



# Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias  
Escuela de Agronomía

## **Caracterización morfológica y genética de aislados de *Botrytis cinerea* provenientes de huertos de arándanos de la zona sur de Chile**

**Memoria de Título** presentado como  
parte de los requisitos para optar al  
título de Ingeniero Agrónomo

**Sebastian Aniello Aguirre Araya**

Valdivia – Chile

2015

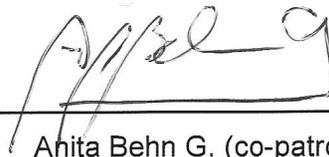
PROFESOR PATROCINANTE:



---

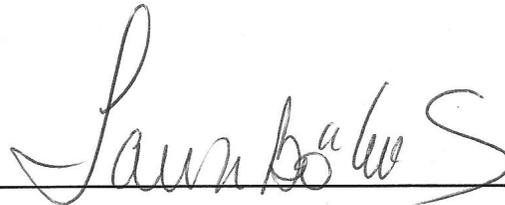
Erika Briceño P  
Ing. Agr., Dr. Cs. Agr.  
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

PROFESORES INFORMANTES:



---

Anita Behn G. (co-patrocinante)  
Ing. Agr., Dr. Ing. Agr.  
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal



---

Laura Böhm S  
Ingeniero Agrónomo  
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

## AGRADECIMIENTOS

En estas breves líneas, quiero agradecer a mis padres por su inconmensurable sabiduría y apoyo incondicional. A mis hermanos y amigos por estar siempre disponible cada vez que necesité de vuestra ayuda.

Sinceramente, Gracias.

Dans ces petites lignes, je veux remercier à mes parents par leur immesurable sagesse et appui inconditionnelle. À mes frères et amis pour être toujours disponible lorsque j'ai eu besoin de votre aide.

Sincèrement, Merci

Mit diesen kleinen Zeilen, möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre unermessliche Weisheit und bedingungslose Unterstützung bedanken. Ich bedanke mich auch bei meinen Brüdern und Freunden, da sie immer für mich verfügbar waren, als ich Hilfe brauchte.

Herzlichen Dank!

## ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	Cultivo del arándano	3
1.2	Importancia de <i>Botrytis cinerea</i> en arándanos	3
1.2.1	<i>Botrytis cinerea</i>	3
1.2.1.1	Moho gris	3
1.2.1.2	Rango de hospederos	4
1.2.2	Características morfológicas	4
1.2.3	Características genéticas	4
1.2.3.1	Transposones	4
1.2.3.2	<i>Boty</i> y <i>Flipper</i>	5
1.2.3.3	Genotipos	5
1.3	Estudios comparados	6
2	MATERIAL Y MÉTODOS	7
2.1	Lugar y fecha de realización del ensayo	7
2.2	Material biológico	7
2.3	Medios de cultivo	7
2.4	Obtención de cultivos monospóricos	7
2.5	Caracterización morfológica de los aislados	9
2.6	Caracterización genética de los aislados	9
2.7	Análisis entre las características morfológicas y genéticas	10
2.8	Secuenciación y análisis filogenético	10

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
3	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	11
3.1	Resultados de caracterización morfológica	11
3.1.1	Color de micelio	11
3.1.2	Nivel de esporulación	12
3.1.3	Tasa de crecimiento	12
3.1.4	Dimensión de conidias	13
3.1.5	Producción de esclerocios	14
3.2	Resultados de la caracterización genética	15
3.2.1	Genotipos presentes en la zona sur de Chile	15
3.2.2	Distribución geográfica de genotipos por procedencia del aislado	17
3.3	Análisis correlativo entre los factores y las variables morfológicas	19
3.3.1	Localidad del aislado y variables morfológicas	19
3.3.2	Cultivar de arándano y variables morfológicas	19
3.3.3	Genotipo del aislado y variables morfológicas	20
3.3.4	Color de micelio y variables morfológicas	21
3.3.5	Nivel de esporulación y variables morfológicas	22
3.3.6	Producción de conidias y variables morfológicas	22
3.3.7	Producción de esclerocios y variables morfológicas	23
3.4	Secuenciación y análisis filogenético	24
4	CONCLUSIONES	28
5	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
	ANEXOS	34

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Aislados monospóricos de <i>B. cinerea</i> utilizados en la caracterización	8
2	Nivel de esporulación según conformación de micelio y porcentaje de esporulación	9
3	Características morfológicas y genéticas de 39 aislados de <i>B. cinerea</i>	18
4	Aislados de <i>B. cinerea</i> con presencia del gen MS457	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Distribución de genotipos de <i>B. cinerea</i> según color de micelio y nivel de esporulación	11
2	Tasa de crecimiento de todos los aislados en diagrama de Tukey	12
3	Comparación de la tasa de crecimiento entre los aislados aplicando el test HSD de Tukey	13
4	Dimensión de conidias en diagrama de Tukey	14
5	Comparación de dimensión de conidias entre aislados aplicando el test HSD de Tukey sobre el largo de las conidias	14
6	Producción de esclerocios: tamaño y número promedio de esclerocios por placa Petri, en diagrama de Tukey.	15
7	Proporción de genotipos de los aislados de <i>B. cinerea</i> distribuidos en la zona sur de Chile	16
8	Distribución de genotipos de <i>B. cinerea</i> según localidad del aislado y cultivar de arándano	17
9	Relación entre la localidad del aislado y las variables morfológicas de <i>B. cinerea</i>	19
10	Relación entre el cultivar de arándano y las variables morfológicas de <i>B. cinerea</i>	20
11	Relación entre el genotipo del aislado y las variables morfológicas de <i>B. cinerea</i>	21
12	Relación entre el color de micelio del aislado y las variables morfológicas de <i>B. cinerea</i>	22

13	Relación entre el nivel de esporulación y las variables morfológicas de <i>B. cinerea</i>	22
14	Relación entre la producción de conidias y las variables morfológicas de <i>B. cinerea</i>	23
15	Relación entre la producción de esclerocios y las variables morfológicas de <i>B. cinerea</i>	23
16	<i>Cluster</i> filogenético elaborado con el método <i>Neighbor joining</i> basado en la secuenciación del gen MS457 en los aislados del Cuadro 4	25
17	<i>Cluster</i> filogenético elaborado con el método UPGMA basado en la secuenciación del gen MS457 en los aislados del Cuadro 4 y las accesiones JF421577–95.	26

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>		<b>Página</b>
1	Color de micelio de aislados de <i>B. cinerea</i> provenientes de distintas localidades de la zona sur de Chile	35
2	Protocolo de extracción de ADN de hongos	36
3	Protocolos de amplificación de transposones por PCR	37
4	Protocolo de amplificación del gen MS457 por PCR	39
5	Cromatografía en gel de agarosa para aislados de <i>Botrytis</i>	40

## RESUMEN

*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. ha cobrado extrema importancia en el cultivo del arándano, principal frutal de la zona sur de Chile, debido a la alta exigencia en los controles fitosanitarios de la fruta destinada a exportación y a la presencia de algunas poblaciones resistentes a fungicidas. Debido a la alta variabilidad observada en aislados de diferentes localidades, este estudio trata sobre la caracterización de poblaciones de *B. cinerea* provenientes de huertos de arándanos de la zona sur, con el objeto de establecer una relación entre las diferencias morfológicas observadas y su probable variabilidad genética. Para la caracterización morfológica se obtuvieron repiques monospóricos de cada aislado, a los cuales se les determinó el color del micelio, el nivel de esporulación, la tasa de crecimiento, la dimensión de conidias y la producción de esclerocios. La caracterización genética se realizó detectando mediante PCR la presencia o ausencia de los transposones *Boty* y *Flipper*, para determinar el genotipo al que pertenece cada aislado. Adicionalmente, se secuenciaron fragmentos que codifican para el gen MS457 con propósito de establecer la relación filogenética entre los aislados. La caracterización morfológica reveló que existen diferencias altamente significativas entre todos los aislados para la tasa de crecimiento y la dimensión de conidias. Además, existe correlación entre la tasa de crecimiento, la dimensión de conidias y la producción de esclerocios, con la procedencia de los aislados, la morfología presentada y el genotipo al que pertenecen. La caracterización genética reveló que en la población estudiada se presentan los cuatro genotipos descritos en la literatura, con predominancia de Vacuma. Además, el árbol filogenético reveló la presencia de poblaciones simpátricas en el mismo hospedero con predominancia de *B. cinerea* sobre *B. pseudocinerea*.

## SUMMARY

*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. is extremely important for blueberry, the first fruit culture in south zone of Chile, due to highest phytosanitary surveillance of fruits for export and the presence of some populations resistant to fungicide. Due to the highest variability observed on isolates from different locations, this work is about the characterization of *B. cinerea* population which comes from southern blueberry crops. The aim of this project is the characterization in order to establish a relationship between morphological differences observed and likely genetic variability of them. For morphological characterization, colonies of single spore from each isolated were studied according to the color of mycelia, sporulation level, growth rate, conidia size and sclerotia production. Genetic characterization was done by PCR detection of transposons *Boty* and *Flipper*, to determinate their genotype. In addition, coding fragments for the MS457 gene were sequenced in order to produce a phylogenetic tree. The morphological characterization revealed highly significant differences between all isolates for growth rate and conidia size. Besides differences were determined for growth rate, the conidia size and the capacity of sclerotia production, according to their origin of the isolates, morphology and genotype. The genetic studies revealed in the population the four genotypes, showing a predominance of Vacuma in the geographic region. The phylogenetic tree showed the presence of two sympatric populations on the same host, with predominance of *B. cinerea* over *B. pseudocinerea*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El arándano (*Vaccinium spp.*), es un arbusto frutal originario de Norteamérica, introducido a Chile a principio de la década del ochenta. Actualmente, Chile se ubica como el principal exportador del hemisferio sur, debido principalmente a la ventaja de producir en contra-estación cuando la oferta local de fruta fresca en los mercados norteamericanos, europeos y asiáticos es mínima. Tanto los volúmenes de exportación como la superficie del cultivo, han crecido de forma sostenida en los últimos años. Según el censo realizado por CIREN en el año 2012, existen 13.162 ha plantadas, distribuidas en un área de producción que se extiende desde la Región de Coquimbo hasta la Región de Los Lagos. Durante la temporada 2010-2011, se exportaron aproximadamente 85.000 t de fruta desde la zona sur de Chile. Esta zona comprende las regiones de La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos, sumando un total de 4.221 ha (24,3%) (ODEPA, 2014; Sanhueza, 2012).

La condición fitosanitaria que exigen los mercados internacionales es cada vez más exigente, lo que explica la práctica de aplicar productos químicos varias veces en la temporada, y que ha provocado la aparición de poblaciones resistentes a alguno de los productos aplicados, debido a un aumento de la presión de selección al eliminar a los individuos sensibles de la población (CHILEAN BLUEBERRY COMMITTEE, 2013; Sanhueza, 2012; Zamorano, 2005).

Uno de los agentes fitopatógenos más importantes en arándano es *Botrytis cinerea* Pers. Fr., cuyo telomorfo es *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, hongo del *phylum* Ascomycota perteneciente a la familia *Moniliaceae*, responsable del "moho gris" y célebre por su amplio rango de hospederos (Benito *et al.*, 2000; Ciampi *et al.*, 2006).

A medida que se desarrolla la estación de crecimiento, el hongo va atacando estructuras vegetativas y florales de los cultivos, afectando el rendimiento del cultivo. Una vez producida la infección, la enfermedad comienza con una pudrición blanda, dando paso a una pudrición acuosa con necrosis y atizonamiento, con abundante esporulación grisácea superficial. La capacidad del hongo para permanecer en

latencia por largo tiempo dificulta su detección en el campo, generando pérdidas en post-cosecha de 50 hasta 70% de frutos en los casos más devastadores (Auger, 2013; Ciampi *et al.*, 2006; CHILEAN BLUEBERRY COMMITTEE, 2012; GENOSCOPE, 2008; Williamson *et al.*, 2007; Grindle, 1979).

*B. cinerea* es un fitopatógeno cosmopolita que puede infectar un amplio rango de hospederos sin aparente especialización, parasitando a más de 200 especies vegetales, afectando cultivos hortícolas, frutales y ornamentales (Diolez *et al.*, 1995). Otros estudios lo han encontrado parasitando a especies forestales como pinos y eucaliptus (Muñoz y Campos, 2013).

Las características morfológicas de *B. cinerea* corresponden a hifas hialinas, tabicadas, con conidióforos de color café grisáceo, con ramificación alternada generalmente restringida a la región apical que terminan en una célula conidiogénica brotante que produce blastoconidios en forma simultánea sobre cortos dentrículos. Las conidias pueden ser elipsoidales, piriformes o en forma de cuña, ocasionalmente septadas, hialinas a levemente pigmentados de color café pálido y listas. Presenta esclerocios de color negro cuando están maduros (Benito *et al.*, 2000; Ciampi *et al.*, 2006).

Durante los años '90, en Champagne, Francia comenzaron a utilizar marcadores moleculares para determinar el modo de reproducción y la estructura de la población de *B. fuckeliana*. El estudio reveló que había gran variación genética intrapoblacional sin que hubiese recombinación genética entre las dos poblaciones simpátricas identificadas (Giraud *et al.*, 1999; Giraud *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999). Así, se consideró a *Botrytis* como un complejo de dos especies solamente reconocibles mediante análisis moleculares y distinguibles entre sí en base a la presencia o no de dos secuencias genéticas transponibles (Diolez *et al.*, 1994; Levis *et al.*, 1997).

Los transposones son los llamados genes móviles, que consisten en secuencias de ADN que pueden saltar de una sección a otra, dentro o fuera del cromosoma, sin una etapa de existencia independiente. Contienen un gen que codifica la enzima transposasa, responsable de catalizar el corte y posterior inserción en un nuevo sitio al azar. En eucariontes, fueron descubiertos en *Zea mays*, y son similares a los hallados en bacterias porque finalizan con repeticiones invertidas cortas y producen

repeticiones directas inmediatas al sitio en el que se insertan. También están los llamados “retrotransposones no virales” que son semejantes a los retrovirus, porque primero se copian en el ARN y luego, a través de una transcriptasa reversa, producen nuevamente ADN que puede insertarse en una nueva ubicación del ADN cromosómico. Se les consideran elementos fundamentales de la evolución del genoma de los eucariontes, ya que proveen de una vía importante para la generación de variabilidad en las especies y de resistencia a fármacos en las poblaciones (Brown, 2008; Curtis y Schnek, 2008; Devlin, 2004; Pierce, 2009).

