



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
MAGISTER EN HORTICULTURA**

**Identificación y caracterización de aislados de *Botrytis cinerea*
obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal
cvs. Cripps Pink y Fuji.**

TESIS DE MAGISTER

JUMA FERNANDO BICHÉ

TALCA - CHILE

2019



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
MAGISTER EN HORTICULTURA**

**Identificación y caracterización de aislados de *Botrytis cinerea*
obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal
cvs. Cripps Pink y Fuji.**

Por

JUMA FERNANDO BICHÉ

TESIS DE MAGISTER

**Presentada a la Universidad de Talca como
Parte de los requisitos para optar al grado académico**

MAGISTER EN HORTICULTURA

TALCA – CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.

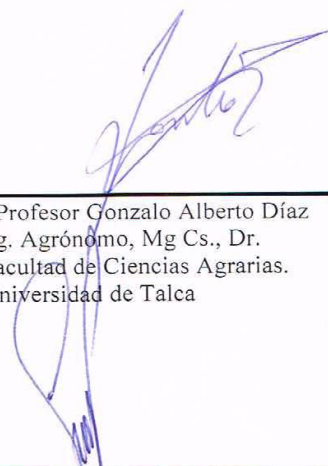


Talca, 2019

La presente tesis titulada "Identificación y caracterización de aislados de *Botrytis cinerea* obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal cvs. Cripps Pink y Fuji", realizada por el alumno Juma Fernando Biché, bajo la corrección de los académicos que se nombran a continuación, ha sido revisada y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAGÍSTER EN HORTICULTURA


Profesor Guía:


Profesor Gonzalo Alberto Díaz
Ing. Agrónomo, Mg Cs., Dr.
Facultad de Ciencias Agrarias.
Universidad de Talca

Profesor Co-guía:

Profesor Gustavo Adolfo Lobos
Ing. Agrónomo, Dr.
Facultad de Ciencias Agrarias.
Universidad de Talca

Profesor Co-guía:


Profesor Enrique Ferrada Quiroz
Ing. Agrónomo, Dr.
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Austral de Chile

Fecha de Presentación de Tesis de Grado: 16 de enero del 2019.

**El presente estudio fue apoyado y financiado por el Proyecto Fondecyt de postdoctorado
No. 3170025, CONICYT, Chile.**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por la vida, protección y la oportunidad de guiarme para obtener conocimientos científicos. Además, quisiera agradecer a mi familia por apoyarme en cada decisión de mi vida.

Quiero agradecer a mi profesor guía Dr. Gonzalo Alberto Díaz, por darme la oportunidad de poder trabajar en esta investigación, por su constantemente entrega de conocimientos, por su paciencia, preocupación y disposición en todos momentos vividos a lo largo del estudio.

Mis sinceros agradecimientos a mi profesor co-guía Dr. Gustavo Adolfo Lobos, por las oportunidades entregadas, su apoyo y dedicación durante el desarrollo de esta tesis. Agradecimientos extensivos a mi profesor co-guía Dr. Enrique Ferrada Quiroz por la enseñanza, y su constante apoyo incondicional en las actividades teóricas y prácticas.

Agradezco a los miembros de dirección y profesionales de la Facultad de Ciencias Agrarias, especialmente al director del programa de Magíster en Horticultura profesor Dr. Cesar Acevedo Opazo por su apoyo en el área académica y buena disposición en las constantes conversaciones. Además, mis más sinceros agradecimientos a los profesores y profesionales del laboratorio de Patología frutal, profesor Mauricio Lolas, Cristián Muñoz, Marcela Cáceres, Claudia Pacheco, Paulina González, Mauricio Gutiérrez, Catalina Radrigán, Fernanda Núñez, Víctor Rojas, Alexis Muñoz, Elías González, y Cecilia Saavedra por su apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

Es preciso agradecer a la Agencia Chilena de Cooperación Internacional y Desarrollo, en coordinación con el Ministerio de la Agricultura de Mozambique, por haberme otorgado la Beca Nelson Mandela que me permitió realizar mis estudios de postgrado en el Programa de Magíster de Horticultura de la Universidad de Talca, Talca, Chile.

INDICE	Página
RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
CAPITULO 1.....	9
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
1.1.OBJETIVO GENERAL.....	10
1.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2. ESTADO DEL ARTE.....	10
2.1. Antecedentes del cultivo del manzano.....	11
2.2. Principales enfermedades del manzano en Chile.....	11
2.3. Etiología y epidemiología de la pudrición calicinal.....	12
2.4. Reportes de pudrición calicinal.....	13
2.5. Sintomatología y control de pudrición calicinal.....	14
2.6. Caracterización morfológica de especies de <i>Botrytis</i>	15
2.7. Caracterización molecular de <i>Botrytis</i>	16
3. BIBLIOGRAFÍA.....	18
CAPITULO 2.....	24
Identificación y caracterización de aislados de <i>Botrytis cinerea</i> obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal cvs. Cripps Pink y Fuji.....	24

RESUMEN

Botrytis cinerea Pers., agente causal de la enfermedad pudrición calicinal, ataca el cultivo de manzanos en pre cosecha, cosecha y poscosecha, reduciendo la producción y la calidad de las manzanas. Reportes de esta enfermedad en el cultivar Cripps Pink indican una incidencia a cosecha de 0,1 a 0,2%, aumentando hasta 2% después de 60 días de almacenamiento en frío convencional. En este estudio, se caracterizaron cultural, morfológica y molecularmente aislados del género *Botrytis* obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal de distintos cultivares en la Región del Maule. Para este propósito, veinte aislados fueron clasificados visualmente según la morfología de las colonias, como aislados de baja esporulación (BE) y alta esporulación (AE) en medio de cultivo agar papa dextrosa acidulada (APDA). Los parámetros morfológicos evaluados fueron forma y tamaño de conidias y conidióforos en medio de cultivo agar arveja y producción de esclerocios en APDA. Los mismos 20 aislados se caracterizaron molecularmente mediante amplificación de ADN y secuenciación de los genes gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), proteína de choque térmico (HSP60) y ARN polimerasa subunidad II dependiente de ADN (RPB2). Se realizaron pruebas de patogenicidad en frutos maduros de los cultivares Braeburn, Cripps Pink, Fuji, Gala Premium, Granny Smith, Modi, Scarlette y Red Chief. La caracterización morfológica indicó que todos los aislados corresponden al género *Botrytis*. La caracterización molecular y filogenética confirmó la identificación de los aislados en estudio, los cuales se agruparon en un grupo junto a aislados de referencia de *B. cinerea*. Las pruebas de patogenicidad resultaron positivas en todos los cultivares evaluados mostrando diferencia entre los aislados de *B. cinerea* de BE y los de AE, en cuanto a su virulencia. Esta investigación es la primera mención sobre identificación y caracterización de aislados de *B. cinerea* asociados al manzano en la Región de Maule, Chile. El patrón de BE y AE no es suficiente para discriminar posibles diferencias a nivel de especie.

Palabras clave:

Pudrición calicinal; frutos de manzana; *Botrytis*.

ABSTRACT

Calyx-end rot, caused by *Botrytis cinerea*, attacks the apple fruits during harvest and post-harvest, reducing the production and quality of fresh apples. Reports of this disease in the cultivar Cripps Pink indicate an incidence a harvest of 0.1 to 0.2%, increasing to 2% after 60 days of cold storage at 0°C. In this study, isolates of *Botrytis* obtained from blossom blight and calyx-end rot in fruits of different cultivars, were characterized culturally, morphologically, molecularly and pathogenically. Twenty isolates were visually classified according to the morphology of the colonies in low sporulation (LS) and high sporulation (HS) in culture medium potato dextrose agar acidulated (APDA). The morphological parameters evaluated corresponded to the shape and size of conidia and conidiophores on pea agar culture medium and production of sclerotia on APDA. The twenty isolates of *Botrytis* were molecularly characterized by DNA amplification and sequencing of the genes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), heat-shock protein 60 (HSP60), and DNA-dependent RNA polymerase subunit II (RPB2). Pathogenicity tests were carried out on mature apple of the cultivars Braeburn, Cripps Pink, Fuji, Gala Premium, Granny Smith, Modi, Red Chief and Scarlett. The cultural and morphological characterization indicates that all the isolates were identified as the genus *Botrytis*. The molecular characterization confirmed the identification of the isolates under study, which were grouped in a group together with reference isolates of *B. cinerea*. Pathogenicity tests were positive in all cultivars evaluated, showing differences between isolates of *B. cinerea* belonging to LS and those isolates of *B. cinerea* belonging to HS. This research is the first mention about the identification and characterization of *B. cinerea* isolates associated to apple fruits in the Maule Region, Chile. The pattern of LS and HS is not sufficient to discriminate possible differences at the species level of fungi.

Keywords:

Calyx-end rot; apples fruits; *Botrytis cinerea*.

CAPITULO 1.

Introducción general

***Botrytis cinerea* causando pudrición calicinal en manzanas.**

CAPITULO 1.

1. INTRODUCCIÓN

El manzano (*Malus x domestica* Borkh) es una de las especies frutales de mayor producción en el mundo. Los principales países productores a nivel mundial son China, Estados Unidos, Turquía, Italia y Polonia, que representan el 65% de la producción mundial (FAOSTAT, 2016). La superficie nacional es de 37.297 ha de las cuales el 87% se concentra en las Regiones de Maule 61% y 26% en la Región de O'Higgins (Odepa, 2017).

Uno de los problemas fungosos de manzanas, tanto a nivel de huerto como a cosecha y poscosecha, es la presencia del hongo *Botrytis cinerea* Pers. (Sutton *et al.*, 2014). Varios trabajos han determinado la presencia de varias especies de *Botrytis* asociado a un hospedero (Staats *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010; Ferrada *et al.*, 2016). Es más, mediante estudios de análisis moleculares varios autores han determinado nuevas especies de *Botrytis* (Staats *et al.*, 2005; Zhang *et al.* 2010). En la temporada 2015/2016, la Región del Maule registró un incremento de la enfermedad de pudrición calicinal en frutos de manzano cv. Cripps Pink durante la precosecha y cosecha, como también durante el almacenaje de los frutos en frío desde huertos comerciales localizados en Yervas Buenas; Longaví y San Clemente, Región del Maule (Ferrada *et al.*, 2017).

Considerando la importancia económica que tiene la producción de manzanas en la Región del Maule y el incremento de la prevalencia de la enfermedad pudrición calicinal durante precosecha y poscosecha, es de interés profundizar el estudio previo de Ferrada *et al.* (2017), mediante la identificación y caracterización de aislados de *Botrytis* asociados a flores y frutos. Por lo anterior, la hipótesis y objetivos de esta investigación son:

Hipótesis:

'La pudrición calicinal en manzanas en la Región de Maule, es causada por especies pertenecientes al género Botrytis, compuesta por aislados de diferente esporulación y virulencia'.

1.1.OBJETIVO GENERAL:

Identificar y caracterizar aislados de Botrytis obtenidos desde flores con tizón floral y frutos con pudrición calicinal en manzanos cv. Cripps Pink y Fuji, provenientes de la Región de Maule, Chile.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.2.1. Estudiar diferencias morfológicas y culturales de aislados de Botrytis obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal en manzanos cv. Cripps Pink y Fuji.

1.2.2. Caracterizar molecularmente aislados de Botrytis, obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal en manzanos cv. Cripps Pink y Fuji.

1.2.3. Evaluar la patogenicidad de aislados de Botrytis en frutos de manzanos cvs. Braeburn, Cripps Pink, Fuji, Gala Premium, Granny Smith, Modi, Red Chief y Scarlett.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. Antecedentes del cultivo del manzano.

El manzano (*Malus x domestica* Borkh), es una de las especies frutales de mayor producción en el mundo. La producción mundial de manzanas ha aumentado en los últimos años hasta poco más de 77 millones en 2016-2017. Los principales países productores a nivel mundial son China, Estados Unidos, Turquía, Italia y Polonia, que representan el 65% de la producción mundial (FAOSTAT, 2016).

Chile, es el principal productor de manzanas del hemisferio sur (29%), seguido por Brasil, Sudáfrica, Nueva Zelanda y Argentina con 22%, 19%, 12% y 11%, respectivamente. La industria nacional de la manzana ocupa el cuarto lugar en la exportación de manzanas fresca en el mundo con un 12 % de la participación mundial (ODEPA, 2017). Actualmente, Chile posee una superficie de 37.297 ha, de las cuales el 87% se concentra entre las Regiones del Maule con un 61% y de O'Higgins con un 26% (ODEPA, 2017).

Los cultivares de manzano más importantes en orden decreciente en la zona centro sur de Chile corresponden a Royal Gala, Granny Smith, Fuji, Scarlette, Red Chief y Cripps Pink con 21%, 21%, 10%, 6%, 6% y 5% respectivamente de la superficie plantada (ODEPA, 2011). En la Región de Maule, la superficie de manzanos corresponde a 22,487 ha, distribuidas entre los cultivares rojo y verde con 18,863 ha y 3,624 ha, respectivamente (ODEPA, 2013).

