



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

Identificación de *Botrytis prunorum* y *B. cinerea* asociados a la pudrición calicinal en peras durante poscosecha

MEMORIA DE TÍTULO

BRAULIO JOSUÉ ARMIJO ZAGAL.

TALCA, CHILE 2021

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, 2021

Aprobación:



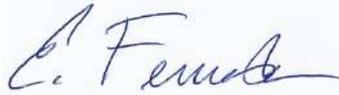
Profesor guía: Ing. Agr. Mg. Cs. Dr. Gonzalo A. Díaz

Profesor Asociado

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Talca



Profesor informante: Ing. Agr. Dr. Enrique Ferrada Q.

Profesor asistente

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Austral de Chile

Fecha de presentación de Memoria de Título 3 de mayo del 2021

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios, primeramente, por el simple hecho de poder terminar esta etapa tan importante en mi vida, el apoyo incondicional de mi esposa Paz y mis hijos Santiago y Ema. El apoyo de mis padres en todo el sentido de mi vida.

Darle las gracias a mi profesor Guía Gonzalo Díaz Ulloa por su buena voluntad y ayuda en los análisis de datos y escritura final de la memoria. También quiero agradecer a todo el equipo de trabajo del laboratorio de Sanidad Vegetal, ya que se portaron muy bien conmigo.

Solo queda decir Gracias totales.

RESUMEN

La exportación de peras (*Pyrus communis* L.) a nivel mundial es muy importante, siendo Chile actualmente considerado como uno de los principales países exportadores de pera fresca del hemisferio sur. La superficie de perales alcanza las 7.271 ha, siendo la región del Maule la segunda región con más producción nuestro país, luego de la región de O'Higgins. La pudrición calicinal de la pera es causado predominantemente por *Botrytis cinerea*, siendo esta enfermedad una de las importantes durante poscosecha. Recientemente se han identificado a otras especies de *Botrytis* causando pudrición gris en diferentes hospederos (manzana, ciruelo, kiwis, arándanos entre otros). Por ello, es muy importante realizar diversos tipos de estudios que puedan identificar las posibles especies de *Botrytis* para determinar de forma más exacta la etiología de la pudrición calicinal de peras en la Región del Maule. El objetivo del presente estudio fue caracterizar molecularmente y estudiar el comportamiento bajo la temperatura de 0°C de aislados de *Botrytis cinerea* de alta esporulación y aislados de *Botrytis* sp. de baja esporulación obtenidos recientemente causando pudrición calicinal en peras en la Región del Maule. Basados en los resultados obtenidos, se identificó por medio de la identificación molecular (comparación de secuencias, Blast) y análisis filogenéticos (incluyendo genes G3PDH, HSP60 y RPB2) a *Botrytis prunorum* asociados a los aislados de baja esporulación de *Botrytis*. Los aislados de *B. prunorum* crecieron a 0°C. Sin embargo, la tasa de crecimiento de los aislados de *B. prunorum* fue baja, al compararla con los aislados de *B. cinerea*. Por lo tanto, los aislados de *B. prunorum*, mostraron diferencias genéticas y fisiológicas diferentes a *B. cinerea*, colectados desde pudriciones de peras en Chile.