*Botrytis* posee dos tipos de transposones, denominados *Boty* y *Flipper*. *Boty* es un retrotransposón del tipo *Long-Terminal-Repeat* (LTRs), similar al de los retrovirus, con un largo de 596 bp; posee un marco de lectura abierto con secuencias homólogas a la transcriptasa inversa y dominios ARNsA H de los genes *retroelement-pol*. Es posible encontrarla en las bases de datos de secuencias de nucleótidos bajo el número de accesión X81791 (Diolez et al., 1995). Mientras que *Flipper* es un transposón identificado en una región que codifica el gen para la nitrato reductasa, con características perfectas de repeticiones terminales invertidas (ITRs); tiene una secuencia de 1842 bp de largo, está escoltado por el dinucleótido TA, registrado bajo el número de accesión U74294 (Levis et al., 1997).

Según la presencia o ausencia de alguno de estos transposones, se pueden distinguir cuatro genotipos en *Botrytis*. El genotipo es *Boty* cuando posee sólo el transposón *Boty*. El genotipo *Flipper* sólo cuando posee *Flipper*. El genotipo *Transposa* cuando se presentan ambos transposones: *Boty* y *Flipper*; y finalmente, en ausencia de transposones, el genotipo corresponde a *Vacuma* (Diolez et al., 1994; Esterio et al., 2011b; Levis, et al., 1997).

Según Benito et al. (2000), es imprescindible profundizar en el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad del hongo y de los mecanismos de defensa de la planta. Debido a que no se han descrito genes de resistencia en las especies que infectan y que la diversidad fenotípica de los distintos aislamientos del hongo es enorme, las estrategias de control basadas en los genotipos resistentes son reducidas.

Estudios sobre poblaciones de *B. cinerea* con resistencia a diversos fungicidas, tales como las anilino pirimidinas, los benzimidazoles y dicarboximidinas, demostraron que

estas poblaciones poseían gran variabilidad genética. Además, desde los trabajos de Muñoz *et al.* (1999) a la fecha, se utilizan marcadores que revelan diferencias entre los aislados obtenidos de distintos hospederos. Por otra parte, se determinó que existe una asociación estrecha entre las poblaciones de *Botrytis* y sus hospederos (Roman, 2014; Kumari *et al.*, 2014; Esterio, 2013; Fekete *et al.*, 2012; Esterio *et al.*, 2011b; Muñoz *et al.*, 2002).

Esto ha motivado la realización de nuevos estudios sobre las poblaciones de *Botrytis cinerea* en Chile, centrados en determinar a cual de los diferentes grupos genéticos pertenecen los aislados recogidos de diferentes cultivos huéspedes del hongo (Muñoz *et al.*, 2002; Esterio *et al.*, 2011b; Roman, 2014; Thompson y Latorre, 1999).

En base a estos antecedentes, el presente trabajo plantea como hipótesis que existe variabilidad morfológica en las poblaciones de *B. cinerea*, presentes en huertos de arándanos de la zona sur de Chile, y que ésta se relaciona con una variabilidad genética.

Esta investigación, tiene por objetivo general determinar diferencias fenotípicas y genotípicas entre aislados de *B. cinerea* provenientes de arándanos de la zona sur. Por lo que los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar morfológicamente los aislados de *B. cinerea* en estudio
- Caracterizar genéticamente los aislados de *B. cinerea* en estudio
- Establecer una relación entre las características morfológicas y el origen de los aislados
- Establecer una relación entre la caracterización morfológica y genética

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Lugar y fecha de realización del ensayo

La investigación se realizó durante el segundo semestre del año 2014 en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

### 2.2 Material biológico

Se utilizaron 39 aislamientos de *B. cinerea*, obtenidos de frutos maduros de arándanos con presencia visible de “moho gris” y provenientes de huertos de la zona sur de Chile (Cuadro 1). Estos aislados forman parte del cepario del Laboratorio de Fitopatología de la Institución antes señalada.

### 2.3 Medios de cultivo

Para la obtención de cultivos monospóricos se utilizó agar agua. Para la multiplicación y ensayos posteriores, se utilizó agar papa dextrosa (APD) acidificado con ácido láctico al 2%.

### 2.4 Obtención de cultivos monospóricos

Cada uno de los 39 aislados de *Botrytis cinerea* se obtuvo a partir de la reactivación y repiques de los aislados conservados en el cepario, siguiendo los pasos de Sanhueza (2012). Se sembraron en placas Petri con APD acidificado y se incubaron a 20°C hasta alcanzar esporulación. Desde las placas esporuladas, se tomó parte de la masa de conidias, formulando una suspensión con agua destilada estéril que fue diluida en serie hasta lograr una concentración de  $10^{-6}$ , vertiendo 1 mL de la suspensión en tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada por cada dilución. Luego, con una micropipeta se sembraron 100  $\mu$ L de esta suspensión de conidios en placas con agar agua, se barrió con un rastrillo de vidrio y se incubaron a 20°C por 12 horas. Luego de monitorear el crecimiento de las colonias monospóricas, con un bisturí estéril se tomaron los fragmentos de agar con la colonia y se repicaron sobre una nueva placa, las que se incubaron a 20°C por 72 horas. Finalmente, cada cultivo monospórico se

procedió a caracterizar morfológica y molecularmente (Marques, 2013; Pérez, 2004; Sanhueza, 2012; SENASICA, 2012; Zamorano, 2005).

**CUADRO 1 Aislados monospóricos de *B. cinerea* utilizados en caracterización**

Aislado	Nombre	Cultivar de arándano	Región	Localidad	Origen Huerto
Bc01	ALEBERK	Berkeley	XIV	Pelchuquín	Alessandrini
Bc02	LAL2	Legacy	XIV	Río Bueno	La Aguada
Bc03	LTLEG	Legacy	XIV	La Unión	Las Tiacas
Bc04	LVC151	Legacy	IX	Panguipulli	Las Vertientes
Bc05	LAL5	Legacy	XIV	Río Bueno	La Aguada
Bc06	LTBRI	Brigitta	XIV	La Unión	Las Tiacas
Bc07	SJ1	-	IX	Gorbea	San Jose Farms
Bc08	NTEXP3M3	Aurora	XIV	Pelchuquín	-
Bc09	NKEYP2M1	Aurora	XIV	Pelchuquín	-
Bc10	NREXP2M1	Aurora	XIV	Pelchuquín	-
Bc11	L6	Legacy	IX	Gorbea	San Jose Farms
Bc12	LVC151	Legacy	IX	Panguipulli	Las Vertientes
Bc13	ALEEL	Elliot	XIV	Pelchuquín	Alessandrini
Bc14	ALEDLC	Duke	XIV	Pelchuquín	Alessandrini
Bc15	LAL3	Legacy	XIV	Río Bueno	La Aguada
Bc16	C19	-	IX	Gorbea	Cuartel 19
Bc17	NKIQF5M13	Elliot	XIV	Pelchuquín	-
Bc18	LALR2	Legacy	XIV	Río Bueno	La Aguada
Bc19	ALEEL	Elliot	XIV	Pelchuquín	Alessandrini
Bc20	ANLEG	Legacy	XIV	Paillaco	Aguas Negras
Bc21	CUME	Elliot	IX	Panguipulli	Cuncumen
Bc22	LALR1	Legacy	XIV	Río Bueno	La Aguada
Bc23	ALEL	Legacy	XIV	Pelchuquín	Alessandrini
Bc24	LAL1	Legacy	XIV	Río Bueno	La Aguada
Bc25	NKEKB4M1	Aurora	XIV	Pelchuquín	-
Bc26	PMLEG	Legacy	X	Puerto Montt	Puerto Montt
Bc27	LCORRL	Legacy	XIV	Futrono	Los Corrales
Bc28	NKIQF3M1	Elliot	XIV	Pelchuquín	-
Bc29	NKIQF4M1	Elliot	XIV	Pelchuquín	-
Bc30	B3	Brigitta	IX	Gorbea	San Jose Farms
Bc31	NKIQP1M25	Elliot	XIV	Pelchuquín	-
Bc32	LADRAP	Drape	XIV	Río Bueno	La Aguada
Bc33	LVCEL	Elliot	IX	Panguipulli	Las Vertientes
Bc34	PMD	Duke	X	Puerto Montt	Puerto Montt
Bc35	NKIQF2M24	Elliot	XIV	Pelchuquín	-
Bc36	LAL4	Legacy	XIV	Río Bueno	La Aguada
Bc37	NKEXP3M1	Aurora	XIV	Pelchuquín	-
Bc38	NKEXP3M1	Aurora	XIV	Pelchuquín	-
Bc39	L3	Legacy	IX	Gorbea	San Jose Farms

## 2.5 Caracterización morfológica de los aislados

La caracterización consistió en evaluar los siguientes parámetros para cada uno de los aislados: color de micelio, nivel de esporulación, tasa de crecimiento, dimensión de conidias y producción de esclerocios. Cada uno de los aislados, se sembró en placas con PDA con cuatro repeticiones, y se basó en la metodología descrita en el trabajo de Sanhueza (2012).

Para determinar el color de micelio se utilizó la tabla de colores Munsell® sobre colonias de 10 días de edad, observando las colonias por el haz y el envés sobre una superficie de color negro.

El nivel de esporulación se evaluó con una escala visual de cuatro niveles, siendo 1 el nivel de menor valor y 4 el de mayor valor. Se determinó con el porcentaje de esporulación de conidias y el tipo de conformación del micelio (Cuadro 2).

**CUADRO 2 Nivel de esporulación según conformación de micelio y porcentaje de esporulación**

<b>Esporulación %</b>	<b>Algodonoso</b>	<b>Volador</b>	<b>Rastrero</b>	<b>Delgado</b>
<b>0 – 25</b>	Nivel 2	Nivel 1	Nivel 1	Nivel 1
<b>25 – 50</b>	Nivel 3	Nivel 2	Nivel 2	Nivel 1
<b>50 – 75</b>	Nivel 3	Nivel 3	Nivel 3	Nivel 2
<b>75 – 100</b>	Nivel 4	Nivel 4	Nivel 3	Nivel 3

La tasa de crecimiento micelial se obtuvo con la pendiente de la ecuación de la recta, al medir el avance diario del micelio en la placa [ $\text{mm d}^{-1}$ ].

Para medir el tamaño de conidias [ $\mu\text{m}$ ] se utilizó un microscopio óptico con el software MICROMETRICS SE. Se midió el largo y el ancho de 20 conidias por aislamiento.

La producción de esclerocios se determinó a partir de 10 días de incubación a temperatura ambiente en oscuridad, se cuantificaron los esclerocios totales por aislados y su tamaño medio [mm].

## 2.6 Caracterización genética de los aislados

Se realizó extracción de ADN para cada uno de los 39 aislados siguiendo la metodología adaptada para hongos de Arismendi *et al.* (2010), cuyo protocolo se describe en el ANEXO 2.

Para determinar el genotipo, mediante PCR se detectó la presencia o ausencia de los transposones *Boty* y *Flipper*, utilizando dos protocolos distintos (ANEXOS 3 y 5). El primer protocolo consistió en correr los partidores Boty1 y Flipper1 en la misma PCR (Muñoz *et al.*, 2010; Fekete *et al.*, 2012; Giraud *et al.*, 1999; Levis *et al.*, 1997), mientras que el segundo protocolo, se basó en hacer correr las PCR por separado para cada pareja de partidore Boty2 y Flipper2 (Johnston *et al.* 2014).

## **2.7 Análisis entre las características morfológicas y genéticas**

Las características morfológicas y genotípicas fueron analizadas con el software estadístico R-CRAN con la librería “agricolae”. Se trataron como factores los caracteres cualitativos morfológicos (color y nivel de esporulación), la procedencia geográfica, el cultivar de arándanos y el genotipo del aislado. Los caracteres cuantitativos como tasa de crecimiento, dimensión de conidias y producción de esclerocios, se utilizaron como variables dependientes.

Inicialmente, para determinar las diferencias entre todos los aislados, se compararon las variables cuantitativas por separado con el test HSD de Tukey. Luego, con el propósito de determinar una relación entre los factores y las variables, con el test LSD de Fischer se compararon estadísticamente las medias de los aislados agrupados según morfología (tasa de crecimiento, tamaño de conidias, número y tamaño de esclerocios), agrupando las comparaciones por cada factor (localidad del aislamiento, cultivar de arándano, genotipo del aislado, color de micelio, nivel de esporulación, producción de conidias y producción de esclerocios).

## **2.8 Secuenciación y análisis filogenético**

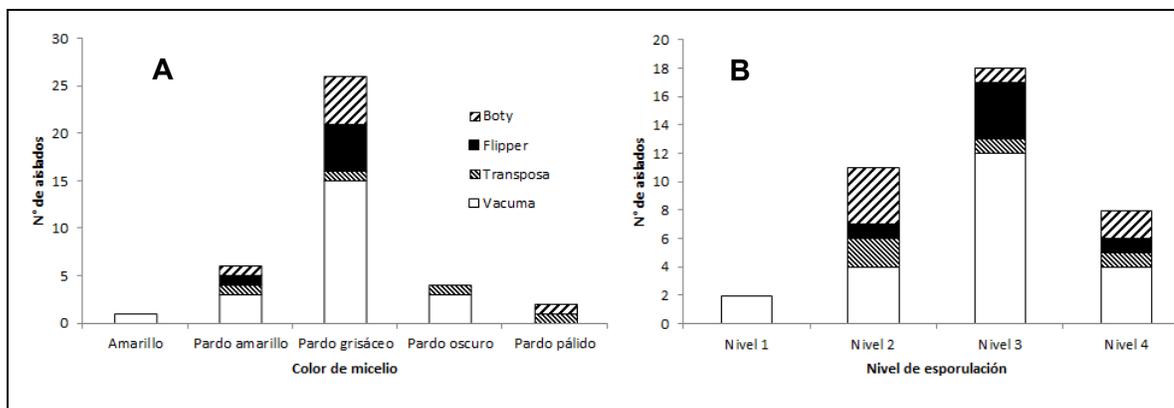
Para la elaboración de un árbol filogenético, se determinó la presencia del gen MS457 mediante PCR utilizando los partidores MS457L 5'-AAGGAGGACGTTGGAAGGAT-3' y MS457R 5'- AAGTCCAGAATCTCGATGTATTTGT-3' (ANEXOS 4 y 5). Luego, se enviaron 50 µl del producto PCR a secuenciar los fragmentos que codifican para el gen en los laboratorios MACROGEN Korea ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). Una vez obtenidas las secuencias, se alinearon y se compararon con aquellas existentes en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo de búsqueda MEGABLAST. Finalmente, se elaboraron *clusters* con el software MEGA6 (Johnston *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2011).