2.2. Principales enfermedades del manzano en Chile.

El manzano es una especie frutal que es afectado por varias enfermedades fungosas que producen problemas en los huertos comerciales en Chile. A nivel de campo se destacan las enfermedades fungosas que afectan al follaje y frutos como la sarna del manzano causado por *Venturia inaequalis* y otras que afectan al tronco y brazos como cancro europeo del manzano causado por *Neonectria ditissima* y canchris de la madera causado por *Botryosphaeria dothidea* (Latorre, 2004; Acuña, 2010). En frutos, las más importantes son la pudrición calicinal 'calyx-end rot' asociada a *Botrytis cinerea* (Sutton *et al.*, 2014), corazón mohoso 'moldy core' asociada a especies de *Alternaria*: *A. alternata*, *A. arborescences*, *A. infectoria* y *A. tenuissima* (Elfar *et al.*, 2018), ojo de buey 'bull's eye rot' causado por *Neofabraea vagabunda* (Soto-Alvear *et al.*, 2013) y moho azul del fruto causado por *Penicillium expansum* (Latorre, 2004).

2.3. Etiología y epidemiología de la pudrición calicinal.

Botrytis cinerea Pers. es un hongo fitopatógeno que mundialmente ataca a más de 200 especies de plantas, destacándose entre las hortícolas, frutícolas, y numerosas plantas silvestres principalmente dicotiledóneas (Elad *et al.*, 2007). Generalmente, los síntomas se caracterizan por ser lesiones de color marrón claro a marrón oscuro, que generan una pudrición de consistencia blanda de los tejidos, y en ocasiones el tejido atacado aparece con micelio de color blanco a gris, que corresponden al signo de la enfermedad (Elad *et al.*, 2004). En Chile este hongo ha sido reportado como hospedero en más de 60 diferentes plantas cultivadas de diferentes categorías taxonómicas, incluido el manzano (Acuña, 2010). *B. cinerea* es la especie de *Botrytis* que ha sido descrita causando pudrición calicinal en manzanas como en peras (Latorre, 2018; Sutton *et al.*, 2014). También se ha descrito a la especie *B. mali*, pero en una frecuencia muy baja (Sutton *et al.*, 2014).

El hongo *B. cinerea* se desarrolla en restos florales senescentes que pueden permanecer adheridos al fruto hasta la cosecha (zona calicinal) y durante el almacenamiento de los frutos en poscosecha (Sutton *et al.*, 2014). Las conidias en el campo son dispersadas por el viento, por el salpicado y escurrimiento producto de precipitaciones, pero durante almacenaje (poscosecha) se dispersa por contacto de fruto enfermo y fruto sano, y por el agua utilizada en los plantas de embalaje de manzanas (Latorre, 2018). La geminación de las conidias es influenciada por la presencia de agua libre o alta humedad relativa, condiciones clave para la germinación y desarrollo de la infección. Existe un amplio rango de condiciones de temperatura y humedad para el desarrollo de la infección por *Botrytis*, siendo la temperatura óptima entre 15–20 °C y humedad relativa sobre el 90%, por al menos 4 horas, las que favorecen mayormente el desarrollo del hongo; también afecta el agua libre residual proveniente de las labores propias de la selección y embalaje en poscosecha (Latorre, 2004). Las infecciones se pueden desarrollar durante el almacenamiento a 0°C, mostrando la capacidad de *B. cinerea* de crecer a 0°C en poscosecha. El hongo *B. cinerea* no solo puede invadir la zona calicinal del fruto sino también la zona pedúncular durante la cosecha (Sutton *et al.*, 2014).

Las particularidades morfológicas del hongo, tales como la forma del micelio, tamaño de conidias, conidióforos, y esclerocios, son vitales para la identificación y caracterización de especies de *Botrytis* (Beever y Weeds, 2004). En condiciones de *in vitro*, *B. cinerea* desarrolla inicialmente micelio hialino, para luego tornarse gris, en medio de cultivo agar papa dextrosa (APDA) y otros medios de cultivo, llegando a un diámetro de 6 cm o más en 10 días a 20°C (Elad *et al.*, 2007).

Las conidias (estructuras reproductivas asexuales) son unicelulares, hialinas, ligeramente coloreadas, de borde lisos, y formas ovoides a elipsoides, que generalmente miden entre 6-102 x 7,5-14 μm (Sutton *et al.*, 2014). Las conidias se forman desde conidióforos que son erectos (aéreos), libres y ramificados, produciendo las conidias tipo racimos (Latorre, 2004; Sutton *et al.*, 2014).

En ocasiones el patógeno forma esclerocios aplanados e irregulares, hemisféricos de color negro, que se desarrollan sobre o debajo de la epidermis del tejido infectado. Los esclerocios son las principales estructuras de resistencia de *B. cinerea*, los cuales tienen morfología plano-redondeadas cuyas dimensiones oscilan entre 1 y 15 mm de sección longitudinal dependiendo del aislado y las condiciones de cultivo como temperaturas extremas, humedad, exposición a la luz (Elad *et al.*, 2007). La sobrevivencia de *B. cinerea* es primordialmente por esclerocios y también como micelio asociados a restos de frutos enfermos que quedan en el suelo o en el árbol y en otros hospederos, incluyendo las malezas (Latorre, 2018).

2.4 Reportes de pudrición calicinal.

La enfermedad pudrición calicinal causada por *B. cinerea* es una de las principales enfermedades de pre y poscosecha que afecta a las manzanas a nivel mundial. Ha sido reportada como una enfermedad de importancia en manzanas en el estado de Washington (E.E.U.U), afectando tanto en pre y poscosecha, sobre todo en almacenamiento prolongado (Xiao y Kim, 2008). Estudios epidemiológicos en poscosecha, reportan la ocurrencia de *B. cinerea* atacando manzanas almacenadas en los países como Argentina, Brasil, Ecuador, España, Portugal y Uruguay (Mondino *et al.*, 2009). En el estado de Columbia Británica (Canadá), se han reportado ataques de *B. cinerea*, causando daños significativos en manzanas almacenadas, con impactos económicos principalmente en las empaquetadoras comerciales. *B. cinerea* cuando infecta a manzanas puede ser el patógeno dominante, aunque es posible que coexistao con otras especies como *B. mali* (Sholberg y Haag, 1996; Etebarian *et al.*, 2010).

En Chile, en el año 2004 la pudrición calicinal fue descrita por primera vez en frutos de manzana almacenadas, afectando principalmente a los cultivares Fuji, Gala y Granny Smith (Álvarez *et al.*, 2004). Recientemente, durante la temporada de cultivo 2015-2016, el Laboratorio de Patología Frutal de la Universidad de Talca, reportó por primera vez la presencia de frutos del cv. Cripps Pink con síntomas de pudrición calicinal causados por *B. cinerea* proveniente de tres huertos comerciales localizados en la Región del Maule (Yerbas Buenas, Longaví y San Clemente) con una incidencia a cosecha de 0,1 a 0,2%,

la que aumentó gradualmente hasta 2,0% después de 60 días de almacenamiento en frío convencional (Ferrada *et al.*, 2017).

2.5. Sintomatología y control de pudrición calicinal.

Los síntomas de pudrición calicinal incluyen una pudrición blanda acuosa, del color marrón claro a marrón oscuro, la que se inicia en el extremo calicinal, desde donde avanza hasta al interior del fruto alterando el color normal de la pulpa y en casos severos afectando toda la fruta, el tejido de la podredumbre es esponjoso o blando y no es fácil separarse del tejido sano, en ocasiones aparece micelio blanco grisáceo con un olor atípico en los frutos atacados. El ataque se hace evidente durante el período de almacenaje refrigerado prolongado alcanzando pérdidas alarmantes después de los dos meses a 0°C, la fruta atacada es fuente de inóculo de los frutos adyacentes provocando el efecto nido de los frutos (Pinilla y Álvarez, 2002; Latorre, 2004; Xiao y Kim, 2008).

El control de pudrición calicinal, es mediante la aplicación de productos químicos y prácticas culturales como el control de malezas, eliminación o frutos enfermos en el campo, mantener el suelo enriquecido de materia orgánica, hacer podas adecuadas creando ambiente de buena aireación entre las plantas, cosecha en tiempo oportuno, evitar daños de la fruta y garantizar la refrigeración inmediata de los frutos después de la cosecha (Sutton *et al.*, 2014).

Los fungicidas comúnmente utilizados para el control de *B. cinerea* en manzanas, son los ingredientes activos como fludioxonil pertenecientes al grupo de fenilpirroles (interfieren en la transducción de señal osmótica); ciprodinil y pirimetanil perteneciente al grupo de anilinopirimidinas (inhiben síntesis de la metionina); tiabendazole perteneciente al grupo de benzimidazoles (inhibe el ensamblaje de la β -tubulina afectando la división celular); captan perteneciente al grupo de phtalamidas (inhiben múltiples sitios), fenhexamida perteneciente al grupo de hidroxianilidas (inhibe la ketoreductasa en síntesis de la membrana), iprodione perteneciente al grupo de las dicarboximidias (interfieren en la transducción de señal osmótica); trifloxyestrobil y kresoxim-metil pertenecientes al grupo inhibidores de la quinona externa (QoI; inhiben el citocromo bc1, de la cadena transportadora de electrones en respiración celular) y fenbuconazole y tebuconazole pertenecientes al grupo inhibidores de la demetil esterasa (demethylation inhibitor, DMI; inhibidores de la biosíntesis de esteroides en la membrana celular) (Sholberg *et al.*, 2003; Latorre, 2004; Zhao *et al.*, 2010; FRAC-Code list, 2018).

La especie *B. cinerea* tiene alta variabilidad genética, lo que genera que presente un alto riesgo de resistencia a fungicidas en especial aquellos fungicidas que son de sitio específico en su acción (Leroux *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2018). Estudios de sensibilidad a fungicidas, han reportado la existencia de cepas resistentes a fungicidas como boscalid, pentiopirad, piraclostrobin y tiabendazol (Zhao *et al.*, 2010; Yin, *et al.*, 2011; Yin, *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2018).

En los Estados Unidos, habitualmente utilizan cuatro fungicidas para el control químico de *B. cinerea* en poscosecha: fludioxonil (Scholar 230SC), fludioxonil + difenoconazole (Academy 250SC), pirimetanil (Penbotec 400SC), y tiabendazole (Mertect 340F), los cuales son aplicados por inmersión o aspersion en línea del packing. Los fungicidas fludioxonil y pirimetanil fueron registrados en los Estados Unidos en el 2004 para el control del moho gris y moho azul en poscosecha (Xiao y Boal, 2009). Además, carboxamidas, benzimidazoles o ziram son fungicidas utilizados para aplicaciones desde precosecha a dos semanas antes de la cosecha (Xiao, 2014).

A nivel nacional las estrategias de control químico utilizadas con éxito hasta el momento se han basado en el empleo de fungicidas químicos en la época de floración (periodo crítico), como es caso de fenbuconazole (360-480 g i.a./ha), pirimetanil (800 g i.a./ha), tebuconazole (300-450 g i.a./ha), trifloxyestrobil (75-100 g i.a./ha) (Latorre, 2004). En poscosecha de manzana están autorizados los fungicidas fludioxonil (Scholar 230 SC, 200-250 cc/100 L), pirimetanil (Penbotec 400 SC, 125-200 cc/100 L) y tiabendazol (Tecto 500 SC, 100-250 cc /100 L).

2.6. Caracterización morfológica de especies de *Botrytis*.

Tradicionalmente, las especies de *Botrytis* se han delimitado sobre la base de las características morfológicas (conidióforos, conidias) y culturales (patrón de crecimiento micelial, grado de esporulación) asociadas con la especificidad del hospedero donde se encuentra atacando (Jarvis, 1977). Si bien las características como tamaño y forma de conidias, conidióforos y esclerocios son útiles en la delimitación de algunas especies, muchas otras son morfológicamente similares y las condiciones de cultivo influyen significativamente en la variación (Beever y Weeds, 2004).

Elad *et al.*, (2007) señalan que el tamaño de conidias puede estar directamente relacionado con el número de núcleos que este tenga, el pH del medio, la relación C: N, los nutrientes del medio de cultivo, mientras que el crecimiento de los esclerocios puede estar influenciadas por la temperatura, pH y sustrato.

2.7. Caracterización molecular de *Botrytis*.

Por esto, los métodos tradicionales o de examinación visual, necesitan complementarse con técnicas de la biología molecular (Staats *et al.*, 2005). Distintos estudios moleculares señalan la identificación de nuevos aislados fungosos, los que en su mayoría corresponden a nuevas especies del género *Botrytis* (Zhang *et al.*, 2010a, 2010b; Li *et al.*, 2012; Lorenzini y Zapparoli, 2014; Ferrada *et al.*, 2016).

Las técnicas moleculares han sido utilizadas exitosamente para identificar y caracterizar de forma más rápida la diversidad genética de los agentes patógenos, posibilitando la distinción entre distintas especies (Moller *et al.*, 1992). Las tecnologías moleculares ofrecen muchas ventajas en comparación con los métodos de identificación tradicionales ya que estos son extremadamente sensitivos, rápidos y versátiles (Henson y French, 1993).

En este sentido, la reacción de cadena de polimerasa (PCR), facilita la síntesis del ADN con el que un segmento particular de este es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de partidores que lo flanquean con la cual es posible obtener millones de copias del ADN molde. Para aplicar esta técnica es necesario optimizarla para cada uno de los estudios a realizar, siendo el parámetro más crítico, la elección correcta de los partidores (White y Taylor, 1990).