ABSTRACT

The export of pear fruits (*Pyrus communis* L.) is very important worldwide. Currently, Chile is considered one of the main exporting countries of fresh pear fruits in the Southern hemisphere. The area of pear trees planted reaches 7,271 ha, the Maule region being the second region with the most production, after the O'Higgins region. The calyx-end rot of pear fruit is predominantly caused by *Botrytis cinerea*. Calyx-end rot is one of the important during preharvest and postharvest of pear fruits. Recently, other species of *Botrytis* have been identified causing gray mold in different hosts (apple, plum, kiwis and blueberries, among others). For this reason, it is very important to carry out various types of studies that can identify possible *Botrytis* species in order to more accurately determine the etiology of goblet rot of pears in the Maule Region. The objective of the present study was to characterize molecularly and study the behavior under the temperature of 0 °C of isolates of *Botrytis cinerea* with high sporulation and isolates of *Botrytis* sp. with low sporulation recently obtained causing calyx-end rot in pears in the Maule Region. Based on the results obtained, *Botrytis prunorum* associated with low sporulation isolates of *Botrytis* was identified through molecular identification (sequence comparison, Blast) and phylogenetic analysis (including G3PDH, HSP60 and RPB2 genes). Isolates of *B. prunorum* grew at 0 °C. However, the growth rate of *B. prunorum* isolates was low, when compared to *B. cinerea* isolates. Therefore, the isolates of *B. prunorum*, showed genetic and physiological differences against *B. cinerea*, collected from pear rots in Chile.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Hipótesis.....	2
1.2 Objetivo general.....	2
1.3. Objetivos específicos.....	2
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.	3
2.1. El cultivo del peral.	3
2.2. Superficie y producción nacional	3
2.3. Fenología del peral.	3
2.4. Triángulo de las enfermedades	5
2.5.1. Pudrición calicinal en frutos de peras.	7
2.5.2. Agente causal de pudrición calicinal	8
2.5.3. Ciclo de la enfermedad.....	9
2.6 Morfología de <i>Botrytis cinerea</i>	9
3 MATERIALES Y METODOS	12
3.1. Ubicación del estudio	12
3.2. Aislados de <i>Botrytis</i> en peras.	12
3.3. Identificación molecular.....	13
3.4. Análisis filogenético.....	14
3.5. Crecimiento micelial a 0°C.	14
3.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Identificación molecular.....	15
4.2. Estudios filogenéticos.....	15
4.3 Efecto de la temperatura sobre especies de <i>Botrytis</i>	17
4.3.1 Curva de incubación a 0°C.....	17
5. DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSION	23
II. CITAS BIBLIOGRÁFICAS	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 2.1. Frutos de Abate Fetel en huerto comercial de San Clemente, Región del Maule. (Fuente G. Díaz).....	4
Figura 2.2. Descripción de estados fenológicos del peral cv. Packam`s Triumph en Chile (Merlet et al.,1989).	5
Figura 2.3. Triángulo de las enfermedades compuesta por un hospedero susceptible (pera), agente causal virulento (Hongo, <i>Botrytis cinerea</i>) y una condición ambiental favorable para la infección (temperatura y agua libre) (fuente: Díaz y Lolas, 2016).	5
Figura 2.4. Pérdidas de peras durante proceso y almacenaje asociados a hongos (A) y pudrición de fruto por <i>Penicillium</i> , mostrando síntomas de ablandamiento del fruto junto con signos de <i>Penicillium</i> (B) (Fuente G. Díaz).....	6
Figura 2.5. Frutos cv. Beurre Bosc con lesiones laterales asociados a <i>Cladosporium</i> spp. después de tres meses de almacenamiento a 0°C. (Fuente G. Díaz).....	7
Figura 2.6. Pudrición calicinal de peras asociados a <i>Botrytis cinerea</i> después de almacenamiento en frutos cvs. Forelle (izquierda) y Beurre Bosc (derecha).....	8
Figura 2.7. Ciclo del patógeno fungoso <i>Botrytis cinerea</i>	9
Figura 2.8. Estructuras de <i>Botrytis cinerea</i> . Conidióforo con producción de conidias en racimo (A), conidias hialinas y elipsoides (B) y esclerocios (C) de <i>B. cinerea</i> en medio de cultivo APDA. Bar = 100 µm. Fuente G. Díaz.....	10

Figura 3.1. Frutos de peras cv. Beurre Bosc con pudrición calicinal, expuestos a temperatura ambiente de 20°C por cinco días, desde los cuales se obtuvieron los aislados en estudio. (Fuente G. Díaz).....13

Figura 4.1. Árbol filogenético obtenido desde un análisis de máxima parsimonia basado en secuencias de ADN de los genes G3PDH (A), HSP60 (B), y RPB2 (C) usando el programa MEGA 7.0.18. Los cuadros de color azul y rojo indican las agrupaciones de *Botrytis prunorum* y *B. cinerea*, respectivamente.....17

Figura 4.2. Árbol filogenético de aislados de *Botrytis prunorum* obtenido desde un análisis de máxima parsimonia basado en secuencias de ADN concatenadas de los genes G3PDH + HSP60 + RPB2 usando el programa MEGA 7.0.18. Los cuadros de color azul y rojo indican las agrupaciones de *Botrytis prunorum* y *B. cinerea*, respectivamente.....18

Figura 4.3. Relación lineal entre el tiempo (días) de incubación a 0°C (variable independiente) y el crecimiento micelial (mm, variable dependiente) in vitro en medio de cultivo APD (2%) entre los promedios de los aislados de *B. cinerea* (AEP-48, AEP-124) y *B. prunorum* (BEP-10-2, BEP-10-3, BEP-10-4, BEP-10-1).....19

1. INTRODUCCION

La exportación de peras (*Pyrus communis* L.) a nivel mundial es muy importante, siendo Chile actualmente considerado como uno de los principales países exportadores de pera fresca del hemisferio sur (Odepa, 2019). La superficie de perales alcanza las 7.271 ha, de las cuales 4.505 se concentran en la Región de O'Higgins, liderando la superficie, seguida por la Región del Maule. Entre los cultivares destacados, los cvs. Packam's Triumph y Abate Fetel son los que poseen mayor superficie en las regiones de O'Higgins y del Maule, respectivamente (Odepa, 2019).