### 3. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1 Caracterización morfológica

Se encontró una gran variabilidad morfológica entre los 39 aislados estudiados, provenientes de la zona sur de Chile, lo que concuerda con los primeros estudios sobre diferencias fenotípicas entre aislados de *B. cinerea* naturales e inducidos (Grindle, 1979), y los últimos reportes en aislamientos chilenos de *B. cinerea* (Román, 2014),

**3.1.1 Color de micelio.** El color más abundante de los aislados es “pardo grisáceo” (10YR5/5) con 67%, seguido por “pardo amarillo” (10YR5/4) con 15% y “pardo oscuro” (10YR3/3) con 10%, mientras que los otros colores sólo reunieron 8% de los aislados (Figura 1A). Los resultados son similares a los de Sanhueza (2012), se encontraron cinco grupos (ANEXO 1) aunque con valores más claros debido a que en este trabajo se comparó el color con un fondo negro para anular el brillo.

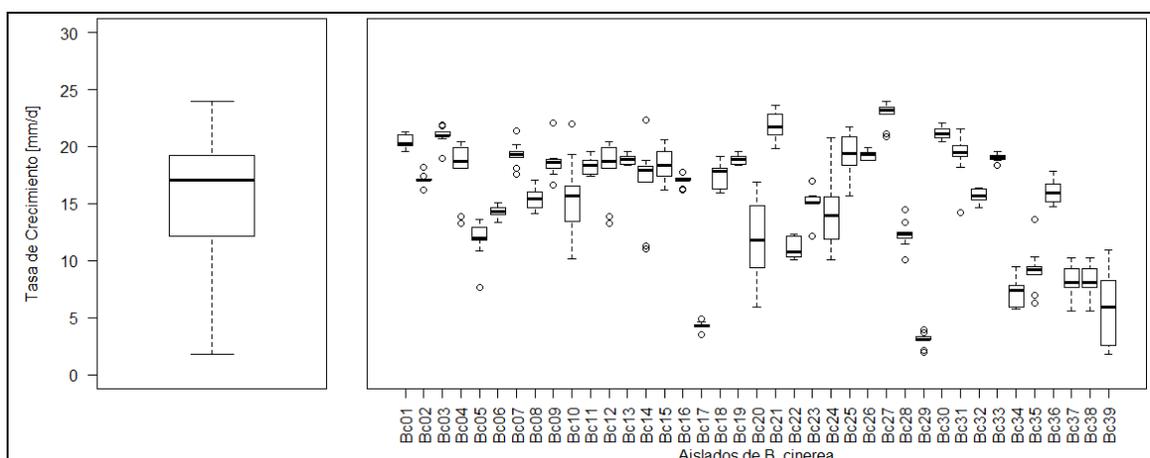


**FIGURA 1** Distribución de genotipos de *B. cinerea* según color de micelio (A) y nivel de esporulación (B)

Tanto el aspecto de la colonia como el color del micelio de los aislados son similares a lo reportado para aislamientos iraníes de flores (Khazaeli *et al.*, 2006), encontrándose los mismos colores de colonia (gris a pardo grisáceo), con micelios desde aéreo (volador) hasta algodonoso polvoriento o compacto.

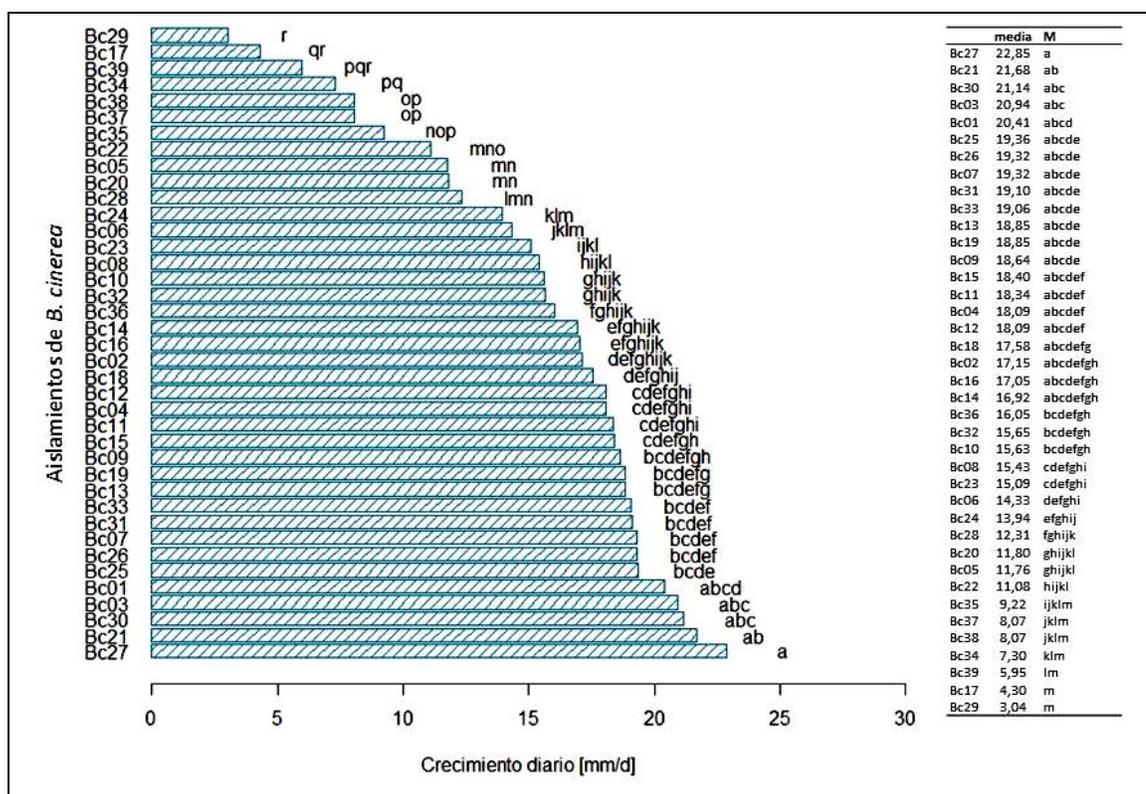
**3.1.2 Nivel de esporulación.** El 46% de los aislados presentó un nivel 3, es decir que se podían observar conidióforos bajo lupa y pigmentación en el micelio, luego el 28% en nivel 2, encontrando algunos conidióforos sólo en preparaciones microscópicas, sin observar cambios de pigmentación en el micelio. El nivel 4, placas con abundante esporulación, en el 21% de los aislados, mientras que el nivel 1, sin esporulación, se presentó sólo en el 5% de los aislados (Figura 1B).

**3.1.3 Tasa de crecimiento.** Los resultados en la Figura 2 revelan que la velocidad de crecimiento es muy variable entre los aislados, con un rango amplio que va desde los 3,1 mm hasta los 22,9 mm por día, mientras que la velocidad de crecimiento promedio es de 15,4 mm diario con un coeficiente de variación del 33%. Comparando todos los aislados se determinó que el que presentó la menor tasa de crecimiento fue el aislado Bc29 y el de mayor tasa el aislado Bc27 (Figura 3).



**FIGURA 2** Tasa de crecimiento de todos los aislados en diagrama de Tukey. El rango se representa con las barras externas y la media con la línea gruesa al interior de la caja.

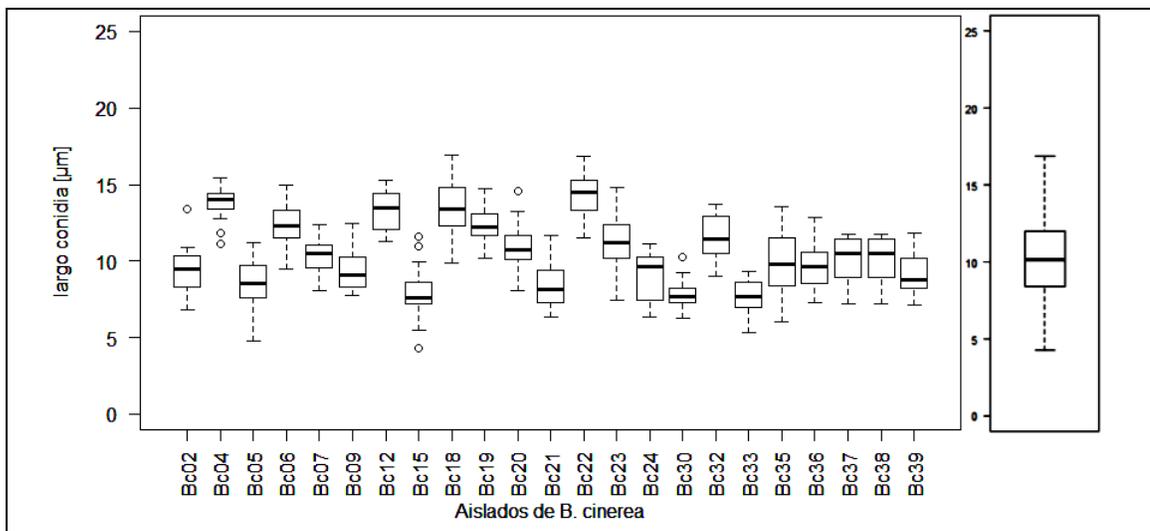
Igualmente a los resultados morfológicos de Grindle (1979), los resultados revelan que la velocidad de crecimiento es muy variable, con un rango muy amplio y heterogéneo, presentando diferencias altamente significativas entre todos los aislados.



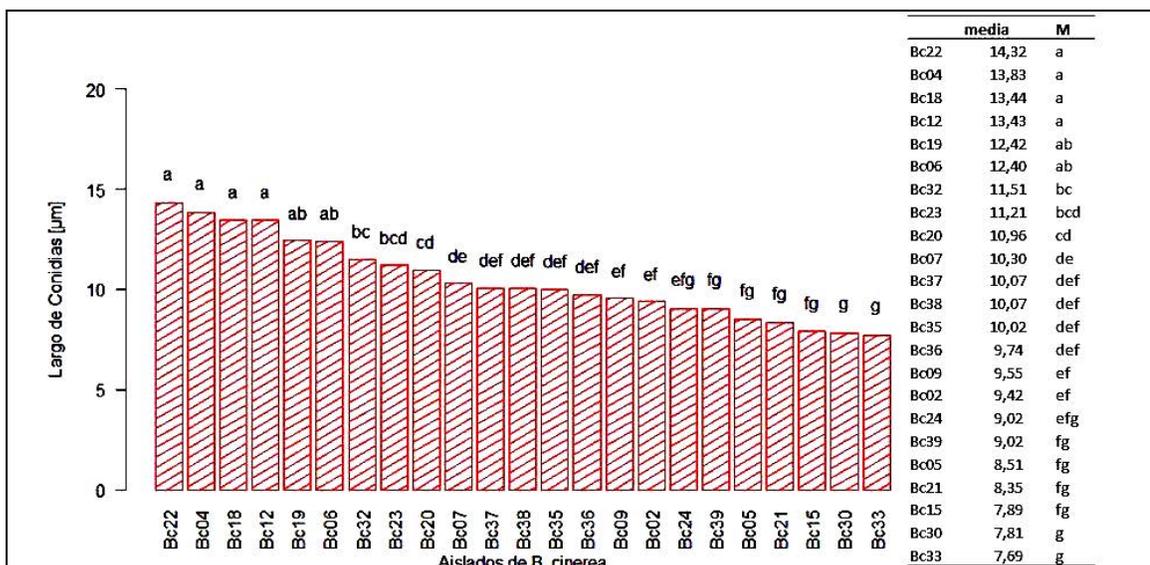
**FIGURA 3** Comparación de la tasa de crecimiento entre los distintos aislados aplicando el test HSD de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras distintas indican diferencias altamente significativas.

**3.1.4 Dimensión de conidias.** Sólo el 59% de los 39 aislados produjo conidias en el período de evaluación, el largo promedio medido fue de  $10,5 \pm 2 \mu\text{m}$  x  $7,1 \pm 1,1 \mu\text{m}$ , con una proporción media entre el largo y el ancho de las conidias de  $1,5 \mu\text{m}$  y un coeficiente de variación de 15% (Figura 4). El rango fue de  $14,3 \mu\text{m}$  x  $7,7 \mu\text{m}$  máximo y  $7,7 \mu\text{m}$  x  $5,3 \mu\text{m}$  mínimo (Cuadro 3). Similar a otros reportes de *B. cinerea* aislados desde arándanos y flores, los aislados presentaron conidias en promedio más grandes, aunque se encuentran dentro del rango, lo que confirma la pertenencia a la especie *B. cinerea* (Sanhueza, 2012; Dhyani *et al.*, 2012; Khazaeli *et al.*, 2006).

Por otra parte, comparando el largo de las conidias se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos. Se estableció que los aislados que producen las conidias más grande son el Bc04, Bc12, Bc18 y Bc22; mientras que los de menor tamaño son los aislados Bc30 y Bc33 (Figura 5).

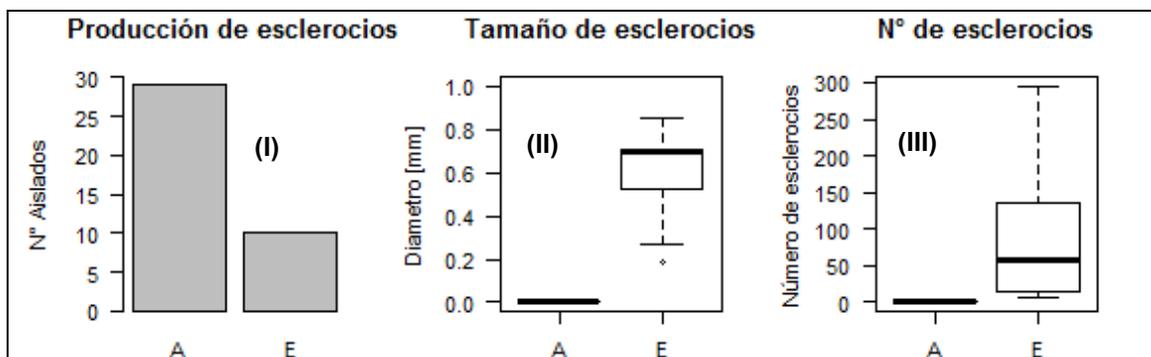


**FIGURA 4 Dimensión de conidias en diagrama de Tukey.**  
El rango se representa con las barras externas y la media con la línea gruesa al interior de la caja.



**FIGURA 5 Comparación de dimensión de conidias entre aislados aplicando el test HSD de Tukey ( $P < 0,05$ ) sobre el largo de las conidias.**  
Letras distintas indican diferencias altamente significativas.

**3.1.5 Producción de esclerocios.** Observando la Figura 6, se observa que sólo el 26% de los aislados formó esclerocios, con una media de 88 esclerocios por aislado, y un diámetro medio de 0,7 mm.