De forma similar, los análisis filogenéticos generan información necesaria y con precisión para el estudio de la evolución genética de los fitopatógenos o las relaciones existentes entre ellos y se alcanza una resolución correcta de las características de una especie en estudio (Li *et al.*, 2012).

En estudios anteriores, basados principalmente en técnicas moleculares, se han utilizado genes nucleares para caracterizar la diversidad genética de las especies de *Botrytis*, como es el caso de los genes nucleares gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), proteína de choque térmico 60 (HSP60), y la subunidad II de ARN polimerasa dependiente de ADN (RPB2) utilizados para la identificación de nuevas especies de *Botrytis* (Zhang *et al.*, 2010 b; Li *et al.*, 2012).

La coexistencia simpátrica y la complejidad entre *Botrytis* spp., fue reportada en distintos estudios, donde algunas de las cuales son especies crípticas recientemente descritas (Fournier *et al.*, 2005; Johnston *et al.*, 2014; Lorenzini y Zapparoli, 2014; Ferrada *et al.*, 2016). De forma similar, estudios mediante técnicas moleculares en aislados procedentes en frutillas, revelaron que las especies *B. mali* y *B. cinerea*, ambos genotipos coexistían, a pesar de que *B. mali* fue previamente descrita en varios hospederos

incluyendo manzanas, pero nunca atacando a la frutilla (O' Gorman *et al.*, 2008), aunque recientemente *B. mali* fue descrita atacando a la frutilla (Dowling y Schnabel, 2017). Walker *et al.*, (2010), propusieron una nueva especie de *Botrytis* (*B. pseudocinerea*) que se encuentra simpátricamente con *B. cinerea* (*sensu stricto*). Además de la identificación de la nueva especie de *B. californica*, coexistiendo simpátricamente con *B. cinerea* en arándano y uva de mesa (Saito *et al.*, 2016).

La diversidad de especies de *Botrytis* podría tener implicaciones epidemiológicas importantes en la definición de estrategias de control o gestión de un estudio etiológico. La descripción detallada de caracteres y el rango de hospederos de un aislado, mejoraría la comprensión de los principales aspectos investigativos del patógeno. De igual modo, en un estudio de aislados de *B. cinerea*, fue identificado un aislado taxonómicamente distinto de otros aislados. El proceso de (PCR) con partidores específicos de *B. cinerea* resultó negativo, y la morfología diferente en agar papa dextrosa. El análisis de secuencia comparativa de tres genes (G3PDH, HSP60 y RPB2) indicó un taxón relacionado con *B. aclada*, distante de *B. cinerea*. El árbol filogenético de máxima parsimonia construido con genes (NEP) estaba de acuerdo con el árbol construido con secuencias (G3PDH, HSP60 y RPB2), de igual forma el mismo aislado identificado como (B83) indicaba morfología similar a *B. aclada*, pero su rango de hospederos indicaba que es polífago como *B. cinerea*, aunque con baja virulencia (Lorenzini y Zapparoli, 2014).

3. BIBLIOGRAFÍA.

- Acuña, R. 2010. Compendio de Bacterias y Hongos de Frutales y Vides en Chile. Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 150 pp.
- Álvarez M., Pinilla B. y Herrera G. 2004. Enfermedades del Manzano. Instituto de Investigación Agropecuaria, INIA Ministerio de Agricultura. Colección de libros INIA N°10. 71 p.
- Beever, R. E., and Weeds, P. L. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. Pages 29-52 in: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands.
- Dowling, M. E., and Schanbel, G. 2017. First report of *Botrytis mali* causing gray mold on strawberry in the United States. *Plant Disease* 101:1034-1034.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P and Delen, N. 2007. *Botrytis* spp. and diseases they cause in Agricultural systems. En: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Ed. Springer. Netherlands. p 412.
- Elad, Y., and A. Stewart. 2004. Microbial Control of *Botrytis* spp. Pages 223-241. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen (eds.). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 428 pp.
- Elfar, K, Zoffoli, J. P., and Latorre, B. A. 2018. Identification and characterization of *Alternaria* species associated with moldy core of apple in Chile. *Plant Disease* 102:2158-2169.
- Etebarian, R. H., O’Gorman, D. T., and Sholberg, P. L. 2010. Relative virulence of *Botrytis cinerea* and *B. mali* in apple lesions. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2010- 0920-01-RS.
- FAOSTAT, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistic Division. Disponible en <https://es.actualitix.com/pais/wld/manzana-paises-productores.php>. Consultado el 10 de junio de 2018.
- Ferrada, E.E., Lolas, M., Pacheco, C.V., and Díaz, G.A. 2017. Occurrence of severe outbreak of calyx-end rot associated with *Botrytis cinerea* in *Malus x domestica* cv. Cripps Pink during harvest in the Maule region, Chile. *Plant Disease* 101:2149-2149

- Ferrada, E.E., Latorre, B. A., Zoffoli, J. P., and Castillo, A. 2016. Identification and characterization of Botrytis blossom blight of Japanese plums caused by *Botrytis cinerea* and *B. prunorum* sp. nov. in Chile. *Phytopathology* 106:155-165.
- Fournier, E., T. Giraud, C. Albertini, and Y. Brygoo. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97:1251-1267.
- FRAC-Code list, 2018. Fungicides sorted by mode of action. Disponible en www.frac.info. Consultado el 9 de julio de 2018.
- Henson, J. M., and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:81-109.
- Hu, M-J, Dowling, M. E., and Schnabel, G. 2018. Genotypic and Phenotypic Variations in *Botrytis* spp. Isolate from Single Strawberry Flowers. *Plant Disease* 2018 102:179184.
- Johnston, P.R., K. Hoksbergen, D. Park, and Beever, 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.
- arvis, W. R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species; taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph No. 15, Canadian Department of Agriculture, Ottawa.
- Latorre, B. A. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta Ed. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. 638 p.
- Latorre, B. A. 2018. Compendio de las enfermedades de las plantas. Primera Ed. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 733 p.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F. 2002 Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag Sci.* 58:876-88.
- Li, X. P., Kerrigan, J., Chai, W. X., and Schnabel, G. 2012. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104:650-658.

- Lorenzini, M., and Zapparoli, G. 2014. An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. *Plant Pathology* 63:1326-1335.
- Mondino, P.; Di Masi, S.; Falconí, C.; Montealegre, J.; Henríquez, J.L.; Nunes, C.; Salazar, M.; Stadnik, M; Vero, S., and Usall, J. 2009. Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha. Departamento de Publicaciones. Fagro. Montevideo 67p.
- Moller, EM, Bahnweg, G, Sandermann, H, and Geiger, HH. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res* 20:6115–6116.
- ODEPA, 2017. Superficie Plantada Nacional, Regional, Número De Huertos e Infraestructura Frutícola. Disponible en <http://www.odepa.cl/catastros-de-superficie-fruticola-regional/> Consultado el 19 de junio del 2018.
- ODEPA, 2013. Catastros de superficie frutícola regional. Oficina de Estadísticas y Planificación, ODEPA. Gobierno de Chile, Santiago, Chile. Disponible en <http://odepa.cl/catastros-de-superficiefruticolaregional/>. Consultado el 5 de mayo del 2018.
- ODEPA, 2011. Análisis y precios de mercados agropecuarios. Situación regional de las variedades de manzanos. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl>. Consultado el 6 abril del 2018.
- O’Gorman, D.T, Sholberg, P.L., Stokes, S. C, and Ginns, J. 2008. DNA sequence analysis of herbarium specimens facilitates the revival of *Botrytis mali*, a postharvest pathogen of apple. *Mycologia* 100:227–235.
- Pinilla B. y Álvarez M. 2002. Estudios Epidemiológicos De La “Pudrición Calicinal” De Las Pomáceas Causadas Por *Botrytis cinerea*. XI Congreso Nacional de Fitopatología Resúmenes. Santa Cruz, Chile. p.47
- Saito, S., Margosan D, Michailides T.J., & Xiao C.L. 2016. *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. *Mycologia* 108:330-43

- Soto-Alvear, S., Lolas, M., Rosales, I. M., Chávez, E.R., and Latorre, B. A. 2013. Characterization of the bull's eye rot of apple in Chile. *Plant Disease* 97:485-490.
- Staats, M., van Baarlen, P., and van Kan, J. A. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22:333-346.
- Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Agnello, A. M. and James F. 2014. *Compendium of Apple and Pear Diseases and Pest*. Second Edition. The American Phytopathological Society, Minnesota, MN. 343 p.
- Sholberg, P. L., Bedford, K. E., and Stokes, S. 2003. Effect of preharvest application of cyprodinil on postharvest decay of apples caused by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 87:1067-1071.
- Sholberg, P. L., and Haag, P. D. 1996. Incidence of postharvest pathogens of stored apples in British Columbia. *Can. J. Plant Pathol.* 18:81-85.
- Xiao, C. L. 2014. Gray mold. Pages 77-78. In: *Compendium of Apple and Pear Diseases and Pests*, 2nd edition, T. B. Sutton, H. S. Aldwinckle, A.M. Agnello, and J.F. Walgenbach, Ed. APS Press, St. Paul, MN. 218 p.
- Xiao, C. L., and Boal, R. J. 2009. Residual activity of fludioxonil and pyrimethanil against *Penicillium expansum* on apple fruit. *Plant Disease* 93:1003-1008.
- Xiao, C. L., and Kim, Y. K. 2008. Postharvest fruit rots in apples caused by *Botrytis cinerea*, *Phacidiopycnis washingtonensis*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. Online. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2008-0919-01-DG.
- Walker AS, Gautier A, Confais J, Martinho D, Viaud M, Pêcheur PL, Dupont J, and Fournier E. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101:1433–1445.

- White, T.; Bruns, s. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: Innis, M.; White, T. y Sninsky, J. (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. E.E.U.U, Academic Press. pp: 315-322.
- Yin, Y. N.; Kim, Y. K.; and Xiao, C. L.2012. Molecular characterization of pyraclostrobin resistance and structural diversity of the cytochrome *b* gene in *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 102:315-322 p.
- Yin, Y. N., Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101:986-995.
- Zhang, J., Wu, M. D., Li, G. Q., Yang, L., Yu, L., Jiang, D. H., Huang, H. C., and Zhuang, W. Y. 2010a. *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. *Mycologia* 102:1114-1126.
- Zhang, L., Zhou, Y. J., Li, G. Q., Yang, L., Jiang, D. H., Zhuang, W. Y., and Huang, H. C. 2010b. *Botrytis sinoallii*, a new species of the gray mold pathogen on *Allium* crops in China. *Mycoscience* 51:421-431.
- Zhao, H., Kim, Y. K., Huang, L., and Xiao, C. L. 2010. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biology and Technology* 56:12-18.

CAPITULO 2

Identificación y caracterización de aislados de *Botrytis cinerea* obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal cvs. Cripps Pink y Fuji.

Este capítulo será enviado para publicación en la revista European Journal of Plant Pathology

CAPITULO 2.

Identificación y caracterización de aislados de *Botrytis cinerea* obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal cvs. Cripps Pink y Fuji.

Juma F. Biche¹, Enrique E. Ferrada², Gustavo A. Lobos³ y Gonzalo A. Díaz¹

¹Laboratorio de Patología Frutal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Talca, Chile.

²Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

³Plant Breeding and Phenomic Center, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Chile.

Resumen

Botrytis cinerea Pers., agente causal de la enfermedad pudrición calicinal, ataca el cultivo de manzanos en precosecha, cosecha y poscosecha, reduciendo la producción y la calidad de las manzanas. Por ejemplo, reportes de esta enfermedad en el cultivar Cripps Pink indican una incidencia a cosecha de 0,1 a 0,2%, aumentando hasta 2% después de 60 días de almacenamiento en frío convencional. En este estudio, se caracterizaron cultural, morfológica y molecularmente aislados del género *Botrytis* obtenidos desde flores atizonadas y frutos con pudrición calicinal de distintos cultivares. Para este propósito, los diez aislados extraídos por órgano fueron clasificados en baja y alta esporulación en medio de cultivo agar papa dextrosa (APD), según la morfología de las colonias. Los parámetros morfológicos evaluados fueron forma y tamaño de conidias y conidióforos en medio de cultivo agar arveja y producción de esclerocios en APDA. Los mismos aislados se caracterizaron molecularmente mediante amplificación de ADN y secuenciación de los genes gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), proteína de choque térmico (HSP60) y ARN polimerasa subunidad II dependiente de ADN (RPB2). Se realizaron pruebas de patogenicidad en los cultivares Braeburn, Cripps Pink, Fuji, Gala Premium, Granny Smith, Modi, Red Chief, Scarlette. La caracterización morfológica indica que todos los aislados corresponden al género *Botrytis*. La identificación molecular y filogenética confirmó la identificación de los aislados en estudio, los cuales se agruparon en un grupo junto a aislados de referencia de *B. cinerea*. Las pruebas de patogenicidad resultaron positivas en todos los cultivares evaluados. Esta investigación es la primera mención sobre la identificación y caracterización de *B. cinerea* en precosecha y cosecha en la Región de Maule, Chile.

Key words: Calyx end-rot, apple fruit, *Botrytis cinerea*.