El peral es una especie frutal que es susceptible a enfermedades asociados a diferentes fitopatógenos (Ej, virus, bacterias, fitoplasmas entre otros), destacando los hongos que atacan al árbol (sistema radical, tronco, follaje, flores y frutos) y a los frutos durante su producción en el huerto comercial y durante el almacenaje en frío de los frutos (Latorre, 2004; 2018; Agrios, 2007). Las enfermedades que afectan a los frutos, provocan pérdidas en su calidad y valor durante su almacenamiento y comercialización que son pérdidas directas. Además, la presencia de pudriciones asociadas a hongos causa pérdidas indirectas por la necesidad de adquirir medidas de control en la etapa de almacenaje y además del costo que implica el reembalaje de la fruta en Chile como en el extranjero (Pinilla, 2013). Las pudriciones más importantes a nivel nacional que afectan a las peras son "Moho Verde" y "Pudrición Calicinal", causadas por *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*, respectivamente (Latorre, 2004; 2018). La pudrición calicinal provocada por el hongo *B. cinerea*, es de las más importantes durante poscosecha (Latorre, 2004). Esta pudrición fue detectada por primera vez en frutos de peras en el año 1987, donde la infección principalmente ocurre en el huerto, durante floración (septiembre), que es favorable para el hongo por la humedad ambiental y temperaturas en la zona central de Chile. El hongo *B. cinerea* puede permanecer latente en los restos florales que quedan junto con los frutos en la zona calicinal. Los primeros síntomas generalmente, solo son posible de observar después de dos a tres meses de almacenados los frutos en poscosecha (Pinilla y Álvarez, 2015).

El hongo *Botrytis cinerea* es una especie que se caracteriza por su amplia lista de hospederos (forestales, ornamentales, frutales entre otros), donde causa pudriciones de frutos, atizonamiento de brotes y flores. Las características culturales y morfológicas en ocasiones no son posible de diferenciar especies muy cercanas a nivel molecular, como en *Botrytis*. En los últimos años, junto con los avances en identificación molecular, en especial de *Botrytis* (Staats *et al.*, 2005), se han descrito y reportado a especies diferentes de *B. cinerea* que pertenecen al género *Botrytis* causando diferentes problemas como *B. fragariae* descrita causando pudriciones en frutilla (Dowling *et al.*, 2017), *B. caroliniana* en mora (Li *et al.*, 2017), *B. euroamericana* en uva vinífera (Garfinkel *et al.*, 2017), *B. sinoviticola* en uva de mesa (Zhang *et al.*, 2017) y *B. prunorum* en

ciruelas (Ferrada *et al.*, 2016). Es más, recientemente Elfar *et al.*, (2017), reportaron y describieron a *B. prunorum* causando pudriciones de kiwis en Chile. En la actualidad no se dispone de información científica asociada a la descripción de especies distintas a *B. cinerea* causando la pudrición calicinal de peras en poscosecha.

A continuación, se plantea la hipótesis y objetivos del presente estudio:

1.1 Hipótesis

La pudrición calicinal de peras durante poscosecha es causada por varias especies pertenecientes al género *Botrytis*, las cuales presentarían diferencias genéticas y fisiológicas.

1.2 Objetivo general

Identificar y caracterizar especies de *Botrytis* sp. causando pudrición calicinal en peras obtenidas durante poscosecha.

1.3. Objetivos específicos

Identificar molecularmente los aislados de *Botrytis* sp. causando pudrición calicinal en peras.

Determinar la tasa de crecimiento a 0°C de los aislados de *Botrytis* sp. causando pudrición calicinal en peras.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

2.1. El cultivo del peral.

El peral (*Pyrus communis* L.) corresponde a una especie de hoja caduca, similar al manzano. Se encuentra dentro de la familia de las Rosáceas, siendo la especie más conocida en términos productivos el peral común, su número básico de cromosomas es de $x=17$; número somático de 34 (Westwood, 1993). El peral corresponde a un árbol piramidal, redondeado en su juventud, luego oval, que llega hasta 20 metros de altura y vive aproximadamente 65 años (Merlet *et al.*, 1989).

La especie peral posee hojas aserradas, crenadas o enteras, rara vez lobuladas, pecioladas y estipuladas. Posee yemas de tipo mixta con escamas imbricadas. Las flores del peral brotan al mismo tiempo que las hojas, e incluso en algunos casos florecen antes, en racimos umbeliformes, de color blancas y rara vez son de color rosados (Merlet *et al.*, 1989). Los frutos son pomos redondos o en forma de lágrima que no superan los 4 cm en especies silvestres y hasta 18 cm en especies cultivadas (Gil, 2009).

