

INDICE

| | Página (no.) |
|---|--------------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Hipótesis | 2 |
| 1.2. Objetivo general | 2 |
| 1.3. Objetivos específicos | 3 |
| | |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA | 4 |
| 2.1. El cultivo del manzano | 4 |
| 2.1.1. Superficie y producción mundial de manzanas | 4 |
| 2.2. Enfermedades en el manzano | 5 |
| 2.2.1. Principales enfermedades del manzano en Chile | 5 |
| 2.3. <i>Venturia</i> , sarna, roña, moteado (<i>Venturia inaequalis</i>) | 5 |
| 2.4. Control químico de sarna del manzano | 7 |
| 2.4.1. Pirimetanil | 8 |
| 2.4.2. Difenoconazole | 8 |
| 2.4.3. Trifloxiestrobil | 8 |
| 2.5. Resistencia de <i>Venturia inaequalis</i> a fungicidas | 9 |
| 2.6. Detección molecular a través de la técnica PCR | 10 |
| 2.6.1. Elementos utilizados en PCR | 10 |
| 2.6.2 Detección del gen citocromo b (Cyt b) asociado a la resistencia a Qol | 12 |
| | |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| 3.1. Aislados fungosos | 13 |
| 3.2. Fungicidas | 15 |
| 3.3. Determinación <i>in vitro</i> del CE50 de los aislados de <i>Venturia inaequalis</i> | 15 |
| 3.4. Determinación molecular de la resistencia a trifloxiestrobil | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5. Diseño de experimento | 17 |
| IV. RESULTADOS | 18 |
| 4.1. Prueba <i>in vitro</i> | 18 |
| 4.2. Detección molecular de la mutación G143A del gen Cyt b | 21 |
| V. DISCUSIÓN | 23 |
| VI. CONCLUSION | 26 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 27 |

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1. Origen de los aislados de *Venturia inaequalis* colectados desde la Región del Maule hasta la Región de la Araucanía utilizados en el presente estudio.14

Cuadro 3.2. Partidores específicos para la detección de la mutación del sitio G143A del gen citocromo b (Cyt b) en aislados de *Venturia inaequalis* para determinar resistencia a trifloxiestrobil.17

Cuadro 4.1. Valores de concentración efectiva del 50% (CE50, µg/ml) del crecimiento micelial a los ingredientes activos difenoconazole, pirimetanil y trifloxiestrobil, y reacción a la enzima de restricción (enzima Fnu4HI) asociada a la presencia de la mutación G143A (confiere resistencia a fungicidas inhibidores de la Quinona, QoI) en el gen Cyt b en 22 aislados de *Venturia inaequalis* obtenidos en la Región del Maule y Región de la Araucanía.19

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 2.1. Ciclo biológico de la sarna del manzano causada por <i>Venturia inaequalis</i> (Agrios, 2007). | 6 |
| Figura 2.2. Síntomas de sarna del manzano en hojas y frutos. A , lesiones sarnosas en hojas cv. Royal Gala. B , lesión sarnosa en fruto cv. Fuji. | 7 |
| Figura 2.3. Pasos de un ciclo de la PCR. Desnaturalización, hibridación y extensión (Temay de Dios <i>et al.</i> , 2013). | 12 |
| Figura 3.1. Crecimiento micelial de aislados de <i>Venturia inaequalis</i> en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD) después de 30 días de incubación a 12°C. A , aislado 1. B , aislado 18. C , aislado 19. D , aislado 5. | 13 |
| Figura 3.2. Procedimiento determinación <i>in vitro</i> del CE50 de los aislados de <i>Venturia inaequalis</i> . A , Siembra de trozo invertido de agar de 3 mm de diámetro de aislado de <i>V. inaequalis</i> de 30 días de edad, sobre placa de Petri con fungicida difenoconazole. B , Cámara de crecimiento en donde se incuban los aislados de <i>V. inaequalis</i> a 17 °C. | 16 |
| Figura 4.1. Alineamiento parcial de secuencias de consenso de aislados de <i>Venturia inaequalis</i> del gen citocromo b, que muestra el cambio de la posición 143 de guanina por citosina, produciendo un cambio de aminoácido de glicina a alanina, confiriendo una resistencia a fungicidas inhibidores de la quinona (QoI, respiración celular) como trifloxiestrobil. Aislado de referencia AF004559 de <i>V. inaequalis</i> sin mutación genética disponible en GenBank. | 21 |
| Figura 4.2. Gel de agarosa de la reacción de la digestión con la enzima de restricción Fnu4HI del producto PCR generado con los partidores PS1/PR1 en aislados de <i>Venturia inaequalis</i> obtenidos en la Región del Maule y Región de la Araucanía. Los aislados sensibles (S) presentan un fragmento no cortado (500 pb) y aislados resistentes (R) en fragmento cortado (400 pb). | 22 |