Introducción

El manzano (*Malus x domestica* Borkh.), corresponde a uno de los frutales de mayor producción en el mundo. China, Estados Unidos, Turquía, Italia y Polonia, representan el 65 % de la producción mundial (FAOSTAT, 2016). Chile, es el principal país productor de manzanas del hemisferio Sur, con una superficie de 37.297 ha, de las cuales el 87% se concentra entre las Regiones del Maule y del Libertador Bernardo O'Higgins (61 y 26 %, respectivamente; ODEPA, 2017).

Distintas enfermedades fúngicas afectan a los manzanos en todo el mundo, causando lesiones tanto en la planta como en la fruta. En Chile, destacan las enfermedades fungosas que afectan al follaje, frutos, tronco y brazos como la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), cancro europeo del manzano (*Neonectria ditissima*) y canchris de la madera (*Botryosphaeria dothidea*) (Latorre, 2004). En frutos, las más importantes son la pudrición calicinal (calyx-end rot) asociada a *Botrytis cinerea* (Sutton *et al.*, 2014; Ferrada *et al.*, 2017; Latorre, 2018), corazón mohoso (moldy core) asociada a especies de *Alternaria* (Elfar *et al.*, 2018), ojo de buey (bull's eye rot) causado por *Neofabraea vagabunda* (Henríquez, 2005; Soto-Alvear *et al.*, 2013) y moho azul del fruto causado por *Penicillium expansum* (Latorre, 2004).

Botrytis cinerea Pers., el agente causal de la pudrición calicinal en manzanas, es un hongo fitopatógeno, necrótrofo, que ataca a más de 200 especies de plantas, destacándose las destinadas a producción hortícola, frutícolas, y numerosas plantas silvestres, principalmente dicotiledóneas (Elad *et al.*, 2007). Los síntomas de la pudrición calicinal se caracterizan por lesiones blandas y acuosas, de color marrón claro a oscuro, iniciándose en el extremo calicinal, avanzando hasta al interior del fruto, alterando el aspecto normal de la pulpa (Pinilla y Álvarez; 2002; Latorre, 2004; Ferrada *et al.*, 2017). La infección, la que ocurre en el campo cercano a la época de la floración, es favorecida por ambientes con temperaturas entre 15 y 22 °C y alta humedad relativa (> 90 %), por un lapso de cuatro horas o más. Hasta la cosecha y almacenamiento de la fruta, el hongo se desarrolla en los restos florales senescentes adheridos en la zona calicinal del fruto (Latorre, 2004; Sutton *et al.*, 2014).

En Chile, existen escasos antecedentes bibliográficos sobre el desarrollo de esta enfermedad. Durante la cosecha de la temporada 2015-2016, huertos comerciales de la Región del Maule (Yerbas Buenas, Longaví y San Clemente) reportaron un severo brote de la enfermedad causada por *B. cinerea* en frutos del cultivar Cripps Pink, con una incidencia del 0,1 a 0,2 %, la que aumentó hasta 2 % después de 60 días de almacenamiento en frío convencional (Ferrada *et al.*, 2017). Sumado a lo anterior, en los últimos años, distintos autores han determinado nuevas especies de *Botrytis* asociados a diversos hospederos (Durga y Dinesh, 2009; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b; Walker *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Grant-

Downton *et al.*, 2014; Saito *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Garfinkel *et al.*, 2017; Rupp *et al.*, 2017), mediante análisis molecular de los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 (Staats *et al.*, 2005). En Chile, se identificó *B. prunorum* junto a *B. cinerea* en flores de ciruelo (*Prunus salicina*), causando tizón de flor (Ferrada *et al.*, 2016).

En relación con lo anteriormente expuesto, el objetivo de este estudio fue caracterizar cultural, morfológica, patogénica y molecularmente las especies de *Botrytis* obtenidas desde flores con síntomas de tizón floral y frutos con pudrición calicinal en manzanas de distintos cultivares, en la Región de Maule.

Materiales y métodos

Aislamientos. Flores con síntomas de atizonamiento y frutos con pudrición calicinal de manzanas ‘Cripps Pink’ y ‘Fuji’, fueron recolectados durante la temporada 2016-2017, desde huertos comerciales de la Región del Maule, localizados en las comunas de San Clemente, Fundo Los Lirios; Longaví, Fundo Manzanares y Yervas Buenas, Fundo Esmeralda (Cuadro 1). Adicionalmente, desde el cultivar Granny Smith se colectaron flores que fueron incluidas en este estudio. Las flores y los frutos fueron transportados al Laboratorio de Patología Frutal de la Universidad de Talca (Talca, Chile) para el posterior aislamiento de los aislados fúngicos obtenidos.

Cuadro 1. Aislados de *Botrytis* obtenidos en la Región de Maule en el presente estudio.

Aislado	Cultivar	Estructura	Localidad	Precipitación (mm)	Coordenadas Geográficas
Bci-A1	Fuji	Frutos	San Clemente	511	35°33'S y 71°29'O
Bci-A2	Fuji	Frutos	San Clemente	511	35°33'S y 71°29'O
Bci-A3	Fuji	Frutos	Longaví	734	35°58'S y 71°41'O
Bci-A4	Fuji	Frutos	San Clemente	511	35°33'S y 71°29'O
Bci-A5	Pink Lady	Frutos	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A6	Pink Lady	Frutos	Longaví	734	35°58'S y 71°41'O
Bci-A7	Pink Lady	Frutos	Longaví	734	35°58'S y 71°41'O
Bci-A8	Fuji	Frutos	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A9	Fuji	Frutos	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A10	Pink Lady	Frutos	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A21	Pink Lady	Flores	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A22	Pink Lady	Flores	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A23	Granny Smith	Flores	Itahue	537	35°02'S y 71°41'O
Bci-A24	Fuji	Flores	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A25	Fuji	Flores	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A26	Pink Lady	Flores	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A27	Fuji	Flores	Panguilemo	511	35°22'S y 71°35'O
Bci-A28	Pink Lady	Flores	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A29	Pink Lady	Flores	Yervas Buenas	734	35°45'S y 71°35'O
Bci-A30	Granny Smith	Flores	Itahue	537	35°02'S y 71°41'O

Caracterización cultural. La caracterización cultural se realizó en placas Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa acidulado (APDA, 2 %) con 92 % de ácido láctico (Díaz *et al.*, 2016). Para este propósito, 20 aislados fueron repicados e incubados a 20 °C durante 7 d en régimen de luz y oscuridad de 12 h. La parametrización de esta clasificación (cuantificación del grado de esporulación, conidias cm⁻²) se realizó en placas Petri de 9 cm de diámetro con los siguientes medios de cultivo: i) agar papa dextrosa acidulado (APDA); ii) agar arveja dextrosa (AAD): 160 g de arvejas, agua destilada hasta 1000 ml, pH ajustado a 6,0 con HCl, 5 g de dextrosa, 25 g de agar; y iii) medio B de king (MBK): 1,5 g de K₂HPO₄ 3H₂O, 1,5 g MgSO₄·7H₂O, 10 ml de glicerol, 17 g de peptona, 15 g de agar por litro de agua destilada, incubadas a 20 °C con un régimen de 12:12 h de luz y oscuridad por 14 d (Li *et al.*, 2012; Ferrada *et al.*, 2016). Para determinar el grado de esporulación, cada placa se inundó con 10 ml de Tween 80 al 0.05% y la concentración de conidias en el Tween 80 se determinó utilizando un hemocitómetro bajo microscopio óptico (aumento 10x).

Caracterización morfológica. Los parámetros fenotípicos evaluados para los aislados de *Botrytis* obtenidos fueron morfología de conidias (n=40) y conidióforos (n=10), en medio de cultivo AAD. Las placas fueron incubadas durante 7 d a 20 °C (Li *et al.*, 2012; Ferrada, *et al.*, 2016). La producción de esclerocios (n=40) se determinó en medio de cultivo APDA, utilizando 120 placas las que se repicaron en triplicado, incubadas a 20 °C durante 10 d en régimen de completa oscuridad; posteriormente fueron repartidas en dos grupos, donde 60 placas se mantuvieron a 20 °C durante 30 d en régimen de oscuridad continua, y las 60 placas restantes fueron incubadas a 5 °C durante 30 d en régimen de oscuridad. Después de transcurrido 40 d del ensayo, se procedió a medir el tamaño de los esclerocios (mm), horizontal y verticalmente utilizando el medidor pie de metro (Ferrada *et al.*, 2016).

Caracterización molecular. La extracción del ADN de los 20 aislados obtenidos se realizó utilizando colonias de 7 d de crecimiento en medio de cultivo APDA. Para la obtención de ADN genómico puro, se procedió de acuerdo con el protocolo del kit de extracción Plant Genomic DNA Miniprep (SigmaAldrich, MO, USA). El ADN extraído de los 20 aislados, se amplificó mediante el proceso de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para los genes G3PDH, HSP60, RPB2, utilizando los partidores G3PDHfor/rev, HSP60for/rev, y RPB2for/rev (Staats *et al.*, 2005). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Thermo Fisher Scientific, Veriti™ 96-Well, Singapore). Cada reacción contenía 6 µl de buffer; 2,4 µl de dNTP de 10mM, 12 µl de cada partidor, 24 µl de Mg⁺ de 25mM, 1,56 µl de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 164,4 µl de H₂O UL y 2 µl de ADN. El patrón de termociclado fue

el mismo descrito por Staats *et al.* (2005), modificado por Ferrada *et al.* (2016), en donde el alineamiento fue de 55 °C para G3PDH, 54,3 °C para HSP60 y 49 °C para RPB2. La integridad de la amplificación del producto de PCR se determinó mediante gel de agarosa al 2 % en Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X), teñido con RedGel (Biotium Inc., Hayward, Canadá) mediante una fuente de poder de accionada con la corriente eléctrica (60 v x 60 min). La visualización de la migración de los productos PCR obtenidos fue mediante un transiluminador con fuente de luz UV modelo (ECX-26.M de 312 nm, Germany).

Los productos PCR confirmados fueron purificados y secuenciados por la empresa Macrogen, Geumcheon-gu, Corea del Sur). Las secuencias fueron editadas usando el software ProSeq v.2.91 (Oxford University, UK, Oxiford) y alineadas usando Clustal X 2.0 (Conway Institute, DU, Irlanda). Se realizó una búsqueda en BLAST con las secuencias de los aislados de *B. cinerea* en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Se consideró una identidad a nivel de especie entre un rango de 99 a 100% de similitud con las especies depositadas en la base de datos del GenBank.

Análisis filogenético. El análisis filogenético se realizó utilizando el software MEGA 7 Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Biodesign Institute, Arizona State University, USA (Tamura *et al.*, 2011). Las brechas en las secuencias fueron consideradas como carácter de robustez. Se utilizó la prueba de máxima parsimonia (MP) para todos los análisis, con opción de búsqueda heurística y 1000 repeticiones de secuencias como soporte de calidad ('bootstrap'). Los soportes utilizados fueron: longitud del árbol (tree length, TL), índice de consistencia (consistency index, CI), índice de retención (retention index, RI) e índice de composición (composite index, RC). Las secuencias de las especies *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilinia fructigena* se utilizaron como secuencia de especies fuera de grupos ('outgroups') para enraizar los árboles filogenéticos.

Pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en frutos con madurez de cosecha y aparentemente sanas, de los cultivares Braeburn, Cripps Pink, Fuji, Gala Premium, Granny Smith, Red Chief, Modi, Scarlette; sólidos solubles totales (SST) de 14,2, 14,6, 13,8, 13,3, 14,1, 13,3, 13,1 y 12,8 °Brix, respectivamente. Los frutos fueron desinfectados superficialmente con etanol (75 %) durante 30 s, seguido de inmersión en hipoclorito (NaClO) al (0,5%) por 2 min, enjuagando con agua destilada estéril durante 1 min y secando por 2 min a temperatura ambiente (20 °C). El inóculo consideró un disco de agar con micelio en activo crecimiento (7 d), obtenido desde aislados creciendo en placas Petri con medio de cultivo APDA. El inóculo se depositó en el medio de la zona ecuatorial del fruto, sobre la herida provocada con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro. Posterior a la inoculación, la lesión se cubrió con parafilm (Bemis, USA), para mantener la humedad necesaria. Cada uno de los 20 aislados se inóculo

una vez por fruto considerando cinco repeticiones por cultivar utilizando, más un testigo inoculado con agar estéril.

La incubación de las manzanas se realizó a 20 °C, durante 7 d en un régimen de 12 horas de luz / oscuridad, utilizando un embalaje comercial de manzana de dimensiones 50 x 30 x 30 cm. Las evaluaciones consistieron en medir el avance de la lesión horizontal y verticalmente en mm, además de caracterizar las lesiones producidas (color, forma y tamaño). De los frutos inoculados se realizó un nuevo aislamiento en medio de cultivo APDA para dar cumplimiento a los postulados de Koch.

Diseño experimental y análisis estadístico. Para el ensayo de esporulación los valores en conidias cm^{-2} por aislado fueron sometidos a un análisis no paramétrico (kruskal-walls), factor aislados x factor medios de cultivo (10 x 3), considerando la placa Petri como unidad experimental. Sin embargo, para el ensayo de prueba de patogenicidad los valores de lesión (mm) de los frutos fueron sometidos a un análisis no paramétrico (kruskal-walls), factor aislados x factor variedad (10 x 8). Las medias se separaron mediante comparaciones de rango múltiple HSD de Tukey ($P < 0,05$), a través del programa estadístico Statgraphics Centurion XVI 16.1.11 (StatPoint Technologies Inc Virginia, E.E.UU).