2.2. Superficie y producción nacional

La superficie de perales de Chile alcanza las 7.271 ha, de las cuales 4.505 ha se concentran en la Región de O'Higgins, liderando la superficie nacional. El cultivar Packham's Triumph es el que posee mayor superficie en esta Región, mientras que en el Maule alcanza las 1.859 ha., siendo el cv. Abate Fetel el que posee la mayor la superficie. La Región Metropolitana cuenta con sólo 738,3 hectáreas (Odepa, 2019).

2.3. Fenología del peral.

El peral es una especie caducifolia que requiere entre 900 a 1500 horas de frío para poder romper el receso invernal dependiendo de la zona (cálida o fría) (Gil, 2009). El fruto en su primera etapa crece por división celular, este proceso depende de la temperatura ambiental. Una baja temperatura después de cuaja comprometería el calibre potencial de la fruta, al limitarse el número de divisiones celulares (Stanley *et al.*, 2000; Warrington *et al.*, 1999). Por lo contrario, al tener temperaturas altas los primeros 45 días de plena flor, afectaría negativamente la composición celular, esto nos llevaría a una maduración acelerada (Tromp, 1997; Warrington *et*

al., 1999). La temperatura actúa indirectamente al regular la tasa de fotosíntesis, el máximo de esta tasa se alcanza con temperaturas entre 28 y 30 °C (Lakso, 1994). Los diferentes estados fenológicos están descritos en la Figura 2.2.



Figura 2.1. Frutos de Abate Fetel en huerto comercial de San Clemente, Región del Maule. (Fuente G. Díaz).

Al igual que otros cultivares de invierno, la pera no logra la madurez de consumo en el árbol, por lo que requiere de un período de almacenamiento en frío (-1 a 0 °C) después de la cosecha para inducir la síntesis de etileno y posteriormente madurar a temperatura ambiente (Moggia *et al.*, 2005; Chen, 2004). Además, presenta la capacidad de ser almacenada en frío por varios meses, lo cual le permite extender su vida poscosecha y alcanzar mercados más distantes. Como por ejemplo la variedad Packham's Triumph puede ser almacenada hasta seis meses bajo frío convencional (0 °C) y hasta ocho en condiciones de atmósfera controlada (Núñez, 2012; Moggia *et al.*, 2005). El uso de almacenamientos prolongados y el transporte a grandes distancias pueden aumentar el potencial de pudriciones durante poscosecha (Adaskaveg *et al.*, 2002).

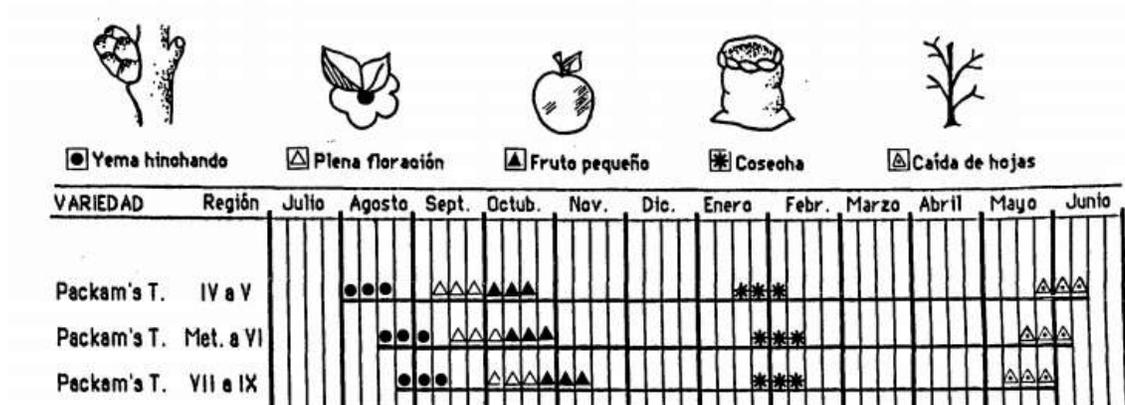


Figura 2.2. Principales estados fenológicos del peral cv. P. Triumph durante el año en Chile (Merlet *et al.*, 1989).