**FIGURA 6 Producción de esclerocios (I): tamaño (II) y número (III) promedio de esclerocios por placa Petri, en diagrama de Tukey.**

A: Aislados que no producen esclerocios      E: Aislados que producen esclerocios

A la vista de resultados similares, con alta variabilidad, Román (2014) sugiere que ciertos caracteres morfológicos, como la capacidad formadora de esclerocios y conidias, pueden variar en un mismo aislamiento dependiendo de las condiciones de incubación y la exposición previa de éstos a determinados fungicidas, lo que se revelaría estudiando la participación de mutaciones y genotipos en estas características.

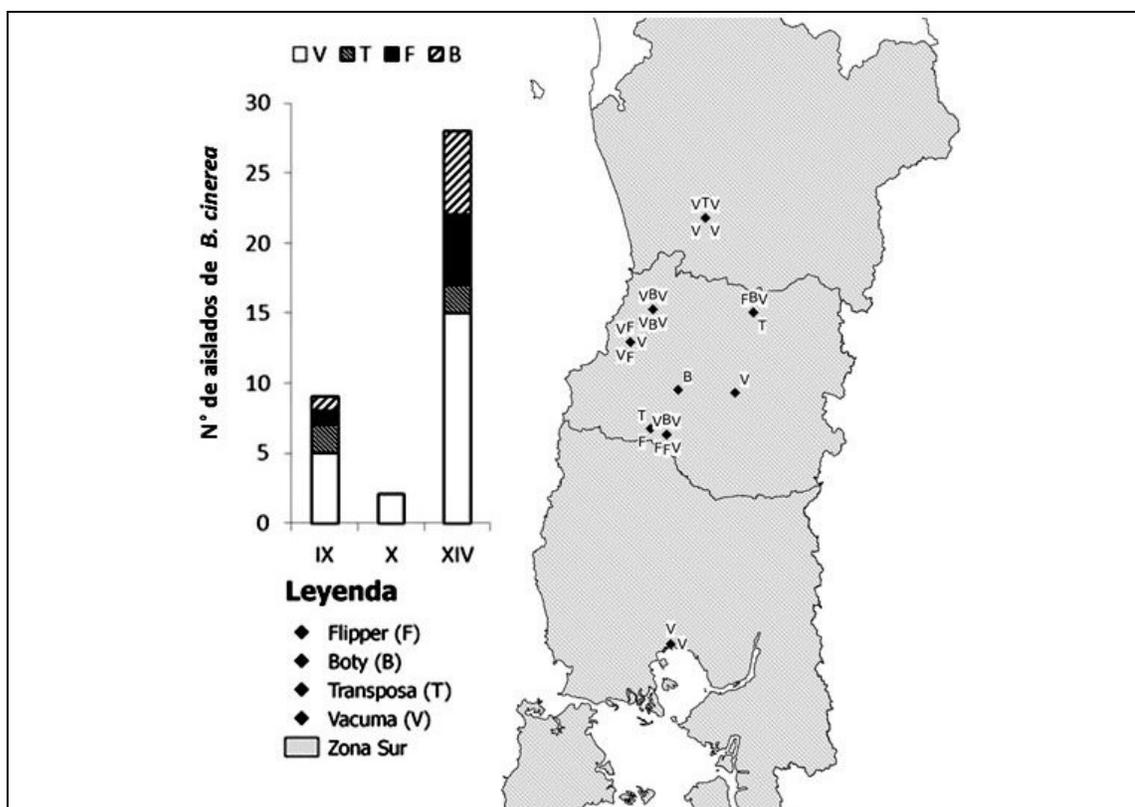
### 3.2 Resultados de la caracterización genética

**3.2.1 Genotipos presentes en la zona sur de Chile.** En la Figura 7 se muestra que los cuatro genotipos están presentes en las poblaciones de la zona sur estudiadas. El más abundante es Vacuma con 57%, seguido por Boty con 18%, Flipper con 15% y finalmente Transposa con un 10%.

Resultados similares, se reportan en trabajos realizados con aislados provenientes de huertos de arándanos de la zona centro sur de Chile (Auger, 2013; Román, 2014; Muñoz *et al.*, 2002; Esterio *et al.*, 2011b). Según Auger (2013), en un estudio sobre la composición genotípica de aislados de *Botrytis spp.*, realizado durante floración y cosecha en huertos de arándanos (cv. Brigitta) de las regiones del Maule, del Bío Bío y de los Ríos, encontró correspondencia climática de la proporción de genotipos para cada zona. Así, hacia el sur, a medida que aumentaban las precipitaciones y disminuían las temperaturas, encontró un aumento de las poblaciones de Vacuma con gran predominancia sobre Boty y Flipper. En tanto Boty y Flipper, se mantuvieron en

proporciones similares, destacando predominancia de ambos genotipos en la región del Maule durante floración.

Por otro lado, en un estudio de poblaciones de *B. cinerea* en Hungría, la dinámica de los transposones presentó resultados altamente variables, sin acusar correlación con el hospedero, el año de aislación o el tratamiento fungicida que fue aplicado. En éste, se compararon aislados provenientes de frambuesa y frutilla durante tres años, realizando aislamientos durante las distintas etapas de crecimiento del cultivo. Al primer año, encontraron los cuatro genotipos en aislados de frutilla, con minoría de Boty y predominancia de los otros tres genotipos en igual repartición. Al segundo año, los resultados cambiaron, encontrando escasez de Vacuma y Flipper, en ambos cultivos, cuando la aislación era más temprana. Al tercer año, donde las colectas de aislados se hicieron más temprano en ambos cultivos, solo se encontró Transposa y Flipper, con predominancia del primero (Asadollahi *et al.*, 2013).

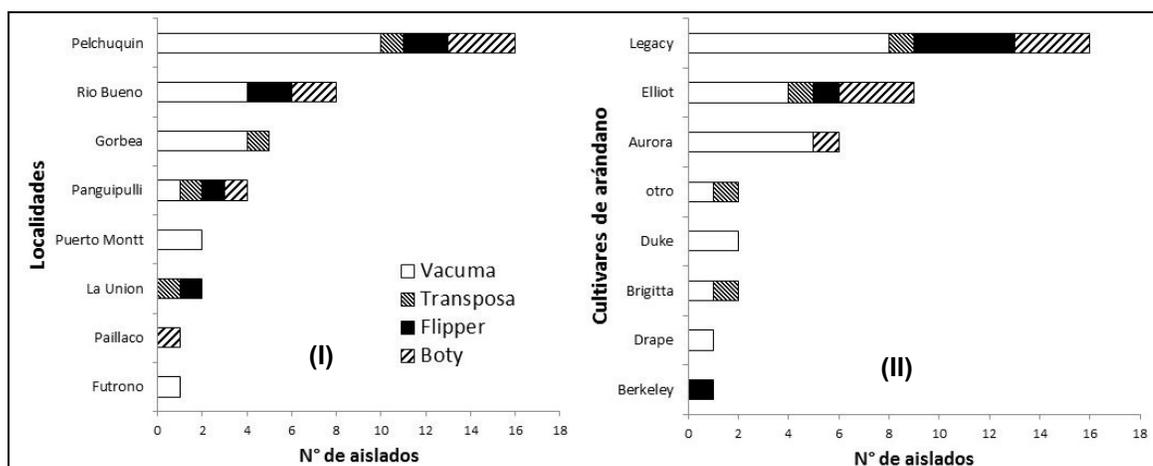


**FIGURA 7** Distribución geográfica de genotipos aislados de *B. cinerea* de la zona sur de Chile.

**3.2.2 Distribución geográfica de genotipos por procedencia del aislado.** En la literatura se ha afirmado que la distribución de genotipos de *B. cinerea* en Chile tiene gran variabilidad y que su frecuencia se relaciona tanto por la geografía como por el tipo de hospedero (Muñoz *et al.*, 2002; Esterio *et al.*, 2011a; Auger, 2013; Román, 2014; Thompson y Latorre, 1999).

Los aislados de este estudio proceden principalmente de la XIV Región de los Ríos, donde se observa que el genotipo más frecuente es Vacuma y que el menos abundante es Transposa, también que un tercio de la población posee al menos uno de los transposones, existiendo similar proporción para los genotipos Boty y Flipper. Igualmente, en la IX Región de la Araucanía, se observa predominancia de Vacuma con la misma composición de genotipos (Figura 7).

Si se observa en detalle la distribución por cultivar de arándanos (Figura 8), se tienen más aislados provenientes de los cultivares Legacy y Elliot, manifestándose en éstos todos los genotipos. Además, la proporción de genotipos en ambos cultivares es similar, predominando Vacuma, seguido por Boty y Flipper, sobre Transposa. Patrón que no se repite en los aislamientos de La Unión y Paillaco, y en aislados obtenidos desde arándanos cv. Berkeley, donde el único aislado de esos grupos no correspondió al genotipo predominante.



**FIGURA 8** Distribución de genotipos de *B. cinerea* según localidad del aislado (I) y cultivar de arándano (II).

**CUADRO 3 Características morfológicas y genéticas de 39 aislados de *B. cinerea***

Aislado	Genotipo	MS457 <sup>1</sup>	Color <sup>2</sup>	Nivel de Esporulación	Tasa de Crecimiento [mm d <sup>-1</sup> ]	Dimensión de Conidias [µm]					Esclerocios		N°	
						Largo		Ancho		L / A		Tamaño [mm]		
						media	SD	media	SD	D	SD	media		SD
Bc01	Flipper	(-)	PG	4	20,41	10,61 ± 10,69	-	6,18 ± 6,32	-	1,72 ± 3,13	0,56 ± 0,23	-	60	
Bc02	Boty	(-)	PG	4	17,15	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc03	Flipper	(-)	PG	3	20,94	14,50 ± 13,80	-	9,80 ± 8,70	-	1,48 ± 3,32	-	-	-	
Bc04	Flipper	(-)	PG	3	18,09	7,56 ± 7,65	-	6,04 ± 6,11	-	1,25 ± 1,07	-	-	-	
Bc05	Vacuma	(-)	PO	4	11,76	12,40 ± 12,10	-	6,80 ± 8,10	-	1,82 ± 3,96	-	-	-	
Bc06	Transposa	(+)	PP	2	14,33	9,89 ± 10,01	-	6,27 ± 6,49	-	1,58 ± 2,56	-	-	-	
Bc07	Transposa	(+)	PA	2	19,32	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc08	Boty	(+)	PG	2	15,42	8,83 ± 8,92	-	8,82 ± 8,85	-	1,00 ± 0,01	0,69 ± 0,16	-	146	
Bc09	Vacuma	(-)	PA	2	18,64	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc10	Vacuma	(-)	PA	3	15,62	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc11	Vacuma	(-)	PG	3	18,34	14,00 ± 13,90	-	9,40 ± 7,30	-	1,49 ± 3,25	-	-	-	
Bc12	Transposa	(-)	PG	3	18,09	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc13	Vacuma	(-)	PO	3	18,85	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc14	Vacuma	(-)	PG	3	16,92	7,04 ± 7,04	-	5,57 ± 5,57	-	1,26 ± 1,04	-	-	-	
Bc15	Boty	(+)	PG	4	18,40	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc16	Vacuma	(-)	PG	3	17,05	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc17	Vacuma	(-)	PG	2	4,30	14,40 ± 13,10	-	7,40 ± 6,90	-	1,95 ± 4,95	-	-	-	
Bc18	Flipper	(+)	PG	3	17,57	13,60 ± 14,10	-	7,90 ± 8,30	-	1,72 ± 4,03	-	-	-	
Bc19	Flipper	(+)	PG	3	18,85	9,70 ± 12,60	-	7,70 ± 6,90	-	1,26 ± 1,41	-	-	-	
Bc20	Boty	(+)	PP	2	11,80	6,84 ± 6,86	-	5,32 ± 5,35	-	1,29 ± 1,07	1,91 ± 0,75	-	6	
Bc21	Vacuma	(-)	A	3	21,69	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc22	Vacuma	(-)	PG	3	11,08	9,00 ± 11,30	-	8,90 ± 7,20	-	1,01 ± 0,07	-	-	-	
Bc23	Vacuma	(+)	PG	2	15,09	6,61 ± 7,36	-	7,23 ± 7,50	-	0,91 ± 0,44	0,70 ± 0,32	-	25	
Bc24	Flipper	(+)	PA	2	13,94	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc25	Vacuma	(-)	PG	3	19,36	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc26	Vacuma	(-)	PG	3	19,32	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc27	Vacuma	(-)	PG	3	22,85	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc28	Vacuma	(-)	PO	4	12,31	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc29	Transposa	(-)	PO	4	3,04	6,84 ± 7,17	-	5,97 ± 5,98	-	1,15 ± 0,62	-	-	-	
Bc30	Vacuma	(+)	PG	4	21,14	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc31	Boty	(-)	PA	2	19,10	12,90 ± 11,00	-	6,00 ± 7,10	-	2,15 ± 4,88	-	-	-	
Bc32	Vacuma	(+)	PG	3	15,65	8,09 ± 8,86	-	4,71 ± 4,89	-	1,72 ± 2,39	0,27 ± 0,09	-	11	
Bc33	Boty	(-)	PG	2	19,06	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc34	Vacuma	(+)	PG	2	7,30	11,91 ± 12,70	-	5,77 ± 6,34	-	2,06 ± 4,34	0,52 ± 0,12	-	54	
Bc35	Boty	(+)	PG	3	9,22	12,44 ± 12,87	-	6,83 ± 6,86	-	1,82 ± 3,97	0,85 ± 0,23	-	14	
Bc36	Vacuma	(+)	PA	4	16,05	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bc37	Vacuma	(-)	PG	1	8,07	-	-	-	-	-	0,71 ± 0,22	-	135	
Bc38	Vacuma	(+)	PG	1	8,07	10,52 ± 10,62	-	6,53 ± 6,61	-	1,61 ± 2,82	0,71 ± 0,22	-	135	
Bc39	Vacuma	(+)	PG	3	5,95	-	-	-	-	-	0,19 ± 0,05	-	295	

<sup>1</sup> Gen MS457:

Ausente (-)      Presente (+)

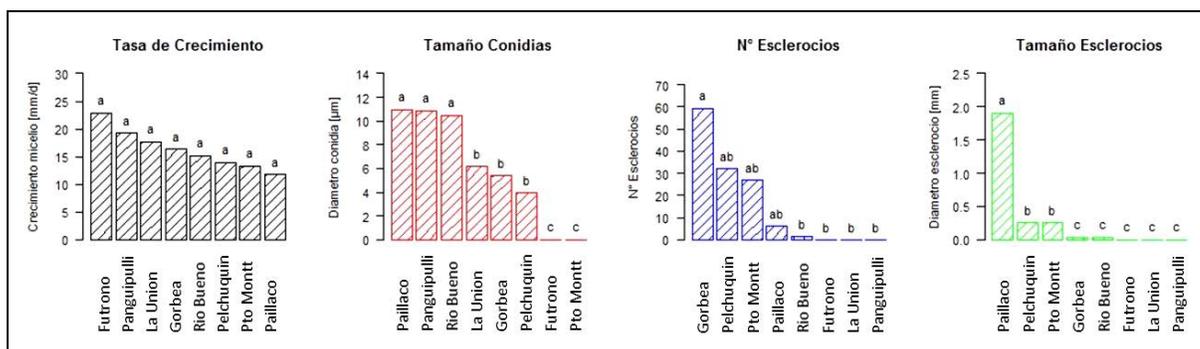
<sup>2</sup> Color de micelio:

Amarillo (A), Pardo amarillo (PA), Pardo grisáceo (PG), Pardo oscuro (PO), Pardo pálido (PP)

### 3.3 Análisis correlativo entre los factores y las variables morfológicas

Con los resultados de la caracterización del Cuadro 3, se estudiaron posibles correlaciones entre los factores cualitativos (morfológicos, genéticos y geográficos) y las variables cuantitativas morfológicas: tasa de crecimiento, tamaño de conidias y producción de esclerocios.

