90	41			

** : altamente significativo al 99% de confianza (P-Valor <0,01)