Resultados

Caracterización cultural y morfológica. En los 20 aislamientos de *Botrytis* fue posible encontrar, desde aislamientos sin esporulación hasta altamente esporulados y desde aquellos que no formaron esclerocios hasta otros con alta producción de estructuras de resistencia. Según la morfología de las colonias en medio de cultivo APDA, los aislados fueron clasificados visualmente como de baja esporulación y alta esporulación (Fig. 1). Los aislados de alta esporulación tenían colonias de color blancas a grises en medios de cultivo APDA, KMB y AAD. A su vez, los aislados de baja esporulación tenían colonias blanco crema, de micelio aéreo floculado, acolchado, y con escasa producción de conidias. En función de las características culturales y morfológicas, los aislados tenían una variabilidad fenotípica, particularmente en la morfología de las colonias, grado de esporulación y capacidad de producción de esclerocios.

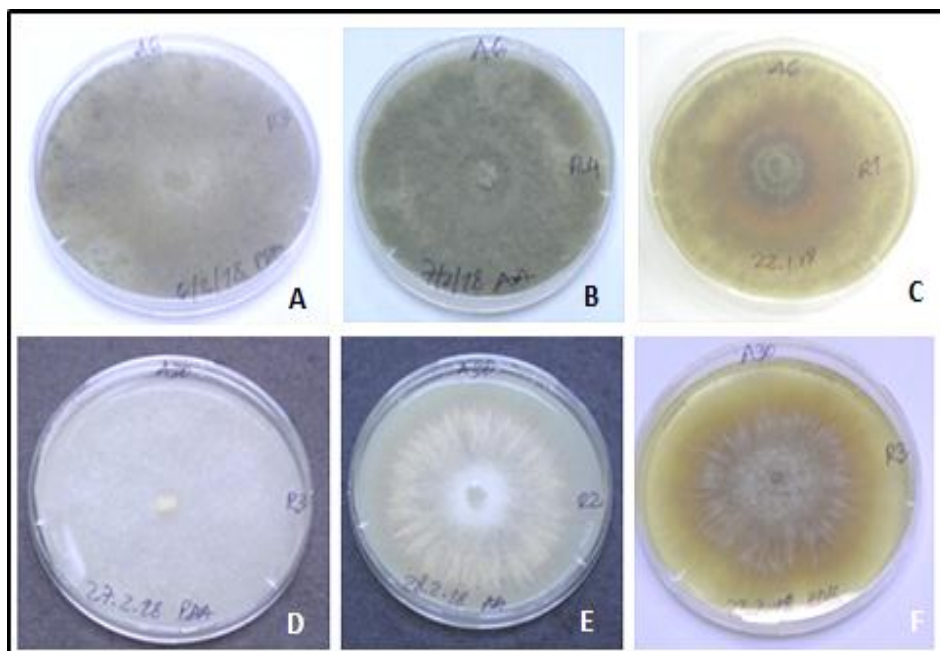


Figura 1. Características culturales de colonias de *Botrytis* incubadas a 20°C, durante 7 días bajo un régimen de 12 horas luz /12 horas oscuridad: i) aislado de alta esporulación **Bci-A6** en medios de cultivo APDA, AAD y KMB (A-C, respectivamente); y ii) aislado de baja esporulación **Bci-A30** en medios de cultivo APDA, AAD y KMB (D-F, respectivamente).

En aislados de flores y frutos, la composición de los medios de cultivo afectó significativamente la producción de conidias, con diferencias significativas en los factores aislado y medio de cultivo ($P < 0,05$), y tanto en los aislados provenientes de flores como de frutos hubo una interacción significativa de los factores aislados y medios de cultivo ($P < 0,05$). Los aislados provenientes de flores y frutos, en promedio, presentaron una mayor producción de conidias en medio de cultivo AAD (99,4 y 134,6 conidias cm^{-2} , respectivamente) que en KMB (7,56 y 8,16 conidias cm^{-2} , respectivamente) y APDA (2,25 y 13,8 conidias cm^{-2} , respectivamente) (Cuadro 2; Figs. 2 y 3).

Un total de seis aislados de flores Bci-A21, Bci-A22, Bci-A23, Bci-A24, Bci-A25, Bci-A29 presentaron alta producción de conidias, con más de 100 conidias cm^{-2} en AAD, mientras que los cuatro aislados Bci-A26, Bci-A27, Bci-A28, Bci-A30 presentaron baja producción con menos de 100 conidias cm^{-2} en la placa de Petri (Fig. 2). Por su parte, un total de siete aislados de frutos Bci-A1, Bci-A4, Bci-A5, Bci-A6, Bci-A8, Bci-A9, Bci-A10 presentaron alta producción de conidias con más de 100 conidias cm^{-2} , existiendo tres aislados Bci-A2, Bci-A3, Bci-A7 que presentaron una baja producción de conidias con menos de 100 unidades cm^{-2} (Fig. 3).

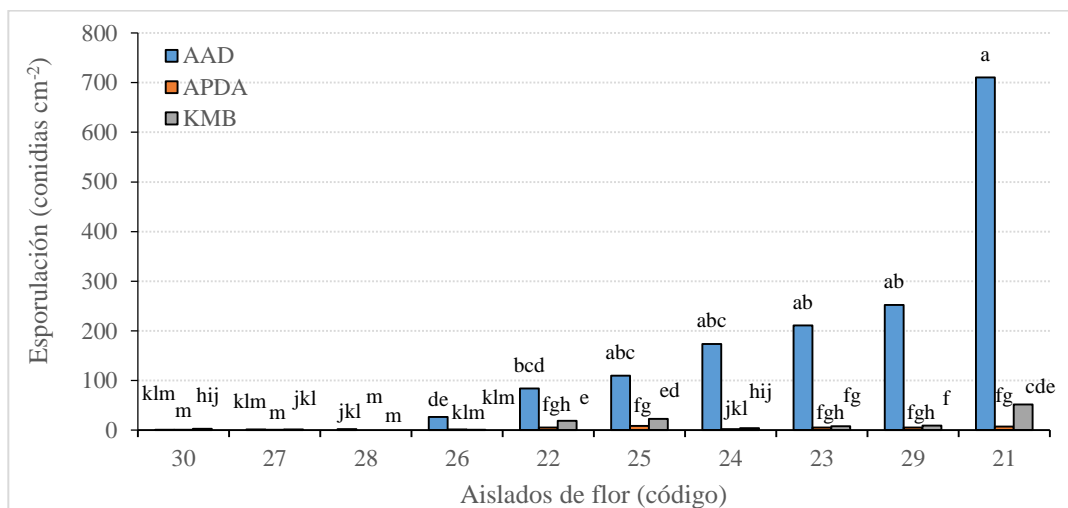


Figura 2. Esporulación (conidias cm⁻²) de 10 aislados de flor de manzano con *B. cinerea*, incubados en tres medios de cultivo (APDA, MKB y AAD) por 7 d a 20 °C.

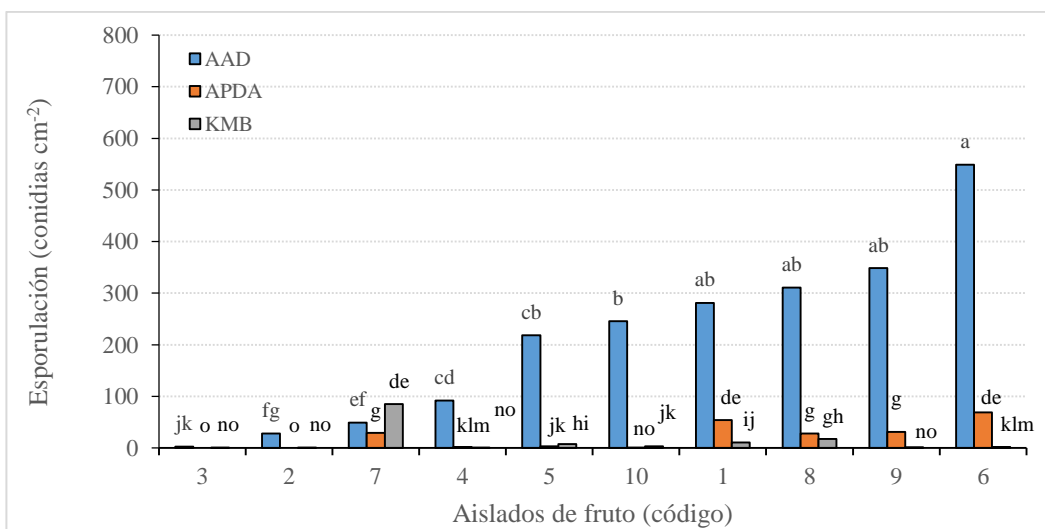


Figura 3. Esporulación (conidias cm⁻²) de 10 aislados de fruto de manzano con *B. cinerea*, incubados en tres medios de cultivo (APDA, MKB y AAD) por 7 d a 20 °C.

Caracterización morfológica. Generalmente las conidias eran elipsoides ovoides, hialinas, de paredes lisas, entre 4,6 - 8,3 μm de ancho y 5,7 - 12,8 μm de largo en aislados de flores, y de 4,3 - 8,5 μm de ancho y 5,7 - 12,9 μm de largo en aislados de fruto (Fig. 4, Cuadro 2). Los conidióforos eran erectos, de paredes gruesas y lisa, subhialinos, septados, ramificados en la parte distal, con ápices hinchados y pequeños esterigmas, de

medidas promedio entre 10,9 μm de ancho y 896,4 μm de largo en aislados de flores, y 10,7 μm de ancho y 895,2 μm de largo en aislados de frutos (Fig. 4, Cuadro 2).

En cuanto a la producción de esclerocios, los aislados Bci-A1, Bci-A8, Bci-A9, Bci-A10 y Bci-A29, fueron capaces de producir esclerocios en medio de cultivo APDA a temperaturas de 5 y 20 °C. Los esclerocios (n=40) fueron seleccionados al azar en cada aislado, y medidos individualmente. Estas estructuras fueron de color negro y de forma irregular. La mayor producción de esclerocios provenientes de frutos se registró en los aislados Bci-A1, Bci-A8, Bci-A9 y Bci-A10, y correspondió entre 17,1 y 27,8 esclerocios cm^{-2} a temperaturas de 5 y 20 °C, respectivamente (Fig. 4, Cuadro 2). La menor producción de esclerocios se registró en el aislado Bci-A29 proveniente de flor, con promedios de 8,3 y 10,6 a temperaturas de 20 y 5 °C, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características morfológicas de los aislados de *B. cinerea*, según el origen del aislado.

Aspectos morfológicos ¹	Flor	Fruto
² APDA conidias cm^{-2}	2,3	13,8
³ KMB conidias cm^{-2}	7,6	8,2
⁴ AAD conidias cm^{-2}	99,4	134,6
Largo de conidias		
Media (μm)	11,0	10,7
Rango (μm)	5,7-12,8	5,7-12,9
Ancho de Conidias		
Media (μm)	7,8	8,0
Rango (μm)	4,6-8,3	4,3-8,5
Largo de conidióforos		
Media (μm)	896,4	895,2
Rango	329,0-1581,7	339,0-1583,0
Ancho de conidióforos		
Media (μm)	10,9	10,7
Rango	6,8-12,9	6,4-13,4
Producción de esclerocios		
Largo (mm) de esclerocios cultivados a 5 °C	5,1	5,3
Ancho (mm) de esclerocios cultivados a 5 °C	4,1	4,2
Largo (mm) de esclerocios cultivados a 20 °C	5,2	5,2
Ancho (mm) de esclerocios cultivados a 20 °C	4,2	4,1
Producción (unidades cm^{-2}) de esclerocios cultivados a 20 °C en APDA	8,3	27,8
Producción (unidades cm^{-2}) de esclerocios cultivados a 5 °C en APDA	10,7	17,1

¹Valores promedios de los 20 aislados de cada estructura, en los casos que corresponde. Medios de cultivo ²APDA= agar papa dextrosa acidulado, ³KMB= medio B de King, ⁴AAD=agar arveja dextrosa.

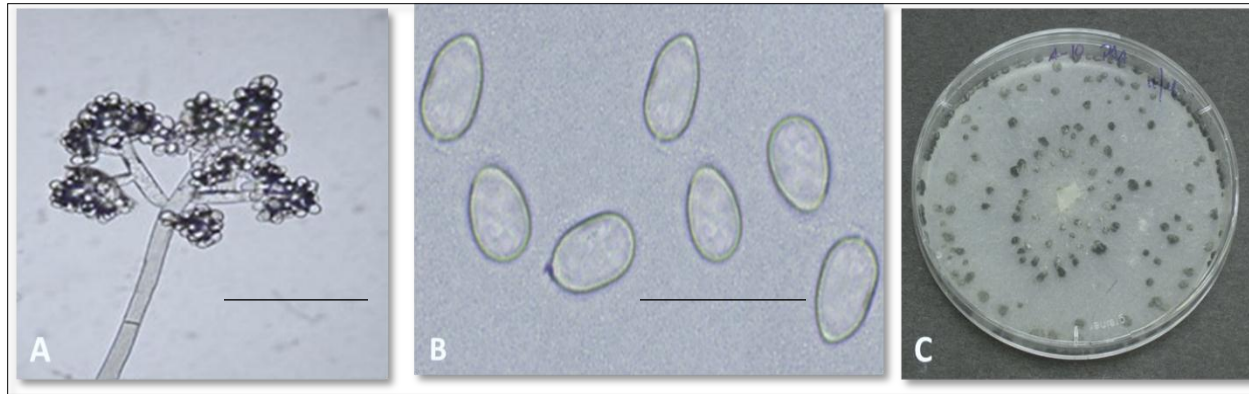


Figura 4. Conidióforo con producción de conidias en racimo (A), conidias hialinas y elipsoides (B) y esclerocios (C) de *B. cinerea* en medio de cultivo APDA. Bar = 100 μ m.