**3.3.1 Localidad del aislado y variables morfológicas.** Los resultados obtenidos muestran que la localidad de obtención de los aislamientos de *B. cinerea*, provee al menos una mínima diferencia significativa sobre la media de tres variables morfológicas, sin observar diferencias estadísticas en la tasa de crecimiento (Figura 9). Respecto al tamaño de conidias, los aislamientos de Futrono y Puerto Montt no produjeron conidias, sin embargo, para el resto de las localidades se distinguen dos grupos. Producen las conidias más grandes (mayor a 10  $\mu\text{m}$  de largo) aislamientos provenientes de Paillaco, Panguipulli y Río Bueno. En cambio, producen de menor tamaño las provenientes de Gorbea, La Unión y Pelchuquín.

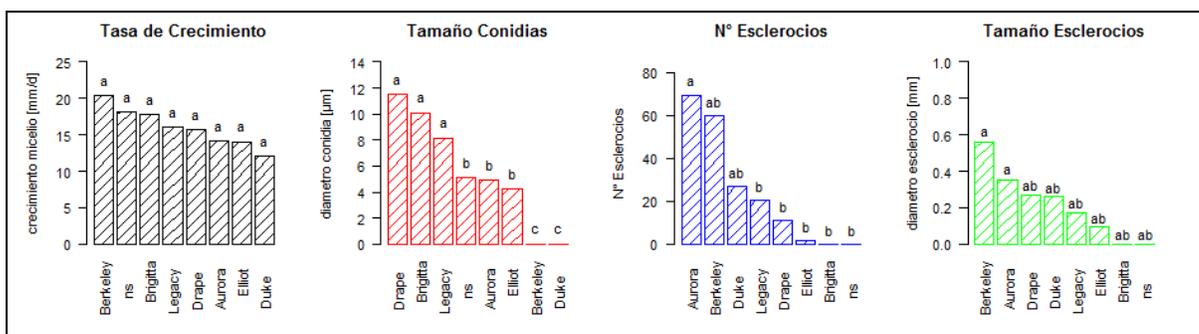


**FIGURA 9** Relación entre la localidad del aislado y las variables morfológicas de *B. cinerea*. Letras distintas indican diferencias según test LSD de Fischer (P < 0,05).

Respecto de la producción de esclerocios, se observa una diferencia significativa entre los aislamientos provenientes de Futrono, La Unión, Panguipulli y Río Bueno, los que no producen esclerocios, con respecto a Gorbea, en la que se encuentra la mayor producción y a Paillaco, quien presenta los esclerocios de mayor tamaño.

**3.3.2 Cultivar de arándano y variables morfológicas.** Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los aislados obtenidos de distintos cultivares en tamaño de conidias y en número de esclerocios, no así en la tasa de crecimiento ni en

el tamaño de esclerocios (Figura 10), En cuanto al tamaño de conidias, los aislados obtenidos de los cultivares Drape, Brigitta y Legacy, producen las conidias más grandes, mientras que los aislados provenientes de Aurora y Elliot las de menor tamaño. No se observaron conidias en los aislados provenientes de los cv. Berkeley y Duke. En los cultivares Aurora y Berkeley se pueden encontrar los esclerocios de mayor tamaño, mientras que en mayor cantidad sólo en Aurora. En el otro extremo, la menor producción de esclerocios se manifiesta en Brigitta, Drape, Elliot y Legacy.

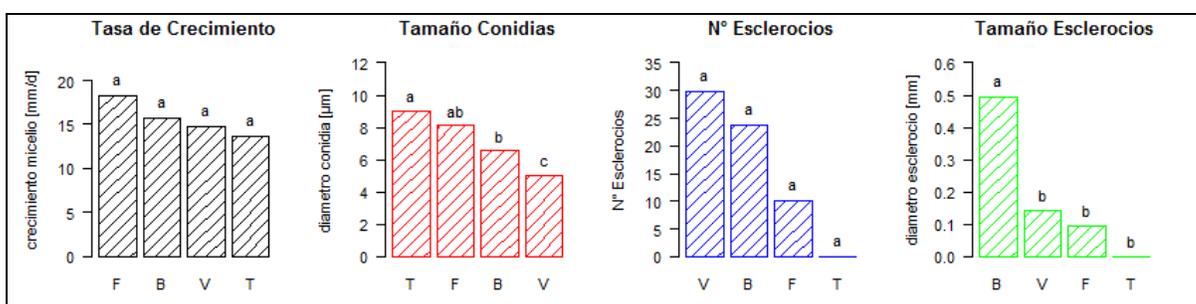


**FIGURA 10 Relación entre el cultivar de arándano y las variables morfológicas de *B. cinerea*.** Letras distintas indican diferencias según test LSD de Fischer ( $P < 0,05$ ).

Gabler *et al.*, (2003) correlacionan en vides las características químico morfológicas del hospedero en virtud de los diversos niveles de resistencia a *Botrytis*, comparando la fruta madura de diferentes cultivares. Además, productores de arándanos (BLUEBERRIES CHILE, 2014; CHILEAN BLUEBERRY COMMITTEE, 2013), indican que la elección de una variedad puede mejorar las condiciones de rendimiento, incluso en post-cosecha, debido a que cultivares más tardíos están mejor adaptados a las condiciones agroclimáticas de la zona, disminuyendo las condiciones predisponentes a *Botrytis* entre otras enfermedades (Hancock *et al.*, 2008). Por otra parte, Thompson y Latorre (1999) encontraron gran diversidad genotípica en aislados de *B. cinerea* al comparar en función de agrupamientos según el tipo de hospedero, lo cual concuerda con algunas diferencias morfológicas encontradas en los resultados de este estudio.

**3.3.3 Genotipo del aislado y variables morfológicas.** Los resultados de este ensayo (Figura 11) indican que el genotipo según la presencia de elementos transponibles no afecta la tasa de crecimiento de los aislados. No obstante, se distinguen tamaños de conidias distintos según el genotipo, donde los aislados que

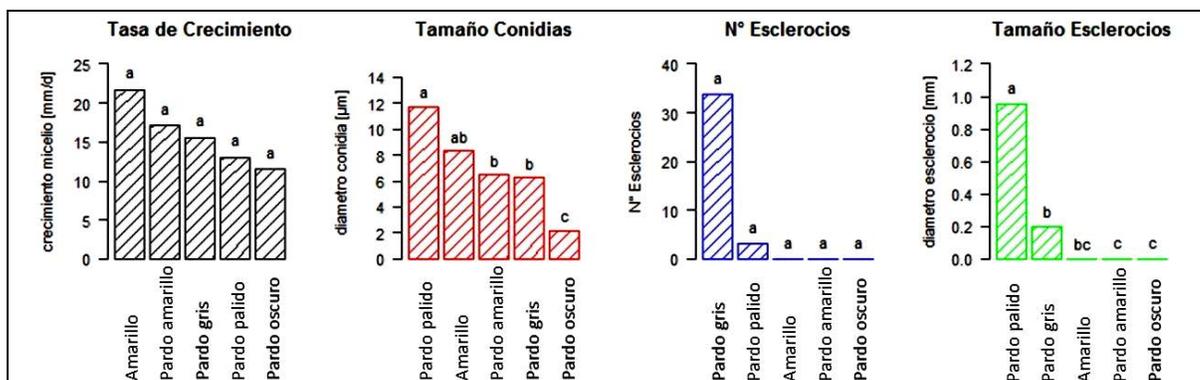
poseen al menos uno de los transposones muestran un tamaño de conidia mayor, así el genotipo Transposa produce las conidias de mayor diámetro, mientras que Vacuma el de menor tamaño; contraponiéndose a los resultados obtenidos por Giraud *et al.* (1997), donde el largo de conidias fue mayor en aislados Vacuma que en Transposa. Debido al amplio rango de los límites de control superior (UCL) e inferior (LCL), no hay diferencias significativas en el número de esclerocios, según el genotipo. Sin embargo, en caso de producir esclerocios, el genotipo Boty produce los esclerocios más grandes.



**FIGURA 11** Relación entre el genotipo del aislado y las variables morfológicas de *B. cinerea*. Letras distintas indican diferencias según test LSD de Fischer ( $P < 0,05$ ).

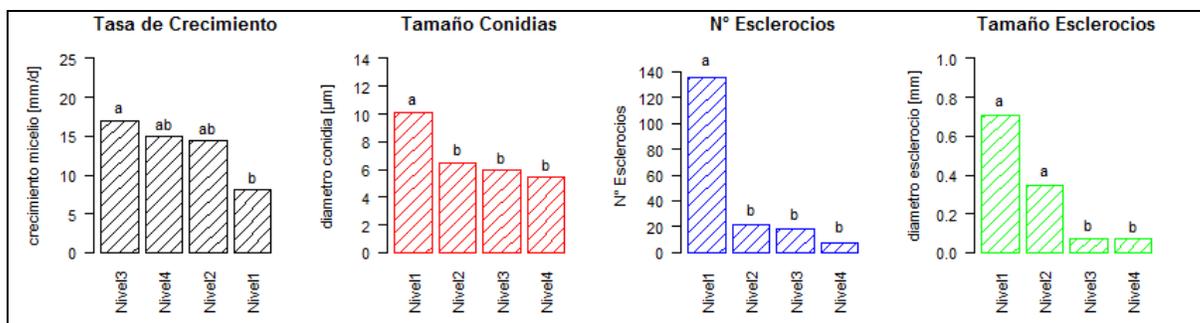
B: Boty                      F: Flipper                      V: Vacuma                      T: Transposa

**3.3.4 Color de micelio y variables morfológicas.** A nivel estadístico el color de micelio no produce diferencias en la tasa de crecimiento ni en el número de esclerocios (Figura 12). Por otra parte, se observa que los aislados con color de micelio “pardo pálido” tienen el mayor tamaño de conidias y de esclerocios. Mientras que en los colores “amarillo”, “pardo amarillo” y “pardo oscuro” no hubo producción de esclerocios, tampoco hay diferencia respecto al número, aunque se destaca que los esclerocios más pequeños se producen en los aislados de color “pardo grisáceo”.



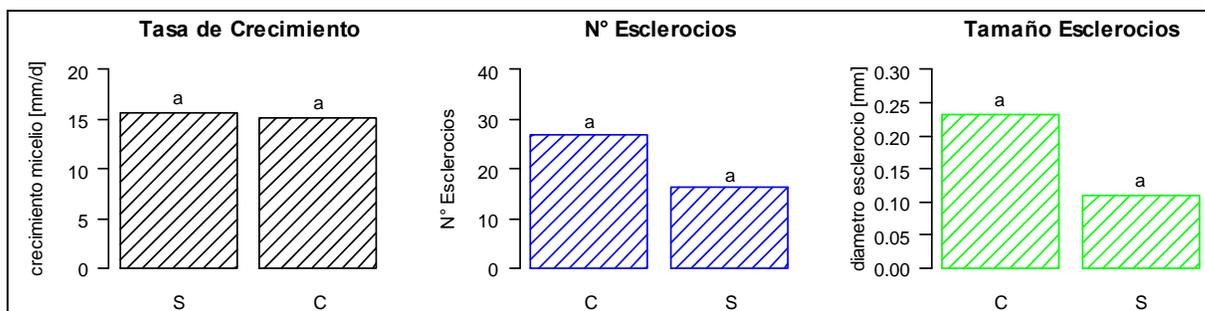
**FIGURA 12** Relación entre el color de micelio del aislado y las variables morfológicas de *B. cinerea*. Letras distintas indican diferencias significativas según test LSD de Fischer ( $P < 0,05$ ).

**3.3.5 Nivel de esporulación y variables morfológicas.** En general, se observa en la Figura 13 que según el nivel de esporulación se encuentran diferencias para cada variable morfológica. Respecto a la tasa de crecimiento, los aislados con esporulación de nivel 3 tienen el crecimiento más rápido, mientras que los más lentos son los aislados con esporulación de nivel 1. Respecto al tamaño de conidias, claramente se distinguen dos grupos, encontrando en los aislados de nivel 1 las conidias más grandes. Asimismo, en el nivel 1 se encuentra la mayor producción de esclerocios. Mientras que los niveles de esporulación 1 y 2 concentran los aislados que producen el mayor tamaño de esclerocios.



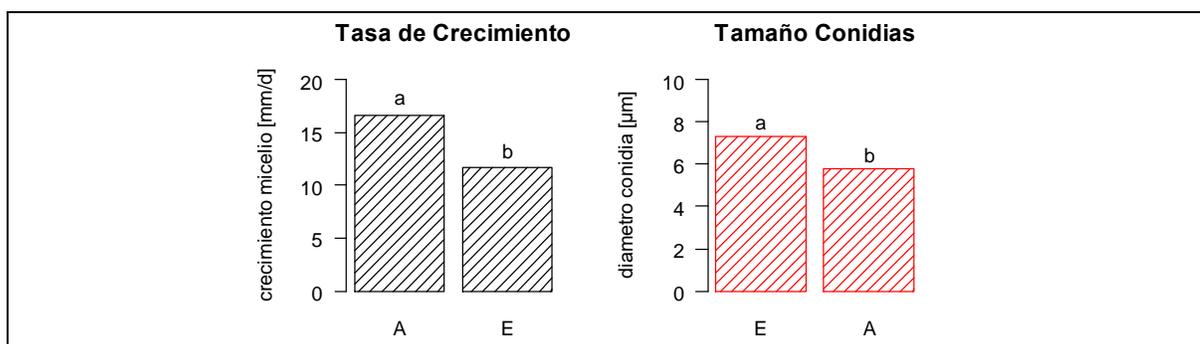
**FIGURA 13** Relación entre el nivel de esporulación y las variables morfológicas de *B. cinerea*. Letras distintas indican diferencias según test LSD de Fischer ( $P < 0,05$ ).