2.4. Triángulo de las enfermedades

Chile por su clima mediterráneo ha logrado que sea un país muy productivo a nivel frutal y hortícola, ya que dentro de su mismo territorio existen otros diversos microclimas que logran que haya una variada gama de especies frutales que se puedan producir en nuestro país. Estos en los últimos años ha cambiado el clima, incluso teniendo lluvias en verano, lo que no se había antiguamente. Dentro de los aspectos importantes y básicos de la fitopatología es importante recordar que para que se produzca una enfermedad, es necesario tener la presencia e interacción de un hospedero susceptible (pera), patógeno virulento (*Botrytis cinerea* el huésped) y condiciones ambientales favorables (agua libre y temperatura), lo que se conoce como el triángulo de las enfermedades (Agrios, 2007; Latorre, 2004) (Figura 2.3.)



Figura 2.3. Triángulo de las enfermedades compuesta por un hospedero susceptible (pera), agente causal virulento (*Botrytis cinerea*) y condiciones ambientales favorables para el desarrollo de infecciones (temperatura y agua libre, entre otras) (Díaz y Lolás, 2016).

Cada enfermedad tiene un agente causal, el cual puede ser un hongo, bacteria, virus, viroides nematodos y fitoplasmas (Latorre, 2004). Las enfermedades en los frutales asociadas a hongos fitopatógenos son las más numerosas y con mayor impacto económico a nivel nacional. Las enfermedades o pudriciones que afectan a peras durante el almacenaje en cámaras refrigeradas provocan, anualmente, niveles de pérdidas económicas difíciles de establecer con exactitud (Pinilla *et al.*, 2013). Estas enfermedades representando alrededor del 75% del total de las enfermedades que ocurren en Chile (Latorre, 2004).

2.5 Principales enfermedades descritas en peras.

Las enfermedades más importantes causadas por diversos hongos en cámaras de refrigeración son, pudrición calicinal causada por *Botrytis cinerea*, Moho verde causado por *Penicillium expansum* y Corazón mohoso, aunque provocado por un complejo de hongos, la causa de la enfermedad se atribuye al patógeno predominante *Alternaria alternata* (Pinilla *et al.*, 2013).



Figura 2.4. Pérdidas de peras durante proceso y almacenaje asociados a hongos (A) y pudrición de fruto por *Penicillium*, mostrando síntomas de ablandamiento del fruto junto con signos de *Penicillium* (B) (Fuente G. Díaz).

Moho verde esta enfermedad se caracteriza por ser un hongo extremadamente contaminante y de fácil propagación. Puede sobrevivir en frutos que han caído al suelo en cosechas y producir una gran cantidad de conidias, estas son muy fáciles que el viento las eleve y puedan contaminar más espacios dentro del huerto. Durante la cosecha, se pueden producir heridas al momento de la manipulación de los frutos, esto facilita la penetración del hongo. Los síntomas consisten en lesiones redondeadas de consistencia blanda, que se cubren de abundantes conidias de color

verde (Pinilla *et al.*, 2013). El agente causal de esta enfermedad es *Penicillium expansum* (Latorre, 2004) (Figura 2.4).

Corazón mohoso es una enfermedad, aunque provocada por un complejo de hongos, el agente causal se le atribuye al patógeno predominante *Alternaria alternata* (Pinilla y Álvarez, 2015). Los síntomas son una pudrición seca en los lóculos carpelares, la cual avanza lentamente alrededor del corazón del fruto. Este hongo ataca preferentemente a variedades que presentan un tubo calicinal abierto, que comunica al exterior de la cavidad carpelar (Álvarez *et al.*, 2004). El síntoma del corazón mohoso sólo se puede observar al cortar los frutos (Pinilla *et al.*, 2013).

En las últimas temporadas se han incrementado la presencia de lesiones laterales o pudriciones laterales que son colonizadas por especies de *Cladosporium* spp. y *Alternaria* spp., que incrementan pérdidas de frutos comerciales de peras (Figura 2.5). Las pudriciones laterales conocidas también como 'Side rot' asociados a otros patógenos como *Cadophora malorum* (= *Phialophora malorum*), son en ocasiones importantes durante el almacenaje, contribuyendo aún más con problemas de pudriciones en los frutos, aunque en este caso suelen ser superficiales y localizadas, pero son descartadas para la comercialización y agroindustria (Sardella *et al.*, 2016; Sutton *et al.*, 2014).



Figura 2.5. Frutos cv. Beurre Bosc con lesiones laterales asociados a *Cladosporium* spp. después de tres meses de almacenamiento a 0°C. (Fuente G. Díaz).

2.5.1. Pudrición calicinal en frutos de peras.

La enfermedad denominada pudrición calicinal, es una micosis que se puede desarrollar durante cosecha y recurrentemente luego de un tiempo de almacenaje, por lo tanto, el periodo de poscosecha es periodo importante, ya que el número de frutos afectados aumenta, alcanzado pérdidas mayores al 5% (Pinilla y Álvarez, 2002).