Caracterización molecular. Las regiones de los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 para los 20 aislados de *B. cinerea* fueron exitosamente amplificadas, obteniendo fragmentos de ADN de 886, 976 y 1093 bp, respectivamente. La búsqueda en BLAST de los fragmentos obtenidos con los partidores G3PDHfor+/G3PDHrev+, HSP60for+/HSP60rev+ RPB2for+/RPB2rev+ (Staats *et al.*, 2005) fueron entre 99 y 100% idénticos con secuencias de aislados tipo ('type') de *B. cinerea* (Cuadro 5).

Análisis filogenético. Las secuencias parciales de ADN obtenidas de los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 de especies de *Botrytis* previamente reportadas, *M. fructigena* y *S. sclerotiorum* (outgroups) fueron incluidas (n=84) para la construcción de tres diferentes árboles filogenéticos (Staats *et al.*, 2005; Durga y Dinesh, 2009; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b; Walker *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Grant-Downton *et al.*, 2014; Ferrada *et al.*, 2016; Saito *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Garfinkel *et al.*, 2017; Rupp *et al.*, 2017). En los tres árboles de máxima parsimonia obtenidos, todas las especies de *Botrytis* incluidas formaron un único y definido grupo de entre 95 a 99 % soporte ('bootstrap support'), los cuales se separan claramente de las especies *M. fructigena* y *S. sclerotiorum*. Los aislados de *Botrytis* de este estudio fueron agrupados en un mismo grupo ('cluster') junto a especies de referencia de *B. cinerea*, distante de las otras especies de *Botrytis* incluidas en los tres árboles filogenéticos obtenidos (Figura 5). Basado en el análisis MP, para G3PDH, HSP60 y RPB2, los árboles indicaron los siguientes índices: i) TL = 311, 428, 396, respectivamente; ii) CI = 0,554, 0,600, 0,598, respectivamente; iii) RI = 0,894, 0,910, 0,921, respectivamente; y iv) RC = 0,495, 0,546 and 0,551, respectivamente. Otras especies de *Botrytis* como *B. prunorum* y *B. caroliniana* fueron agrupadas separadamente.

Cuadro 5. Búsqueda en BLAST de la identidad (%) de secuencias de aislados de *B. cinerea* con respecto a cepas de referencia depositadas en GenBank.

Aislado	Genes					
	G3PDH		HSP60		RPB2	
	Identidad (%)	Cepa de Referencia	Identidad (%)	Cepa de Referencia	Identidad (%)	Cepa de Referencia
Bci-A1	100	B05.10	99, 100	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A2	100	B05.10	99	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A3	100	B05.10	99	Bc7	99	SAS56, B05.10
Bci-A4	100	B05.10	99	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A5	100	B05.10	99; 100	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A6	100	B05.10	99	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A7	99	B05.10	99; 100	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A8	100	B05.10	99; 100	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A9	100	B05.10	99; 100	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A10	100	B05.10; Bc7	99	Bc7; B05.10	100; 99	SAS56, B05.10
Bci-A21	100	B05.10	99; 100	Bc7; B05.10	100	SAS56, B05.10
Bci-A22	99	B05.10; Bc7	99	B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A23	100	B05.10; Bc7	99	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A24	99; 100	B05.10; Bc7	99	Bc7	99	SAS56, B05.10
Bci-A25	99	B05.10; Bc7	99	Bc7; B05.10	99; 100	SAS56, B05.10
Bci-A26	99	B05.10	99; 100	Bc7; B05.10	100; 99	SAS56, B05.10
Bci-A27	100	B05.10	99	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A28	99	B05.10	99; 100	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A29	99	B05.10	99; 100	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10
Bci-A30	99	B05.10	99	Bc7; B05.10	99	SAS56, B05.10

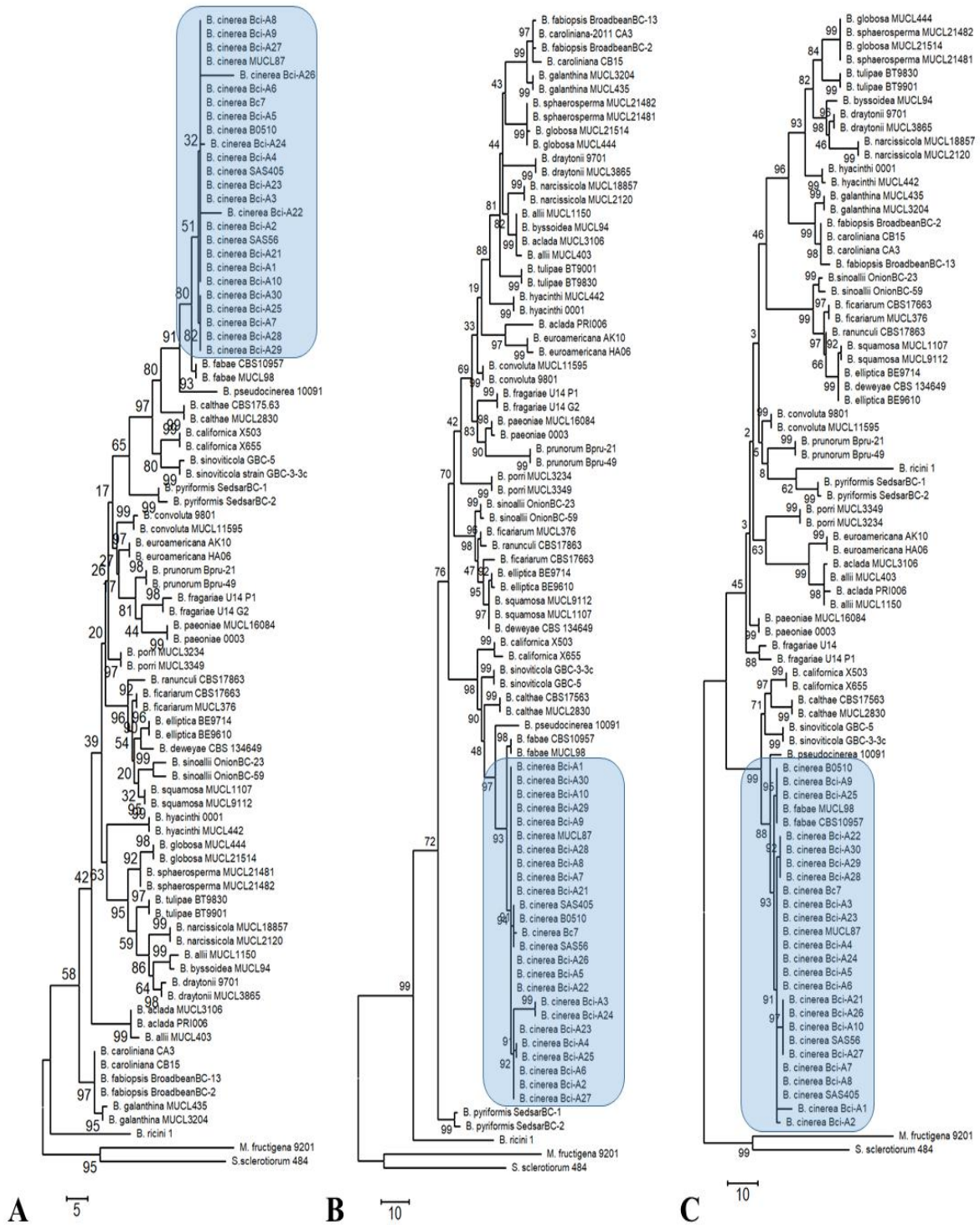


Figura 5. Análisis filogenético de 84 aislado de especies del género *Botrytis* en un árbol de máxima parsimonia obtenido del conjunto de secuencias de ADN de los genes gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (A), proteína de choque térmico 60 (HSP60) (B), y la subunidad II de ARN polimerasa dependiente de ADN (RPB2) (C), según máxima parsimonia utilizando el programa MEGA 7.

Cuadro 6. Origen de aislados *Botrytis* spp. y números de acceso GenBank de las secuencias de nucleótidos utilizadas en este estudio.

<i>Botrytis</i> spp.	Aislados	Origen	Año	Número de acceso GenBank		
				G3PDH	HSP60	RPB2
<i>B. aclada</i>	MUCL3106	E.E.U.U	1961	AJ704991	AJ716049	AJ745663
<i>B. aclada</i>	PRI006	—	—	AJ704993	AJ716051	AJ745665
<i>B. allii</i>	MUCL1150	Noruega	1960	AJ704994	AJ716052	AJ745668
<i>B. allii</i>	MUCL403	Holanda	1957	AJ704996	AJ716055	AJ745666
<i>B. byssoidea</i>	MUCL94	E.E.U.U	1923	AJ704998	AJ716059	AJ745670
<i>B. californica</i>	X503	E.E.U.U	2012	KJ937068	KJ937058	KJ937048
<i>B. californica</i>	X655	E.E.U.U	2012	KJ937049	KJ937059	KJ937069
<i>B. calthae</i>	CBS17563	E.E.U.U	1961	AJ704999	AJ716060	AJ745671
<i>B. calthae</i>	MUCL2830	Bélgica	1960	AJ705000	AJ716061	AJ745672
<i>B. caroliniana</i>	CA3	E.E.U.U	2011	JF811586	JF811589	JF811592
<i>B. caroliniana</i>	CB15	E.E.U.U	2011	JF811584	JF811587	JF811590
<i>B. cinerea</i>	Bc7	Holanda	1970	AJ705003	AJ716064	AJ745675
<i>B. cinerea</i>	B0510	Alemania	1994	AJ705002	AJ716063	AJ745674
<i>B. cinerea</i>	MUCL87	Holanda	1928	AJ705004	AJ716065	AJ745676
<i>B. cinerea</i>	SAS405	Italia	—	AJ705005	AJ716066	AJ745678
<i>B. cinerea</i>	SAS56	Italia	—	J705006	AJ716067	AJ745677
<i>B. cinerea</i>	B05.10	Alemania	1994	AJ705002	AJ716063	AJ745674
<i>B. cinerea</i>	MUCL871	Holanda	1928	AJ705004	AJ716065	AJ745676
<i>B. cinerea</i>	SAS56	Italia	—	AJ705006	AJ716067	AJ745677
<i>B. convoluta</i>	9801	Holanda	1998	AJ705007	AJ716068	AJ745679
<i>B. convoluta</i>	MUCL11595	E.E.U.U	1968	AJ705008	AJ716069	AJ745680
<i>B. deweyae</i>	CBS 134649	-	2009	HG799521	HG799519	HG799518
<i>B. draytonii</i>	9701	Holanda	2005	AJ705019	AJ716080	AJ745691
<i>B. draytonii</i>	MUCL3865	Holanda	2005	AJ705020	AJ745692	AJ716081
<i>B. elliptica</i>	BE9610	Holanda	—	AJ705011	AJ716072	AJ745683
<i>B. elliptica</i>	BE9714	Holanda	—	AJ705012	AJ717073	AJ745684
<i>B. euroamericana</i>	AK10	E.E.U.U	2013	KX266728	KX266734	KX266740
<i>B. euroamericana</i>	HA06	E.E.U.U	2014	KX266727	KX266733	KX266739
<i>B. fabae</i>	CBS109.57	Holanda	1957	AJ705013	AJ716074	AJ745685
<i>B. fabae</i>	MUCL98	España	1929	AJ705014	AJ716075	AJ745686
<i>B. fabiopsis</i>	BC 13	China	2006	EU519211	EU514482	EU514473
<i>B. fabiopsis</i>	BC 2	China	2007	EU563109	EU563100	EU563115
<i>B. ficariarum</i>	CBS176.63	Bélgica	1960	AJ705015	AJ716076	AJ745687
<i>B. fragariae</i>	U14P1	Alemania	2016	KX429699	KX429692	KX429706
<i>B. fragariae</i>	U14G2	Alemania	2016	KX429700	KX429693	KX429707
<i>B. galanthina</i>	MUCL435	Holanda	1958	AJ705018	AJ716079	AJ745689
<i>B. galanthina</i>	MUCL3204	Holanda	1963	AJ705017	AJ716078	AJ745690
<i>B. globosa</i>	MUCL21514	Bélgica	1958	AJ705021	AJ716080	AJ745691
<i>B. globosa</i>	MUCL444	Reino Unido	1963	AJ705022	AJ716081	AJ745692
<i>B. hyacinthi</i>	0001	Holanda	1999	AJ705023	AJ716084	AJ745695
<i>B. hyacinthi</i>	MUCL442	Holanda	1958	AJ705024	AJ716085	AJ745696

(Continúa de la página anterior)