**3.3.6 Producción de conidias y variables morfológicas.** A nivel estadístico no se encontraron diferencias ni efectos significativos de la producción de conidias sobre las variables morfológicas (Figura 14).



**FIGURA 14 Relación entre la producción de conidias y las variables morfológicas de *B. cinerea*.** Letras distintas indican diferencias según test LSD de Fischer ( $P < 0,05$ ). **C: Producen conidias** **S: Sin producción de conidias**

**3.3.7 Producción de esclerocios y variables morfológicas.** Se observa en la Figura 15 diferencias estadísticas sobre la tasa de crecimiento y el tamaño de las conidias según si los aislados presentan producción de esclerocios o si se encuentran ausentes. La ausencia de esclerocios concentra los aislados con mayor tasa de crecimiento, pero con las conidias más pequeñas. Por el contrario, la presencia de esclerocios reúne a los aislados con mayor tamaño de conidias y con la menor tasa de crecimiento.



**FIGURA 15 Relación entre la producción de esclerocios y las variables morfológicas de *B. cinerea*.** Letras distintas indican diferencias significativas según test LSD de Fischer ( $P < 0,05$ ). **A: Ausencia de esclerocios** **E: Esclerocios presentes**

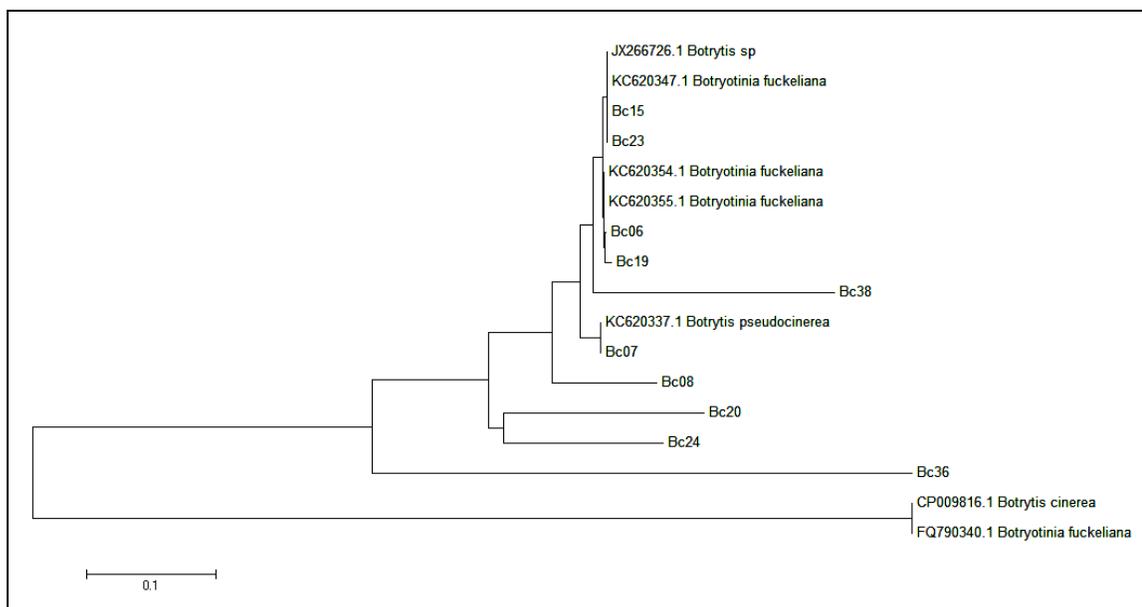
### 3.4 Secuenciación y análisis filogenético

Se presentan los 10 aislados que poseen el gen MS457, en el Cuadro 4, cuya identidad se ha confirmado en porcentaje suficiente para analizarlos filogenéticamente. Además, a nivel molecular se confirmó la pertenencia de los aislados al género *Botrytis spp.*, también se determinó la identidad de dos aislamientos catalogados inicialmente como *B. cinerea* que corresponden a *B. pseudocinerea* (Bc07 y Bc08), ambos con presencia de transposones.

**CUADRO 4 Aislados de *B. cinerea* con presencia del gen MS457**

Aislado	Identidad %	Especie de Botrytis	Genotipo	GenBank
Bc 06	99	<i>B. cinerea</i>	Transposa	KC620354.1
Bc 07	99	<i>B. pseudocinerea</i>	Transposa	KC620337.1
Bc 08	100	<i>B. pseudocinerea</i>	Boty	KC620337.1
Bc 15	99	<i>B. cinerea</i>	Boty	KC620347.1
Bc 19	96	<i>B. cinerea</i>	Flipper	KC620355.1
Bc 20	94	<i>B. cinerea</i>	Boty	KC620347.1
Bc 23	99	<i>B. cinerea</i>	Vacuma	CP009816.1
Bc 24	87	<i>B. cinerea</i>	Flipper	KC620347.1
Bc 36	74	<i>B. cinerea</i>	Vacuma	CP009816.1
Bc 38	84	<i>B. cinerea</i>	Vacuma	KC620347.1

Se elaboraron *clusters* filogenéticos a partir de la secuenciación del gen MS457, primeramente reportado en Europa por Walker *et al.* (2011) y luego Nueva Zelandia por Johnston *et al.* (2014), con el propósito de comparar la cercanía entre aislamientos de *B. cinerea* en arándanos de trabajos con caracterización genética en Francia, Alemania y Nueva Zelandia.



**FIGURA 16** *Cluster* filogenético elaborado con el método *Neighbor joining* basado en la secuenciación del gen MS457 en los aislados del Cuadro 4.

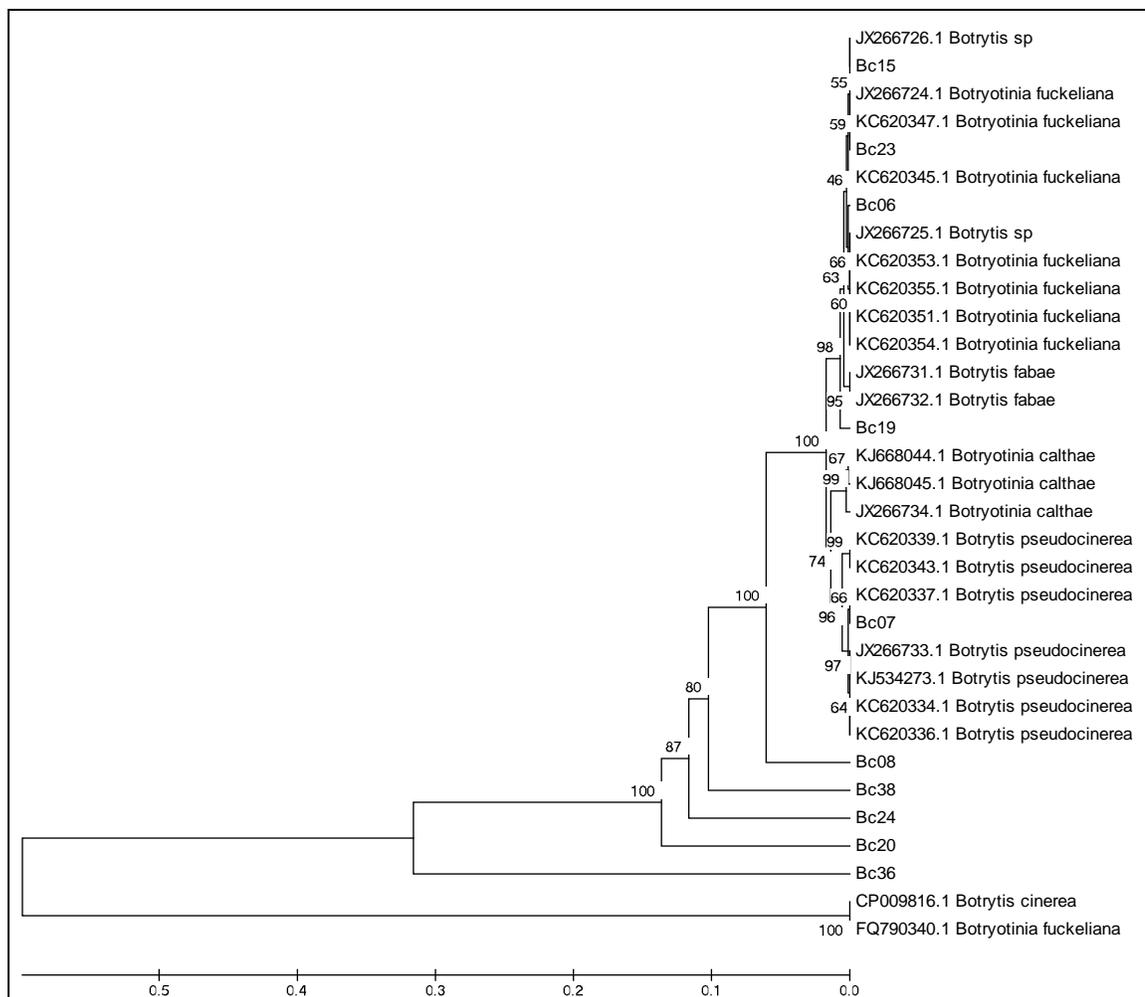
Se observa en la Figura 16 la cercanía filogenética entre algunos aislados, calzando todos en un *cluster*, pese a que no tienen relación con los genotipos basados en la presencia de transposones.

La relación es más estrecha, formando un *micro cluster* con el telomfo de *B. cinerea*, entre los aislados Bc15 y Bc23, así como Bc06 y Bc19, junto a las accesiones KC620347.1 y JX266726.1 así como, KC620354.1 y KC620355.1 respectivamente. Con mayor cercanía a este *micro cluster* se posiciona fuera el aislado Bc38. Asimismo, se observa cercanía filogenética entre el aislado Bc07 y KC620337.1, formando el *micro cluster* de *B. pseudocinerea*, quedando fuera aunque con relativa cercanía Bc08. Por otra parte, se aprecia cercanía filogenética entre los aislados Bc20 y Bc24, quedando fuera Bc36, debido posiblemente al bajo porcentaje de identidad, localizándose dentro del *cluster* principal.

Interesantemente, estos agrupamientos no evidencian las diferencias morfológicas encontradas al agruparlas por genotipos, ni se relacionan con las comparaciones de Tukey entre todos los aislados (Figuras 3 y 5). Prueba de ello son los aislados Bc06 y Bc19, proviniendo de distintos hospederos y localidades, los cuales se presentan muy

cercanos, pero con genotipos y tasas de crecimiento diferentes, aunque producen conidias de igual tamaño.

Del mismo modo, se desarrolló otro *cluster* filogenético aplicando el método UPGMA sobre el gen MS457, en el cual se incorporaron las accesiones JF421577–95 (Walker *et al.*, 2011) que contiene otras especies relacionadas al moho gris como *Botrytis fabae*, *Botryotinia calthae* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Amselem *et al.*, 2011).



**FIGURA 17** *Cluster* filogenético elaborado con el método UPGMA basado en la secuenciación del gen MS457 en los aislados del Cuadro 4 y las accesiones JF421577–95. Sobre el nodo valores de *bootstrap* (1000 iteraciones)

Al igual que Walker y Fournier (2012) y Auger (2013), los resultados del nuevo *cluster* (Figura 17) exponen la presencia de poblaciones simpátricas en el mismo hospedero con predominancia de *B. cinerea* sobre la subespecie *B. pseudocinerea*.

Por otra parte, se observa que se repite la distribución de los aislados dentro de las mismas especies. Mientras que los aislados Bc06, Bc15 y Bc23 se encuentran estrechamente cercanos a un grupo donde predominan aislamientos de *Botryotinia fuckeliana*, seguido en cercanía por *B. fabae* y el aislado Bc19.

Igualmente, se revela que no hay aislamientos estrechamente cercanos a *B. calthae*. Aunque el grupo de las *B. pseudocinerea* resultan más cercanas a la especie *B. calthae*, revelando que no son hermanas a *B. cinerea* (Walker *et al.* 2011). En tanto, los aislados Bc08, Bc20, Bc24, Bc36 y Bc38 se localizan nuevamente dentro del cluster principal, pero en menor cercanía que los aislados mencionados.

Por último, no se detecta ninguna correlación entre la cercanía filogenética con las características morfológicas, ni con los genotipos detectados, ya que este análisis sólo pretende corroborar la posición de los aislados en estudio con las distintas especies de *Botrytis*.

#### 4. CONCLUSIONES

Se caracterizaron aislados de *Botrytis spp.* según morfología, estableciendo diferencias estadísticas entre todos los aislados, con gran variabilidad en la tasa de crecimiento y el tamaño de las conidias. Quedó expuesto que los aislados de la zona sur en su mayoría no producen esclerocios y que la capacidad de producir esclerocios se relaciona con el tamaño de las conidias, mas no en la capacidad de producirlas. Los aislados que producen esclerocios poseen las conidias más grandes aunque tienen la menor tasa de crecimiento.

La comparación por genotipos demostró que afecta sólo al tamaño de conidias y esclerocios, encontrando alta variabilidad en el tamaño de conidias y destacando la singularidad de Boty como el genotipo que produce los esclerocios más grandes. Así mismo, se determinó que la presencia de cualquiera de los transposones aumenta el tamaño de las conidias.

Se destaca, por otra parte, que en la zona sur de Chile los cultivares de arándanos con mayor variabilidad genotípica de *Botrytis* son Legacy y Elliot, encontrándose en ellos todos los genotipos. No obstante, aunque la variedad del hospedero no afecta la tasa de crecimiento, sí afecta significativamente en el tamaño de conidias y en la producción de esclerocios.

La caracterización genética de aislados, provenientes de huertos de arándanos de la zona sur, reveló poblaciones simpátricas sobre el mismo hospedero, predominando en abundancia *B. cinerea* sobre *B. pseudocinerea*. Mientras que la caracterización genotípica, reveló la presencia de los cuatro genotipos con similar distribución en las regiones de la zona sur, con predominancia de Vacuma y minoría de Transposa. No obstante, se destaca la ausencia del genotipo predominante en los aislados provenientes de La Unión y Paillaco, y los obtenidos de arándanos cv. Berkeley, debido posiblemente al bajo número de aislados de esta zona.