La pudrición calicinal, tiene un aspecto de color marrón pálido sin bordes delimitados, producida por una infección procedente del pedúnculo, extremidad del cáliz del fruto, heridas, asociados a restos florales y/o pudriciones del tronco (Latorre, 2004). Una vez que los tejidos son infectados se tornan de coloración pardo-oscuro, sin embargo, los bordes permanecen generalmente de color pálido. Es común observar signos del hongo asociados a las lesiones en la pudrición calicinal (Figura 2.6)

2.5.2. Agente causal de pudrición calicinal

El hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* causa la enfermedad en frutos denominada “Pudrición calicinal”. La enfermedad producida por este hongo fue detectada por primera vez en 1987. La infestación se produce en el huerto durante el periodo de floración (septiembre), favorecida por el nivel de humedad ambiental de la estación (Pinilla *et al.*, 2013). *Botrytis* puede sobrevivir como esclerocios (compactación de micelios, sobrevivencia), conidias unicelulares y de forma redonda o micelios en restos de frutos y follajes en el huerto. En frutos por el simple contacto del micelio, se puede extender desde una fruta con pudrición calicinal a las vecinas sanas (Pinilla *et al.* 2013). Los síntomas se pueden presentar tanto en el huerto como en el almacenaje de la fruta y se presenta como una pudrición blanda y acuosa que generalmente se inicia en el extremo calicinal de los frutos (Latorre, 2004). El hongo tiene la capacidad de soportar en almacenaje con temperaturas de 0 a -3°C (Sutton *et al.*, 2014), es por esto que se puede presentar en poscosecha en almacenaje en frío después de dos meses (Pinilla *et al.* 2013). Existe registro que este hongo puede colonizar y persistir en trozos de tejidos de seis especies de malezas comunes, todo esto en un huerto de peras en Oregon, E.E.U.U (Spotts *et al.*, 2006), por lo tanto, existen diferentes fuentes de inóculo de este hongo.



Figura 2.6. Pudrición calicinal de peras asociados a *Botrytis cinerea* después de almacenamiento en frutos cvs. Forelle (izquierda) y Beurre Bosc (derecha).

2.5.3. Ciclo de la enfermedad

La infección del hongo *B. cinerea* se produce en el huerto, durante el periodo de floración, esto ocurre en septiembre donde el hongo se encuentra con todas las condiciones climáticas óptimas para poder infestar, ya que tenemos alta humedad ambiental y también altas temperaturas en la estación de comienzo de primavera (Pinilla *et al.*, 2013). Luego de que el fruto ya cuajó, el patógeno está latente en los restos florales como estambre, pétalos y estilos, donde luego de un cierto periodo de almacenaje en frío, este se activa y se comienza a presentar los primeros síntomas de pudrición, en un aproximado de 2 meses de almacenaje (Pinilla *et al.*, 2013) (Figura 2.3.)

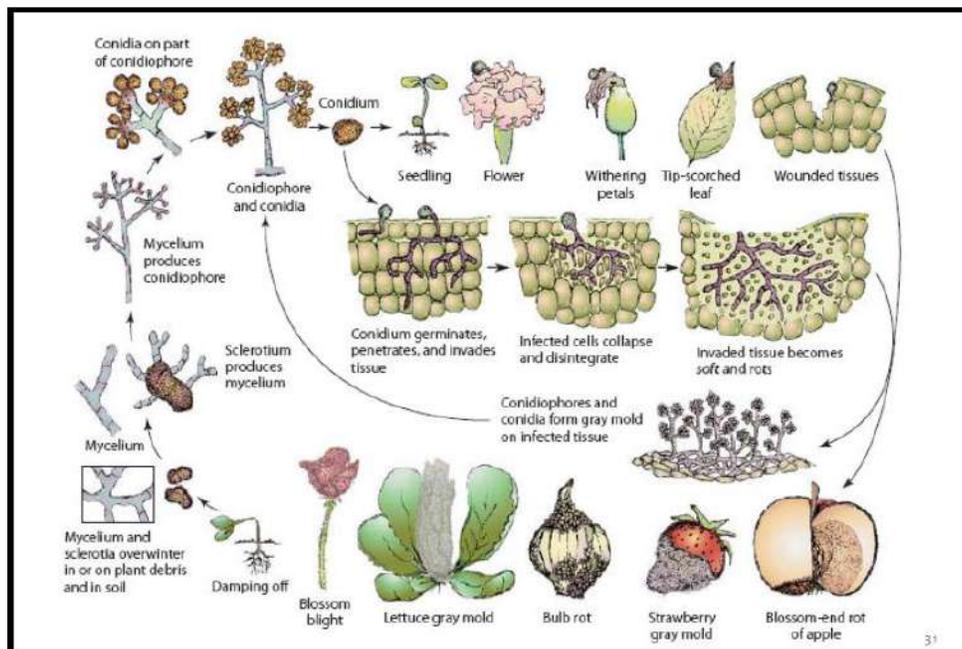


Figura 2.7. Ciclo del patógeno fungoso *Botrytis cinerea*. (Fuente: Lolás. 2017. Enfermedades de poscosecha en Frutas/Hortalizas).