<i>B. narcissicola</i>	CBS28738	Canadá	1961	AJ705026	AJ716087	AJ745697
<i>B. narcissicola</i>	MUCL21492	Reino Unido	1962	AJ705025	AJ716086	AJ745698
<i>B. paeoniae</i>	0003	Holanda	2002	AJ705027	AJ716088	AJ745699
<i>B. paeoniae</i>	MUCL16084	Bélgica	1970	AJ705028	AJ716089	AJ745700
<i>B. porri</i>	MUCL3234	—	1926	AJ705032	AJ716093	AJ745704
<i>B. porri</i>	MUCL3349	Bélgica	1963	AJ705033	AJ716094	AJ745705
<i>B. prunorum</i>	Bpru-21	Chile	2012	KP339980	KP339987	KP339994
<i>B. prunorum</i>	Bpru-49	Chile	2012	KP339981	KP339988	KP339995
<i>B. pseudocinerea</i>	10091	China	2011	JN692414	JN692400	JN692428
<i>B. pyriformis</i>	SedsarBC-1	China	2010	KJ543492	KJ543488	KJ543484
<i>B. pyriformis</i>	SedsarBC-2	China	2010	KJ543493	KJ543489	KJ543485
<i>B. ranunculi</i>	CBS178.63	E.E.U.U	1963	AJ705034	AJ716095	AJ745706
<i>B. ricini</i>	1	China	2008	GQ860998	GQ860997	GQ860996
<i>B. sinoallii</i>	OnionBC-23	China	2007	FJ169646	FJ169658	FJ169678
<i>B. sinoallii</i>	OnionBC-59	China	2006	EU519217	EU514488	EU514479
<i>B. sinoviticola</i>	GBC-9	China	2009	JN692408	JN692394	JN692422
<i>B. sphaerosperma</i>	MUCL21481	Reino Unido	1963	AJ705035	AJ716096	AJ745708
<i>B. sphaerosperma</i>	MUCL21482	Reino Unido	1963	AJ705036	AJ716097	AJ745709
<i>B. squamosa</i>	MUCL1107	E.E.U.U	1923	AJ705037	AJ716098	AJ745710
<i>B. squamosa</i>	MUCL9112	Holanda	1966	AJ705038	AJ716099	AJ745711
<i>B. tulipae</i>	BT9901	Holanda	2000	AJ705040	AJ716101	AJ745712
<i>B. tulipae</i>	BT9830	Holanda	2000	AJ705041	AJ716102	AJ745713
<i>M. fructigena</i>	9201	Holanda	1992	AJ705043	AJ716047	AJ745715
<i>S. sclerotiorum</i>	484	Holanda	—	AJ705044	AJ716048	AJ745716

Patogenicidad de los aislados. Independientemente del cultivar inoculado, todos los aislados seleccionados de *B. cinerea* fueron patógenos en los frutos evaluados. Los aislados de *B. cinerea* desarrollaron síntomas caracterizados como una pudrición acuosa de color marrón claro a marrón oscuro, seguida por una maceración interna de los frutos; la presencia de un prominente halo marcado en la zona inoculada, lo que permitió medir el diámetro del avance de las lesiones.

Los aislados provenientes de frutos causaron mayores lesiones que aquellos extraídos de flores. Los aislados de fruta Bci-A4, Bci-A5, Bci-A6 y Bci-A9 causaron las mayores lesiones entre 43,2 a 50,6 mm en promedio, mientras que con los aislados provenientes de frutos Bci-A2 y Bci-A3, las lesiones fueron las de menor tamaño (18,6 a 26,3 mm promedio) (Fig. 6; Cuadro 7). Los aislados de flores más virulentos fueron Bci-A21, Bci-A22, Bci-A24, Bci-A25 (44,0 a 48,3 mm) comparados con los aislados Bci-A23, Bci-A26, Bci-A29 de tamaños de lesión intermedio (33,5 a 37,3 mm), o los de menor virulencia como Bci-A27, Bci-A28 y Bci-A30 (12,6 a 20,5 mm) (Fig. 6; Cuadro 8).

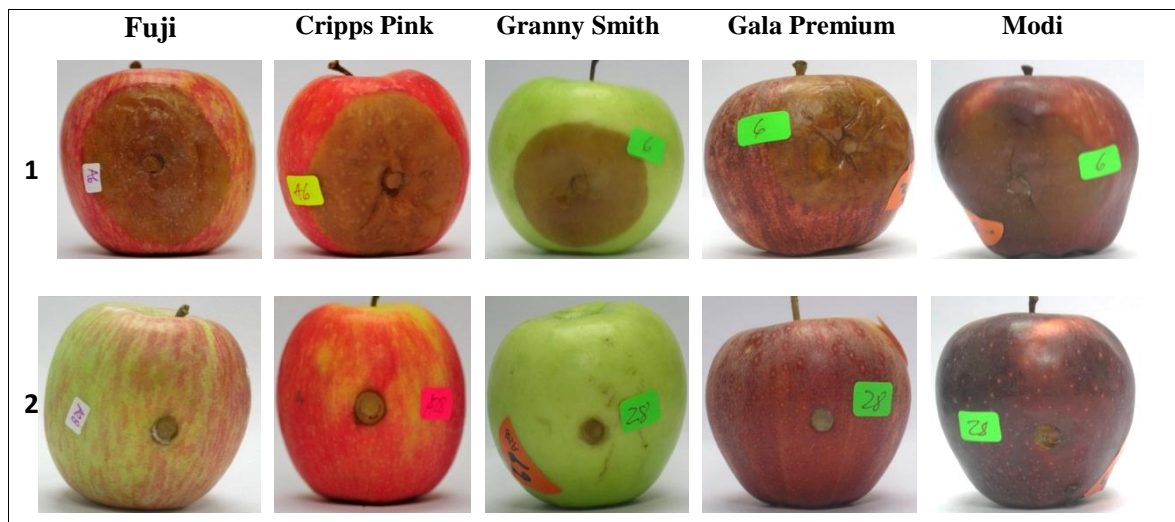


Figura 6. Frutos de manzanas inoculadas con aislados de *B. cinerea* incubados durante 7 d a 20 °C. En fila **1**, manzanas inoculadas con aislado de alta esporulación (**Bci-A6**) y en la fila **2** manzanas inoculadas con aislado de baja esporulación (**Bci-A28**).

En todos los cultivares evaluados, los síntomas de la enfermedad fueron característicos del patógeno caracterizados como una pudrición acuosa de color marrón claro a marrón oscuro, seguida por una maceración interna de los frutos, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). El efecto conjunto (interacción) del cultivar de manzano y el aislado de *B. cinerea* proveniente de flor o fruto, demuestra que la sensibilidad al hongo depende del cultivar evaluado. Los cultivares Gala Premium y Granny Smith fueron menos susceptibles a *B. cinerea*, mientras que los cultivares Cripps Pink y Fuji, presentaron mayor susceptibilidad al hongo (Cuadros 7 y 8). Cuando los patógenos se re-aislaron de los frutos enfermos en medio de cultivo APDA, se confirmó la presencia y crecimiento de *B. cinerea*, cumpliendo con los postulados de Koch.

Cuadro 7. Efecto conjunto del cultivar de manzano y el aislado de *B. cinerea* desde frutos, sobre la patogenicidad en términos de avance de la lesión a nivel de fruto^y.

Aislado	Lesiones en mm ^y								Promedio
	Cripps Pink	Fuji	Red Chief	Modi	Scarlett	Braeburn	Gala Premium	Granny Smith	
Bci-A6	63,3 v-y	60,6 t-y	51,1 p-y	43,8 g-s	43,1 f-r	52,4 q-y	46,2 l-v	44,4 f-u ^z	50,6
Bci-A4	56,4 r-y	62,6 u-y	46,8 m-v	45,5 j-u	46,4 m-v	46,7 m-v	48,8 o-y	39,7 a-q	49,1
Bci-A5	62,6 v-y	64,5 w-y	44,3 h-s	42,3 e-r	43,7 f-r	50,0 o-y	37,6 a-o	42,1 c-r	48,4
Bci-A9	56,5 r-y	48,7 o-y	47,0 n-x	47,4 o-y	41,3 b-q	42,0 i-t	22,4 a-m	40,3 a-q	43,2
Bci-A7	59,4 s-y	62,8 v-y	49,2 o-y	41,7 c-q	42,9 e-r	33,0 a-p	29,4 a-o	18,2 a-l	42,1
Bci-A1	63,2 v-y	60,8 t-y	49,8 o-y	43,1 e-r	52,3 q-y	30,7 a-o	19,5 a-i	15,5 a-h	41,9
Bci-A8	65,4 y	63,4 v-y	49,8 o-y	41,1 b-q	44,8 k-u	33,5 a-o	21,6 a-n	14,2 a-g	41,7
Bci-A10	64,7 xy	58,4 s-y	48,4 o-y	37,0 a-o	42,1 d-q	34,0 a-o	17,3 a-f	22,2 a-i	40,5
Bci-A2	14,8 a-f	11,6 a	46,7 n-w	47,7 o-y	45,5 k-u	12,6 ab	19,1 a-i	12,6 a-d	26,3
Bci-A3	16,1 a-i	12,5 ab	19,4 a-k	37,7 a-p	13,8 a-e	19,6 a-j	13,0 abc	16,5 a-i	18,6
Promedio	52,2	50,6	45,2	42,7	41,6	35,5	27,5	26,6	

^yFruta, aparentemente sana y con madurez de cosecha, fue inoculada con el respectivo micelio del aislado de *B. cinerea*, y luego incubada a 20 °C durante 7 d.

^zValores seguidos por la misma letra minúscula en la columna no difirieron significativamente según la prueba de Tukey (P<0,05).

Cuadro 8. Efecto conjunto del cultivar de manzano y el aislado de *B. cinerea* desde flores, sobre la patogenicidad en términos de avance de la lesión a nivel de fruto^y.

Aislado	Lesiones en mm ^y								Promedio
	Cripps Pink	Fuji	Red Chief	Modi	Scarlett	Braeburn	Granny Smith	Gala Premium	
Bci- A24	62,8 w-y	60,5 u-y	41,4 k-x	41,9 k-v	45,5 m-y	54,0 s-y	45,3 l-y	34,7 d-s ^z	48,3
Bci-A25	62,2 u-y	65,0 w-y	50,6 p-y	48,5 o-y	30,9 d-s	41,9 l-y	17,5 a-q	38,9 k-w	44,5
Bci-A21	60,8 u-y	66,4 y	47,7 o-y	45,1 l-y	48,3 o-y	39,0 k-u	27,3 c-s	17,3 a-m	44,0
Bci-A22	64,0 xy	60,0 t-y	50,9 q-y	50,1 p-y	40,8 k-v	45,1 n-y	16,5 a-n	23,3 b-r	43,8
Bci-A29	62,9 w-y	62,7 v-y	40,4 m-y	44,5 l-y	31,8 e-s	22,8 a-o	22,1 a-q	11,4 a-e	37,3
Bci-A23	52,3 r-y	48,2 o-y	47,3 o-y	32,3 g-s	37,9 h-s	31,1 i-s	16,6 a-o	12,3 a-i	34,7
Bci-A26	58,5 t-y	54,2 s-y	43,2 l-x	31,6 g-s	30,7 b-r	21,0 a-m	17,2 a-o	11,8 a-i	33,5
Bci-A30	23,3 c-r	18,1 a-p	27,1 f-s	20,2 a-p	25,6 b-r	23,4 a-o	13,4 a-l	12,7 a-i	20,5
Bci-A28	14,3 a-m	10,6 a	14,5 a-k	11,6 a-g	20,2 a-m	11,1 a-c	11,1 a-d	10,0 a	12,9
Bci-A27	12,6 a-j	11,6 a-h	18,3 a-o	10,7 ab	12,4 a-j	11,5 a-f	12,8 a-k	11,0 abc	12,6
Promedio	47,4	45,7	38,1	33,6	32,4	30,1	20,0	18,3	

^yFruta, aparentemente sana y con madurez de cosecha, fue inoculada con el respectivo micelio del aislado de *B. cinerea*, y luego incubada a 20 °C durante 7 d.

^zValores seguidos por la misma letra minúscula en la columna no difirieron significativamente según la prueba de Tukey (P<0,05).

Discusión

Este estudio es el primer trabajo que estudia la identificación y caracterización de aislados de *B. cinerea* obtenidos desde flores y frutos en la Región del Maule, Chile. Los resultados obtenidos en este estudio confirman la presencia de *B. cinerea* en manzanas, desde precosecha (flor) hasta la poscosecha (fruto). *B. cinerea* ha sido reportada en manzanas causando daños de importancia económica en los estados de Washington, USA (Xiao y Kim, 2008); Columbia Británica, Canadá (Sholberg y Haag, 1996; Etebarian et al., 2010); En los países de Argentina, Brasil, Ecuador, España, Portugal y Uruguay (Mondino, et al., 2009), afectando en precosecha, cosecha y poscosecha de manzanas, sobre todo en períodos de almacenamiento refrigerado.