Finalmente, basado en la caracterización de aislados de *B. cinerea* en la zona sur, se acepta la hipótesis planteada sobre la existencia de una variabilidad morfológica relacionada con la variabilidad genética.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amselem, J., Cuomo, C., Van Kan, J.A.L., Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A., Coutinho, P., De Vries, R.P., Dyer, P.S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K.M., Pradier, J.-M., Quévillon, E., Sharon, A., Simon, A., Have, A. Ten, Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V., Beever, R.E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collémare, J., Cotton, P., Danchin, E.G., Da Silva, C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Güldener, U., Henrissat, B., Howlett, B.J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuvéglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rasclé, C., Schumacher, J., Ségurens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D.M., Talbot, N.J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J.A., Lebrun, M.-H., Dickman, M. 2011. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*, edit. Paul M. Richardson, *PLoS Genetics*, 7(8): e1002230, ISSN-1553-7404, DOI-10.1371/journal.pgen.1002230,
- Arismendi, N., Andrade, N., Riegel, R., Carrillo, R. 2010. Presence of a Phytoplasma associated with 'witches broom' disease in *Ugni molinae* Turcz. and *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI, PCR and DNA sequencing, *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70: 26-33
- Asadollahi, M., Fekete, E., Karaffa, L., Flipphi, M., Árnýasi, M., Esmaeili, M., Váczy, K., Sándor, E. 2013. Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two open-field cultivated host plants., *Microbiological Research*, 168: 379-388, ISSN-09445013, DOI-10.1016/j.micres.2012.12.008,
- Auger, J. 2013. Composición genotípica de *Botrytis* spp. en uva de mesa, kiwi y arándano, según cultivo y zona agroclimática., [en línea] En: Convención FEDEFRUTA, Disponible en: <http://www.fruittrade.cl/convencion/>
- Benito, E., Arranz, M., Eslava, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*, [en línea] *Rev Iberoam Micol*, 17(sS43-S46) Disponible en: [http://www.reviberoammicol.com/pubmed\\_linkout.php?17pS43](http://www.reviberoammicol.com/pubmed_linkout.php?17pS43) [Consulta: 8 de mayo de 2014].
- BLUEBERRIES CHILE. 2014, Resumen de temporada (sept 2012- marzo 2013) de análisis de *Botrytis cinerea* en arándano (*Vaccinium corymbosum*)., [en línea] Disponible en: <http://www.blueberrieschile.cl/reportajes/post307.html> [Consulta: 8 de mayo de 2014].
- Brown, T. 2008. *Genomas/ Genome*, Ed. Médica Panamericana, pp. 764, ISBN-978-950-06-1448-1

- Centre National de Séquençage (GENOSCOPE). 2008, FRANCIA. Estimated losses for vineyards in France amount to 15-40% of the harvest, depending on climatic conditions - Site du Genoscope, *Centre National de Séquençage*, [en línea] Disponible en: <http://www.genoscope.cns.fr/spip/Botrytis-cinerea-estimated-losses.html> [Consulta: 7 de junio de 2014].
- CHILEAN BLUEBERRY COMMITTEE. 2012. Chile: Estudio de *Botrytis* en arándanos chilenos, *Plataforma estudio conjunto Botrytis El Comité de Arándanos, la Universidad de Chile y la Fundación de Desarrollo Frutícola*, [en línea] Disponible en: <http://www.portalfruticola.com/2012/01/24/chile-estudio-de-botrytis-en-arandanos-chilenos/?pais=chile> [Consulta: 8 de mayo de 2014].
- CHILEAN BLUEBERRY COMMITTEE. 2013. Norma de calidad arándano fresco de exportación, [en línea] Disponible en: <http://www.comitedearandanos.cl/web/spanish/pdf/norma-de-calidad.pdf> [Consulta: 8 de mayo de 2014].
- Ciampi, L., Radic, S., Alvarez, E. 2006. *Patología vegetal micológica*, Ed. Editorial Nueva Firenze, pp. 266, ISBN-956-310-423-4,
- Curtis, H., Schnek, A. 2008. *Curtis. Biología*, Ed. Ed. Médica Panamericana, pp. 1164, ISBN-978-950-06-0334-8,
- Devlin, T. 2004. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*, Ed. Reverte, pp. 1248, ISBN-978-84-291-7208-9,
- Dhyani, A., Nautiyal, B.P., Nautiyal, M.C., Rivera, M.C., Prasad, D., Singh, K.P. 2012. Primera cita de *Botrytis cinerea* sobre *Lilium polyphyllum*, especie en peligro de extinción en Uttarakhand, India, *Phyton (Buenos Aires)*, 81: 157–159
- Diolez, A., Marches, F., Fortini, D., Brygoo, Y. 1995. Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*, *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 103–108
- Esterio, M. 2013. Evolución de los niveles de sensibilidad a los botrycidas en uva de mesa de exportación según presión de selección de fungicidas, [en línea] En: Convención FEDEFRUTA, Disponible en: <http://www.fruittrade.cl/convencion/>
- Esterio, M., Auger, J., Ramos, C., Araneda, M. 2011a. *Botrytis* en uva de mesa de exportación: PCR en Tiempo Real una innovadora herramienta tecnológica para la detección oportuna de resistencia a fungicidas, [en línea] Proyecto InnovaChile de CORFO, Código Innova: 07CN13IBM-14), (Laboratorio de Fitopatología Frutal y MolecularFac. de Ciencias AgronómicasUNIVERSIDAD DE CHILE), Disponible en: [http://www.fedefruta.cl/newsletter/123/docs/Marcela\\_Esterio\\_Botrytis.pdf](http://www.fedefruta.cl/newsletter/123/docs/Marcela_Esterio_Botrytis.pdf)
- Esterio, M., Muñoz, G., Ramos, C., Cofré, G., Estévez, R., Salinas, A., Auger, J. 2011b. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates present in Thompson seedless table grapes in the central valley of Chile, *Plant Disease*, 95: 683–690

- Fekete, E., Irinyi, L., Karaffa, L., Árnayasi, M., Asadollahi, M., Sándor, E. 2012. Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary, *Microbiological Research*, 167: 283-291, ISSN-09445013, DOI-10.1016/j.micres.2011.10.006,
- Gabler, F.M., Smilanick, J.L., Mansour, M., Ramming, D.W., Mackey, B.E. 2003. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*, *Phytopathology*, 93: 1263-1273
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K., Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuina*, are found in sympatry on numerous host plants, *Phytopathology*, 89: 967-973
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., Brygoo, Y. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species, *Molecular Biology and Evolution*, 14: 1177-1185
- Grindle, M. 1979. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*, *Journal of General Microbiology*, 111: 109-120
- Hancock, J., Callow, P., Serçe, S., Hanson, E., Beaudry, R. 2008. Effect of cultivar, controlled atmosphere storage, and fruit ripeness on the long-term storage of highbush blueberries, *HortTechnology*, 18: 199-205
- Johnston, P.R., Hoksbergen, K., Park, D., Beaver, R.E. 2014. Genetic diversity of *Botrytis* in New Zealand vineyards and the significance of its seasonal and regional variation, *Plant Pathology*, 63: 888-898, ISSN-00320862, DOI-10.1111/ppa.12143
- Khazaeli, P., Zamanizadeh, H., Morid, B., Bayat, H. 2006. Morphological and molecular identification of *Botrytis cinerea* causal agent of gray mold in rose greenhouses in central regions of Iran, [en línea] Disponible en: [http://www.sid.ir/En/VEWSSID/J\\_pdf/1022320100103.pdf](http://www.sid.ir/En/VEWSSID/J_pdf/1022320100103.pdf) [Consulta: 7 de mayo de 2014].
- Kumari, S., Tayal, P., Sharma, E., Kapoor, R. 2014. Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates, *Microbiological Research*, 169:862-72, ISSN-09445013, DOI-10.1016/j.micres.2014.02.012,
- Levis, C., Fortini, D., Brygoo, Y. 1997. Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*, *Molecular and General Genetics MGG*, 254: 674-680
- Marques, T. 2013. Caracterización fisiológica y genética de las poblaciones naturales de *Botrytis cinerea* de los viñedos de Castilla y León, [en línea] Universidad de Salamanca, Salamanca, España, Disponible en: <http://gredos.usal.es/jspui/handle/10366/123022> [Consulta: 9 de mayo de 2014].

- Muñoz, C., Talquenca, S., Oriolani, E., Combina, M. 2010. Genetic characterization of grapevine-infecting *Botrytis cinerea* isolates from Argentina, *Revista iberoamericana de micología*, 27: 66–70
- Muñoz, G., Campos, F. 2013. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* isolates collected from pine and eucalyptus nurseries in Bio-Bio Region, Chile, *Forest Pathology* 43: 509-512, ISSN-14374781, DOI-10.1111/efp.12057
- Muñoz, G., Hinrichsen, P., Alvarez, M. 1999. Variabilidad genética de cepas de *Botrytis cinerea* provenientes de vid y tomate con resistencia a dicarboximidas, *Agricultura Técnica*, 59: 12, ISSN-0365-2807
- Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., Giraud, T. 2002. Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile, *Mycological Research*, 106: 594-601, ISSN-0953-7562, DOI-10.1017/S0953756202005981
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2014. CHILE. Ministerio de Agricultura de Chile, [en línea] Disponible en: <http://www.odepa.cl/> [Consulta: 12 de mayo de 2014].
- Pérez, J.L. 2004. Detección molecular del alelo de resistencia a benomilo en cepas de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., aisladas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile,
- Pierce, B.A. 2009. Genética: Un enfoque conceptual, Ed. Médica Panamericana, País? 836 p., ISBN-978-84-9835-216-0,
- Román, A. 2014. Caracterización genética y fenotípica de aislados chilenos de *Botrytis cinerea* de diferente grado de sensibilidad a boscalid, [en línea] Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/1440> [Consulta: 9 de julio de 2015].
- Sanhueza, G. 2012. Determinación de resistencia de diez aislamientos de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., obtenidos de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), a cinco fungicidas, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile,
- Secretaría Nacional de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SENASICA). 2012. MEXICO. *Ficha técnica CB-27: Obtención de cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos*, Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal
- Thompson, J.R., Latorre, B.A. 1999. Characterization of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile using RAPD-PCR, *Plant disease*, 83: 1090–1094
- Walker, A. S., Fournier, E. 2012. *Botrytis pseudocinerea*, une nouvelle espece distincte de *B. cinerea* responsable de la pourriture grise de la vigne, [en línea] ser. AFPP-10e CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES TOURS-3, Disponible en:

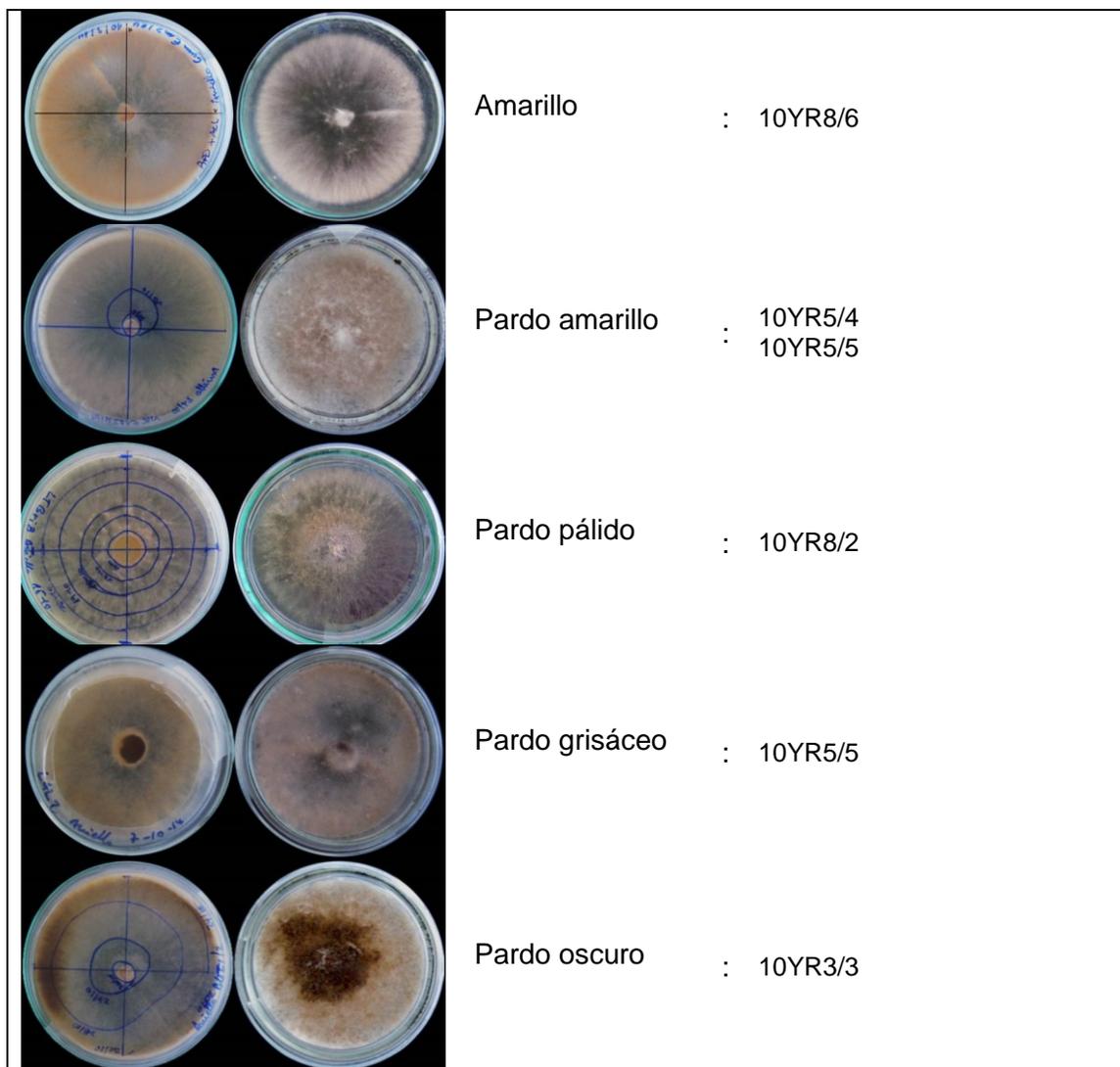
<http://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2013/20133118195.pdf>  
de diciembre de 2014].

[Consulta: 24

- Walker, A. S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., Dupont, J., Fournier, E. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*, *Phytopathology*, 101: 1433–1445
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease, *Molecular Plant Pathology*, 8: 561-580, ISSN-1464-6722, 1364-3703, DOI-10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x
- Zamorano, M. 2005. Determinación del grado de resistencia de aislamientos de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. obtenidos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. y *Vaccinium ashei* Reade.) a los fungicidas iprodione, benomilo y captan., [en línea] Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/faz.25d/sources/faz.25d.pdf> [Consulta: 9 de mayo de 2014].