2.6 Morfología de *Botrytis cinerea*

Las características morfológicas de este hongo, tales como la forma del micelio, tamaño de conidias, conidióforos, y esclerocios, son vitales para la identificación y caracterización de especies de *Botrytis* (Figura 2.4) (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 (APD) 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 se forman desde conidióforos que son erectos (aéreos), libres y ramificados, produciendo las conidias tipo racimos (Figura 2.4) (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 asociados a los huertos comerciales.

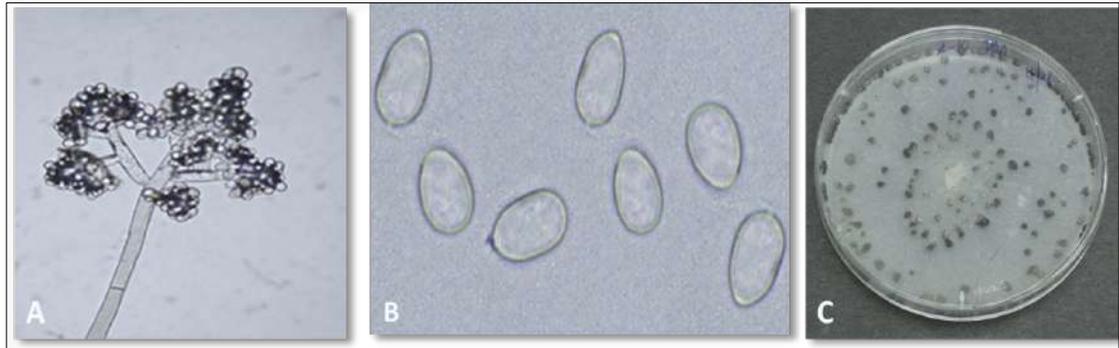


Figura 2.8. Estructuras de *Botrytis cinerea*. Conidióforo con producción de conidias en racimo (A), conidias hialinas y elipsoides (B) y esclerocios (C) de *B. cinerea* en medio de cultivo APDA. Bar = 100 μ m. Fuente G. Díaz.

2.7. Recientes especies de *Botrytis* descrita

Durante los últimos 10 años se han descritos varias especies de *Botrytis* causando problemas en vegetales y fruta a nivel mundial como, por ejemplo, en la planta *Paris polyphylla*, la cual es muy importante en China por su propiedad medicinal, se describió una enfermedad similar al moho gris en la etapa de plántula en marzo de 2016 y 2017 en la ciudad de Tengchong, provincia de Yunnan de China, se aisló y se describió como agente causal a *Botrytis polyphyllae* (Zhong *et al.*, 2019). En frutos de mora y frutillas se describió a la especie *B. caroliniana* causando pudrición gris en estado de Carolina de Sur, Estados Unidos (Fernández-Ortuño *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). También en moras, se recolectaron frutos sintomáticos del moho gris de tres campos comerciales de moras en el noroeste de Carolina del Sur (Estados Unidos), Se seleccionó un aislamiento de cada fenotipo y ubicación (seis aislados en total) para una caracterización molecular y morfológica en profundidad, la cual dio como resultado la especie *B. caroliniana* (Li *et al.*, 2017). También se identificó una nueva especie de *Botrytis* aislada de peonía (arbusto de flores grandes) en Alaska, E.E.U.U., y de uva en el distrito de Trento, Italia, basándose en morfología, patogenicidad y secuencia, se identificó a *B. euroamericana* (Garfinkel *et al.*, 2017).

En Chile se ha encontrado e identificado a esta *B. prunorum* en uva de mesa (Esterio *et al.*, 2020), en ciruelas (Ferrada *et al.*, 2016) y en kiwis (Elfar *et al.*, 2017).