En Chile, *B. cinerea* ha sido reportado afectando a más de 60 diferentes plantas cultivadas de diferentes categorías taxonómicas, incluido el manzano (Acuña, 2010), causando pudrición calicinal de manzanas en poscosecha, afectando principalmente los cultivares Fuji, Gala y Granny Smith (Álvarez et al., 2004). Recientemente, durante precosecha y cosecha de manzanas cv. Cripps Pink, se reportó una importante incidencia de pudrición calicinal en huertos comerciales de tres localidades de la Región de Maule, identificándose a *B. cinerea* (Ferrada et al., 2017). Por lo tanto, el presente estudio profundiza el trabajo previo de Ferrada et al. (2017), caracterizando 20 aislados de *B. cinerea* tanto en su identificación como en el grado de esporulación y virulencia.

La delimitación de las características morfológicas y culturales señala la existencia de diversidad fenotípica entre los aislados en estudio, principalmente en morfología de colonias, grado de esporulación y capacidad de formación de esclerocios. Estos resultados coinciden con los reportes de Grindle (1979) y Mirzaei *et al.*, (2009), donde señalan que *B. cinerea* tiene una gran diversidad fenotípica, principalmente en el grado de esporulación, capacidad de producción de conidias y de esclerocios, sugiriendo que el hongo está evolucionando hacia otras especies nuevas e independientes. Cabe destacar que la mayor producción de conidias se registró en el medio de cultivo AAD, lo que concuerda con los resultados previamente descritos por Beever y Weeds (2004), Li *et al.*, (2012) y Ferrada *et al.*, (2016), quienes indican que las condiciones de cultivo son un factor determinante en la variación del grado de esporulación. No obstante, bajo las condiciones de este estudio, solo cinco aislados de alta esporulación formaron esclerocios en medio de cultivo APDA ; la mayoría (15 aislados), no presentaron formación de esclerocios. Esto contrasta con lo reportado en otros cultivos como en vid, en donde predominaron los aislamientos con producción de esclerocios (Martínez *et al.*, 2003).

La incorporación de herramientas biotecnológicas en el área de la fitopatología muestra que los patógenos son poblaciones, compuestas por individuos de diversa variabilidad genética (Staats *et al.*, 2005). Las técnicas moleculares han sido utilizadas exitosamente para identificar y caracterizar de manera más amplia la diversidad genética de los agentes fitopatógenos (Moller *et al.*, 1992). Estudios previos, utilizando genes nucleares para detectar la diversidad genética de las especies de *Botrytis*, como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), proteína de choque térmico 60 (HSP60), y la subunidad II de ARN polimerasa dependiente de ADN (RPB2), se han utilizado para la identificación de las nuevas especies del género *Botrytis* (Staats *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2010a, 2010b; Lorenzini y Zapparoli, 2014; Ferrada *et al.*, 2016). En este estudio, sin embargo, los análisis filogenéticos mediante los genes G3PDH, HSP60 y RPB2, mostraron que todos los aislados estaban estrechamente relacionados con especies de referencia de *B. cinerea*, y distante de otras especies de *Botrytis*.

La caracterización patogénica de los aislados proporciona información efectiva del proceso de infección del patógeno sobre el hospedero. Sin embargo, los diferentes estados fenológicos, favorecen o limitan el desarrollo de *B. cinerea* (Kim y Xiao, 2008). La virulencia de los aislados en este estudio indicó que los aislados provenientes de frutos fueron más virulentos que los provenientes de flores. Estos resultados justifican la acción patogénica de *B. cinerea* afectando en el período de poscosecha, debido a la presencia del inóculo en los restos florales senescentes adheridos en la zona calicinal de los frutos, como se reporta en estudios anteriores (Latorre, 2004; Sutton *et al.*, 2014). La variabilidad de virulencia entre aislados de *B. cinerea* fue reportado previamente en cultivos de vid y pera (Holz *et al.*, 2004; Xiao, 2006; Latorre *et al.*, 2015). Este parámetro de variabilidad de virulencia se relaciona con la inestabilidad y diversidad genética de *B. cinerea* (Corwin *et al.*, 2016), atribuible además a aspectos de estructuración poblacional (Martínez *et al.*, 2003), y a la capacidad de resistencia a los fungicidas (Fernández-Ortuño *et al.*, 2014). Por otro lado, Li *et al.* (2016), señalan que *B. cinerea* se caracteriza por tener una compleja inestabilidad y amplia capacidad en virulencia que le permite adaptarse a diversas condiciones climáticas.

En conclusión, Los aislados de flores y frutos corresponden culturalmente, morfológicamente y molecularmente a la especie *B. cinerea*. Los aislados de *B. cinerea* mostraron una variabilidad en cuanto a su grado de esporulación (alta y baja) y virulencia (alta y baja). Los cultivares Cripps Pink y Fuji de cosecha tardía, fueron más sensibles a la enfermedad. La presencia de *Botrytis Mali* fue negativa en el presente estudio.

Literatura citada

- Acuña, R. 2010. Compendio de Bacterias y Hongos de Frutales y Vides en Chile. Servicio Agrícola y Ganadera Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 150 pp.
- Álvarez M., Pinilla B. y Herrera G. 2004. Enfermedades del Manzano. Instituto de Investigación Agropecuaria, INIA Ministerio de Agricultura. Colección de libros INIA N°10. 71 p.
- Beever, R. E., and Weeds, P. L. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. Pages 29-52 in: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands.
- Corwin, J. A., Subedy, A., Eshbaugh, R., and Kliebenstein, D. J. 2016. Expansive phenotypic landscape of *Botrytis cinerea* shows differential contribution of genetic diversity and plasticity. *Mol. Plant Microbe In.* 29:287-298.
- Dahmen, H., Staub, T., and Schwinn, F. J. 1983. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology* 73:241-246.
- Díaz, G. A., Zoffoli, J.P., Lolas, M., Blanco, A., Latorre, B.A., Ferrada, E.E., Elfar, K., and Naranjo P. 2016. Occurrence of *Phacidiopycnis washingtonensis* causing speck rot on stored Pink Lady apple fruit in Chile. *Plant Disease* 100:211-212.
- Durga, B.K.B. and Dinesh, K.V. 2009. Molecular phylogenetic relationship of *Botrytis ricini* with other *Botrytis* spp. using housekeeping gene sequences. *J Oilseeds Res* 26: 190-191.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P and Delen, N. 2007. *Botrytis* spp. and Diseases they cause in Agricultural systems. En: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Ed. Springer. Netherlands. p 412.
- Elfar, K, Zoffoli, J. P., and Latorre, B. A. 2018. Identification and characterization of *Alternaria* species associated with moldy core of apple in Chile. *Plant Disease*. First look. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0282-RE>.
- Etebarian, R. H., O’Gorman, D. T., and Sholberg, P. L. 2010. Relative virulence of *Botrytis cinerea* and *B. mali* in apple lesions. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2010-0920-01-RS.
- FAOSTAT, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistic Division. Disponible en <https://es.actualitix.com/pais/wld/manzana-paises-productores.php>. Consultado el 10 de junio de 2018.
- Ferrada, E. E., Latorre, B. A., Zoffoli, J. P., and Castillo, A. 2016. Identification and characterization of *Botrytis* blossom blight of Japanese plums caused by *Botrytis cinerea* and *B. prunorum* sp. nov. in Chile. *Phytopathology* 106:155-165.
- Ferrada, E. E., Lolas, M., Pacheco, C.V., and Díaz, G.A. 2017. Occurrence of severe outbreak of calyx end rot associated with *Botrytis cinerea* in *Malus x domestica* cv. Cripps Pink during harvest in the Maule region, Chile. *Plant Disease* 101:2149-2149.
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Peres, N. A., and Schnabel, G. 2014. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern U.S. States. *Plant Disease* 98:825-833.

- Garfinkel, A. R., Marilinda Lorenzini, Giacomo Zapparoli & Gary A. Chastagner. 2017. *Botrytis euroamericana*, a new species from peony and grape in North America and Europe, *Mycologia*, 109: 495-507.
- Grant-Downton, R. T., Terhem, R. B., Kapralov, M. V., Mehdi, S., and Rodríguez-Enríquez, M. J. 2014. A novel *Botrytis* species is associated with a newly emergent foliar disease in cultivated Hemerocallis. *PLoS One* 9:6.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K., and Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89:967-973.
- Grindle, M. 1979. Phenotypic Differences between Natural and Induced Variants of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* 111: 109-120.
- Holz, G., S. Coertze, and B. Williamson. 2004. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. pages 9-27. In: Y Elad, B. Williamson, P Tudzynski, and N. Delen (eds.). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers. Dor-drecht. The Netherlands. 428 pp.
- Henriquez, J. L. 2005. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. *Plant Dis.* 89:1360.
- Latorre, B. A. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta Ed. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 638 p.
- Latorre, B. A. 2018. Compendio de las enfermedades de las plantas. Primera Ed. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 733 p.
- Latorre, B. A., Elfar, K., and Ferrada, E. E. 2015. Gray mold (*Botrytis cinerea*), a limiting factor for grape production in Chile. *Cien. Inv. Agric.* 42: 305-330
- Li, X. P., Kerrigan, J., Chai, W. X., and Schnabel, G. 2012. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104:650-658.
- Li, Y., Sun, S., Du, C., Xu, C., Zhang, J., Duan, C., and Zhu, Z. 2016. A new disease of mung bean caused by *Botrytis cinerea*. *Crop Prot.* 85:52-56.
- Lorenzini, M., and Zapparoli, G. 2014. An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. *Plant Pathology* 63:1326-1335.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., and Fermaud, F. 2003. Phenotypic differences between *vacuma* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:479-488.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E. M., Shams-Bakhsh, M., Safaie, N., and Chaichi, M. 2009. Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. *J. Phytopathol.* 157:474-482.
- Mondino, P.; Di Masi, S.; Falconí, C.; Montealegre, J.; Henríquez, J.L.; Nunes, C.; Salazar, M.; Stadnik, M., Vero, S., and Usall, J. 2009. Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha. Departamento de Publicaciones. Fagro. Montevideo 67p.

- Moller, EM, Bahnweg, G, Sandermann, H, and Geiger, HH. (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res* 20:6115–6116.
- ODEPA, 2017. Superficie Plantada Nacional, Regional, Número De Huertos e Infraestructura Frutícola. Oficina de Estadísticas y Planificación. Gobierno de Chile, Santiago, Chile. Disponible en <http://odepa.cl/catastros-de-superficie-fruticolaregional/>. Consultado el 22 de abril de 2018.
- Pinilla B. y Álvarez M. 2002. Estudios epidemiológicos de la “pudrición calicinal” de las pomáceas causadas por *Botrytis cinerea*. XI Congreso Nacional de Fitopatología Resúmenes. Santa Cruz, Chile. p.47.
- Rupp S, Plesken C, Rumsey S, Dowling M, Schanbel G, Weber RWS, Hahn M. 2017. *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold on strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-based fungicide resistance. *Applied and Environmental Microbiology* doi:10.1128/AEM.00269-17.
- Saito S, Margosan D, Michailides TJ, Xiao CL. 2016. *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. *Mycologia* 108:330-43
- Soto-Alvear, S., Lolas, M., Rosales, I. M., Chávez, E.R., and Latorre, B. A. 2013. Characterization of the Bull’s eye rot of apple in Chile. *Plant Disease* 97:485-490.
- Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Agnello, A. M. and James F. 2014. Compendium of Apple and Pear Diseases and Pest. Second Edition. The American Phytopathological Society, Minesotta, MN. 343 p.
- Staats, M., van Baarlen, P., and van Kan, J. A. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22:333-346.
- Sholberg, P. L., and Haag, P. D. 1996. Incidence of postharvest pathogens of stored apples in British Columbia. *Can. J. Plant Pathol.* 18:81-85.
- Tamura, K., Petersen, D., Petersen, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology. Evol.* 28:2731-2739.
- Walker, A. S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., Dupont, J., and Fournier, E. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101:1433-1445.
- Xiao, C. L. 2006. Postharvest fruit rots in d’Anjou pears caused by *Botrytis cinerea*, *Potebniamyces pyri*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2006-0905-01-DG.
- Xiao, C. L., and Kim, Y. K. 2008. Postharvest fruit rots in apples caused by *Botrytis cinerea*, *Phacidiopycnis washingtonensis*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. Online. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2008-0919-01-DG.
- Zhang, J., Wu, M. D., Li, G. Q., Yang, L., Yu, L., Jiang, D. H., Huang, H. C., and Zhuang, W. Y. 2010a. *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. *Mycologia* 102:1114-1126.

- Zhang, L., Zhou, Y. J., Li, G. Q., Yang, L., Jiang, D. H., Zhuang, W. Y., and Huang, H. C. 2010b. *Botrytis sinoallii*, a new species of the gray mold pathogen on *Allium* crops in China. *Mycoscience* 51:421-431.
- Zhang, J., Yang, H., Yang, Y., Yu, Q.Y., Wu, M.D., Yang, L., Zhuang, W.Y., Chen, W.D., & Li, G.Q., 2016. *Botrytis pyriformis* sp. nov., a novel and likely saprophytic species of *Botrytis*, *Mycologia*, 108:4, 682-696.
- Zhou, Y. J., Zhang, J., Wang, X. D., Yang, L., Jiang, D. H., Li, G. Q., Hsiang, T., and Zhuang, W. Y. 2014. Morphological and phylogenetic identification of *Botrytis sinoviticola*, a novel cryptic species causing gray mold disease of table grapes (*Vitis vinifera*) in China. *Mycologia* 106:43-56.