## **ANEXOS**

**ANEXO 1: Color de micelio de aislados de *B. cinerea* provenientes de la zona sur de Chile**



**FIGURA 1** Ejemplos de aislados de *B. cinerea* determinados por color de micelio con tabla Munsell®

**ANEXO 2: Protocolo extracción de ADN de hongos (ARISMENDI *et al.*, 2010)**

1. Poner el micelio raspado de las placas Petri en 300  $\mu$ l de buffer TE a pH 8.0.
2. Centrifugar a 5500 g (aprox. 7500 RPM) por 5 minutos. Quitar el sobrenadante con micropipeta (aprox. 200  $\mu$ l) cuidando de no sacar micelio.
3. Agregar 300  $\mu$ l de buffer extracción. Moler con pistilo e incubar por 30 minutos a 60 °C.
4. Agregar 300  $\mu$ l cloroformo-octanol (24:1), pasar por Vortex hasta lograr una emulsión.
5. Centrifugar a 5000 g por 10 minutos.
6. Recuperar el sobrenadante (aprox. 160 a 200  $\mu$ l) en otro tubo Eppendorff. Agregar el mismo volumen rescatado de cloroformo-octanol y voltear.
7. Centrifugar a 5000 g por 5 minutos.
8. Rescatar el sobrenadante (aprox. 200  $\mu$ l) en otro tubo Eppendorff.
9. Agregar 150  $\mu$ l de acetato de amonio 7,5 M y 220  $\mu$ l de isopropanol. Mezclar por inversión y dejar precipitar a -20 °C por 30 minutos o más.
10. Sin agitar, centrifugar a 13000 g por 20 minutos.
11. Eliminar el sobrenadante invirtiendo el tubo. Agregar 200  $\mu$ l de etanol 70% a -20 °C. Voltear.
12. Centrifugar a 11000 RPM por 5 minutos. Eliminar sobrenadante invirtiendo el tubo. Repetir el proceso anterior (lavando con etanol 70%).
13. Secar el tubo a temperatura ambiente sin tapar (invertido sobre una toalla de papel secante).
14. Re-suspender el ADN en 50  $\mu$ l de buffer TE pH 8.0 más 1% de RNAsa.
15. Incubarlo a 37 °C por 15 minutos.

### ANEXO 3: Protocolos de amplificación de transposones por PCR

**Protocolo 1: Utilizado en los trabajos de MUÑOZ *et al.* (2010); FEKETE *et al.* (2012); GIRAUD *et al.* (1999); LEVIS *et al.* (1997).**

Para detectar los transposones *Boty* y *Flipper* en la misma placa de gel agarosa, se utilizó el par de partidores señalados en el Cuadro 1. Boty1 L/R, cuya PCR amplifica un producto de 638 pb a 54°C, y Flipper1 L/R, cuya PCR amplifica 1250 pb a 60°C.

**Cuadro 1 Partidores utilizados en Protocolo 1**

Partidor	Secuencia 5' - 3'	Tamaño producto secuenciado	Temperatura de <i>annealing</i>
Boty 1 L	CCCAATTTATTCAATGTCAG	638 pb	54 °C
Boty 1 R	TAACCTTGTCTTTGCTCATC		
Flipper 1 L	GCACAAAACCTACAGAAGA	1250 pb	60 °C
Flipper 1 R	ATTCGTTTCTTGGACTGTA		

Con 1,5 µl de ADN del hongo aislado más los reactivos MM del Cuadro 2, generando un volumen final de 15 µl por aislado.

**Cuadro 2 Ingredientes para reactivos MM utilizados en el Protocolo 1**

Reactivos MM	x1 [µl]
PVP	7
Buffer 10x	1,8
MgCl <sub>2</sub>	1,2
dNTP's	1,2
Partidor R	0,8
Partidor L	0,8
uTaq DNA Polymerasa	0,1

El termociclador se programó en gradiente de temperatura de 54 a 60 °C (Cuadro 3).

**Cuadro 3 Programación del termociclador para detección de transposones**

Ciclos	T °C	Tiempo
1 x	94	5 min
34 x	94	1 min
	54 ~ 60	1 min
	72	1 min 30 s
1 x	72	10 min
	4	

Finalmente, los productos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel agarosa al 1% TBE, teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta.

**Protocolo 2: Utilizado en el trabajo de JOHNSTON et al. (2014)**

Para detectar los transposones *Boty* y *Flipper*, se corrieron las PCR en placas de gel agarosa por separado, utilizando los partidores Boty2 L/R, cuya PCR amplifica un producto de 591 pb a 55 °C, y Flipper2 L/R, cuya PCR amplifica 579 pb a 55 °C.

**Cuadro 4 Partidores utilizados en Protocolo 2**

Partidor	Secuencia 5' - 3'	Tamaño producto secuenciado	Temperatura de <i>annealing</i>
Boty 2 L	TTAGCCAAGGGATGGATCAG	591 pb	55 °C
Boty 2 R	TTCGAGCACTGCCTTAACCT		
Flipper 2 L	CTAGCCCTACCCATCGTCAA	579 pb	55 °C
Flipper 2 R	TTGCTTCTTTCCGGTCGAGTT		

Con 2 µl de ADN del hongo aislado más los reactivos MM del Cuadro 5, generando un volumen final de 15 µl por aislado. El termociclador se programó conforme a los datos del Cuadro 6.

**Cuadro 5 Ingredientes para reactivos MM utilizados en el Protocolo 2**

Reactivos MM (13 µl)	x1 [µl]
PVP	8,15
Buffer 10x	1,2
MgCl <sub>2</sub>	1
dNTP's	1
Partidor R	0,8
Partidor L	0,8
uTaq DNA Polymerasa	0,05

**Cuadro 6 Programación del termociclador para detección de transposones**

Ciclos	T °C	Tiempo
1 x	94	5 min
34 x	94	1 min
	55	1 min
1 x	72	1 min 30 s
	72	10 min
	4	

Finalmente, los productos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel agarosa al 1% TBE, teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta.

#### ANEXO 4: Protocolo de amplificación del gen MS457 por PCR

Se aplicó la metodología indicada en los trabajos de WALKER *et al.* (2011) y JOHNSTON *et al.* (2014) utilizando la pareja de partidores del Cuadro 1, cuya secuencia amplifica un producto de 935 pb a 56 °C.

**Cuadro 1 Partidores para amplificar gen MS457**

Partidor	Secuencia 5' - 3'	Tamaño producto secuenciado	Temperatura <i>annealing</i>
MS457 L	AAGGAGGACGTTGGAAGGAT		
MS457 R	AAGTCCAGAATCTCGATGTATTTGT	935 pb	56 °C

La reacción se preparó con 0,2 µg de ADN del hongo aislado más los reactivos MM del Cuadro 2. Luego se programó el termociclador conforme a los datos del Cuadro 3.

**Cuadro 2 Ingredientes reactivos MM para detección del gen MS457**

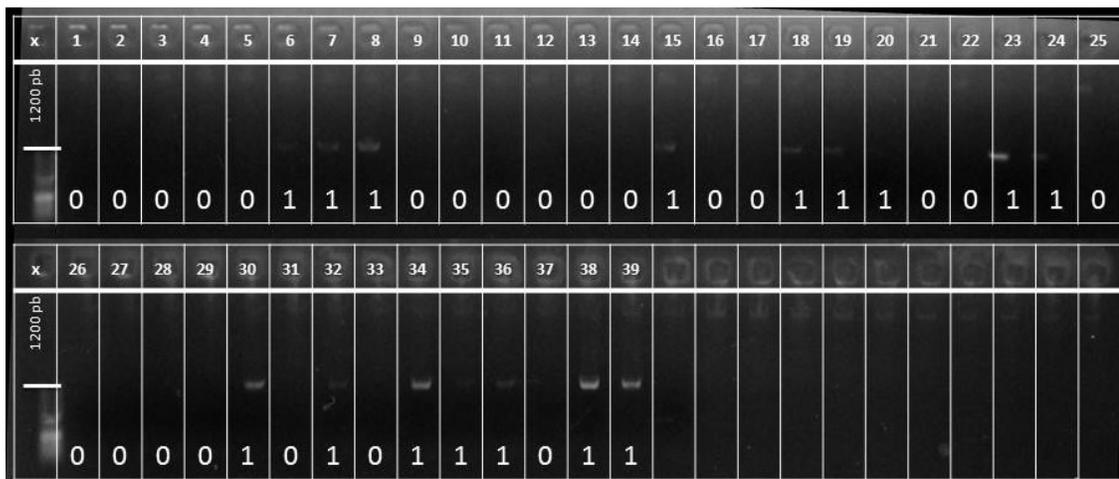
Reactivos MM (13 µl)	x1
Buffer 10x	5 µl
1 M MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTP's	65 µM
Partidor R	10
Partidor L	10
uTaq DNA Polymerasa	0,2 U

**Cuadro 3 Programación del termociclador para detección del gen MS457**

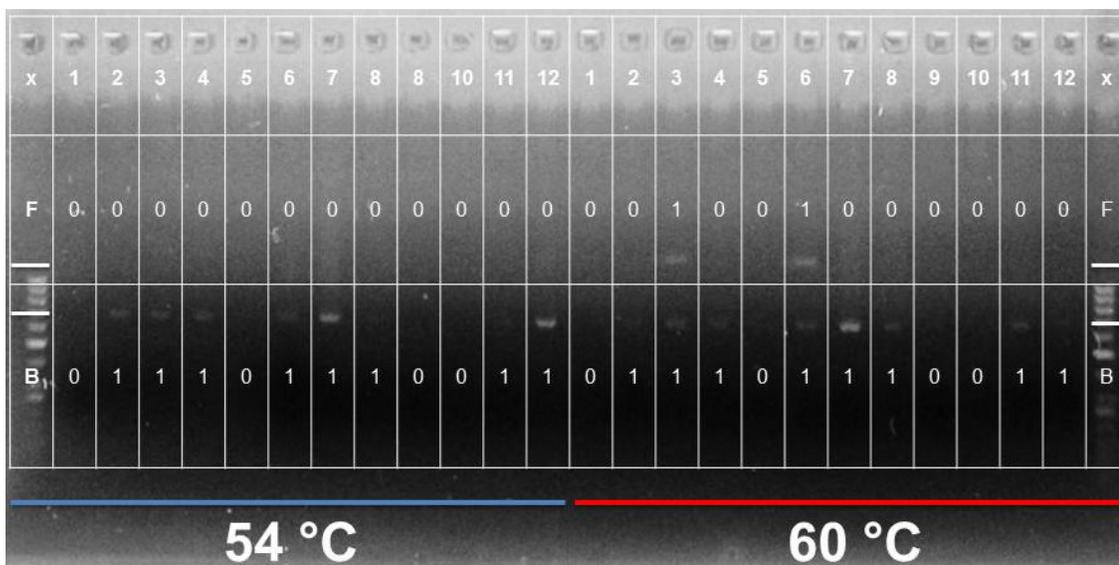
Ciclos	T °C	Tiempo
1 x	94	5 min
34 x	94	45 s
	56	1 min
	72	1 min
1 x	72	10 min
4		

Finalmente, los productos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel agarosa al 1% TBE, teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta. Para la secuenciación, en laboratorio externo, se preparó con la misma receta, pero para 50 µl de producto PCR.

### ANEXO 5: Cromatografía en gel de agarosa para aislados de *Botrytis*



**FIGURA 1** Cromatografía en gel de agarosa para detección del gen MS457 en aislados 1 al 39. Ausente (0) Presente (1)



**FIGURA 2** Cromatografía en gel de agarosa para detección de transposones *Boty* y *Flipper* en aislados 1 al 12 utilizando Protocolo 1 con prueba de temperatura a 54 y 60 °C. El aislado Bc06 queda como control(+), presenta *Boty* y *Flipper*.  
 B: *Boty*. F: *Flipper*. Ausente (0) Presente (1)

x	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	x	
B	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	B
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	F

**FIGURA 3** Cromatografía en gel de agarosa para detección de transposones *Boty* y *Flipper* en aislados 13 al 36 utilizando Protocolo 1.  
B: *Boty*. F: *Flipper*. Ausente (0) Presente (1)

x	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	1F	2F	3F	4F	5F	6F	7F	8F	9F	10F	11F	12F	x	
B	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1													B	
F													1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	F

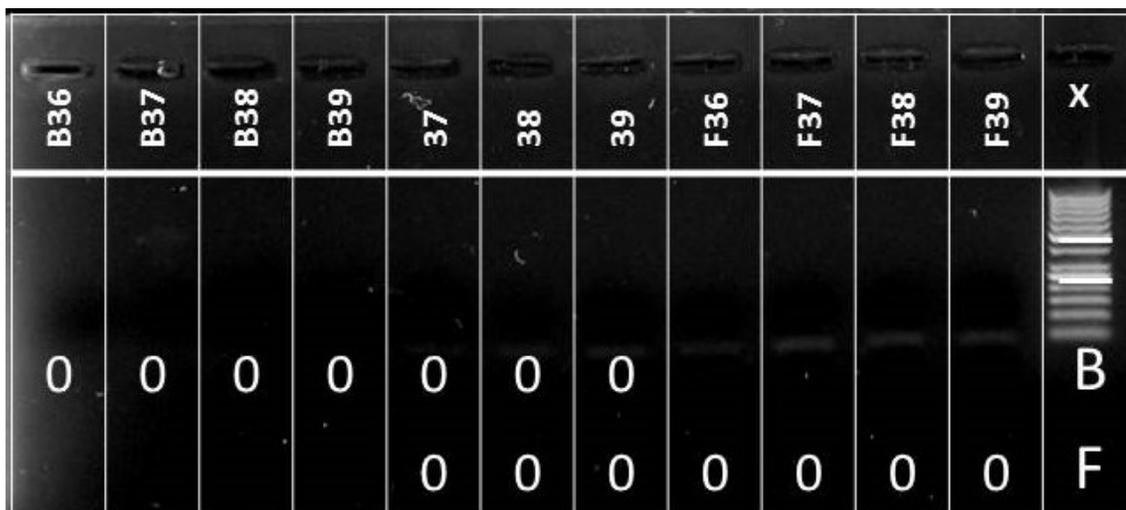
**FIGURA 4** Cromatografía en gel de agarosa para detección de transposones *Boty* y *Flipper* en aislados 1 al 12 utilizando Protocolo 2.  
B: *Boty*. F: *Flipper*. Ausente (0) Presente (1)

x	6	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	x
B	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	B

**FIGURA 5** Cromatografía en gel de agarosa para detección de transposon *Boty* utilizando Protocolo 2 en aislados 13 al 35 con aislado 6 como control (+). Ausente (0) Presente (1)



**FIGURA 6** Cromatografía en gel de agarosa para detección de transposon *Flipper* utilizando Protocolo 2 en aislados 13 al 35 con aislado 6 como control (+). Ausente (0) Presente (1)



**FIGURA 7** Cromatografía en gel de agarosa para detección de transposones *Boty* y *Flipper* en aislados 36 al 39 utilizando Protocolo 2, y Protocolo 1 en aislados 37 al 39.

B: *Boty*. F: *Flipper*. Ausente (0) Presente (1)