2.8. Identificación molecular de *Botrytis*

Al comienzo de las investigaciones de la pudrición calicinal era muy común que fuera siempre solo *B. cinerea* el agente causal, se asumía que solo era este hongo el agente causal, por esto, los métodos tradicionales o de examinación visual, necesitaban complementarse con técnicas de la biología molecular (Staats *et al.*, 2005). En los últimos 15 años han descrito que existen más agentes causales que solo *B. cinerea*, estos afectando a diferentes tipos de hospederos; frutales, hortalizas, hasta flores y plantas medicinales (Zhang *et al.*, 2010a, 2010b; Li *et al.*, 2012; Lorenzini y Zapparoli, 2014; Ferrada *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2019). La identificación morfológica comúnmente usada, son más bien características físicas, por ejemplo, crecimiento del micelio y características de los conidióforos y conidias. Pero en la actualidad junto con los avances tecnológicos en el rubro. Se han podido incorporar genes como G3PDH, HSP60, RPB2, NEP1 y NEP2 los que han permitido identificar especies de *Botrytis* que son muy difíciles de diferenciar morfológicamente entre ellas, por similitudes culturales y morfológicos tradicionales, pero se logra a nivel genéticos diferenciarlas (Staats *et al.*, 2005; Rupp *et al.*, 2017).

3 MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación del estudio

Este trabajo se llevó a cabo en las dependencias del Laboratorio de Patología Frutal, adjunto a la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Campus Talca, Avenida Lircay s/n, Talca, Chile.

3.2. Aislados de *Botrytis* en peras.

Se utilizaron 6 aislados (BEP-10-1; BEP-10-2; BEP-10-3; BEP-10-4; BEP-10-5 y BEP-10-6) de *Botrytis* de baja esporulación de colonias blancas y 2 aislados de *Botrytis cinerea* de alta esporulación (BAP-48 y BAP-124). Los aislados fueron obtenidos desde peras con pudrición calicinal durante almacenaje en frío después de 60 días a 0°C (Cuadro 3.1. Figura 3.1). Los cultivos puros se activaron y multiplicaron en medio de cultivo agar-papa-dextrosa (APD, 2%) en placas de Petri de 88 mm de diámetro. Los aislados se incubaron a 20°C con un régimen de 16 h de luz/8 h de oscuridad y se multiplicaban utilizando las puntas de hifas.

Cuadro 3.1. Aislados de *Botrytis* sp. (baja esporulación) obtenidos desde peras con pudrición calicinal durante almacenaje en frío a 0°C.

Especie/Aislado	Síntoma en el fruto	cultivar	Almacenaje (0°C)/año
<i>Botrytis</i> sp.			
BEP-10-1	Pudrición calicinal	Packham's Triumph	60 días/ 2016
BEP-10-2	Pudrición calicinal	Beurré Bosc	60 días/ 2016
BEP-10-3	Pudrición calicinal	Beurré Bosc	60 días/ 2017
BEP-10-4	Pudrición calicinal	Packham's Triumph	60 días/ 2017
BEP-10-5	Pudrición calicinal	Forelle	60 días/ 2017
BEP-10-6	Pudrición calicinal	Forelle	60 días/ 2017
<i>Botrytis cinerea</i>			
AEP-48	Pudrición calicinal	Packham's Triumph	60 días/ 2016
AEP-124	Pudrición calicinal	Beurré Bosc	60 días/ 2017



Figura 3.1. Frutos de peras cv. Beurre Bosc con pudrición calicinal, expuestos a temperatura ambiente de 20°C por cinco días, desde los cuales se obtuvieron los aislados en estudio. (Fuente G. Díaz)

3.3. Identificación molecular

Para la identificación molecular se realizó una extracción del ADN desde 6 aislados de *Botrytis* sp. (BEP-10-1; BEP-10-2; BEP-10-3; BEP-10-4; BEP-10-5 y BEP-10-6) y 2 aislados de *Botrytis cinerea* (AEP-48 y AEP-124), utilizando colonias de 7 días de crecimiento en medio de cultivo APD (2%). 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 8 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, Alemania).

Los productos PCR confirmados fueron enviados para ser purificados y secuenciados por la empresa Macrogen (Geumcheongu, 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). Después de obtener las secuencias de consenso, se realizó una búsqueda en BLAST con las secuencias de *Botrytis cinerea* y especies de *Botrytis disponibles* en el 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.

3.4. Análisis filogenético.

El análisis filogenético se realizó utilizando el software MEGA 7.0.18 Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Biodesign Institute, Arizona State University, USA (Tamura et al., 2011). Se empleó un análisis de máxima parsimonia basado en secuencias individuales y concatenadas de ADN de los genes G3PDH, HSP60, y RPB2 de los aislados de *Botrytis* sp. (BEP-10-1; BEP-10-2; BEP-10-3; BEP-10-4; BEP-10-5 y BEP-10-6) y dos aislados de *B. cinerea* (AEP-48 y AEP-124).

3.5. Crecimiento micelial a 0°C.

Con el objetivo de determinar la temperatura óptima de crecimiento de los aislados fungosos de colonias grises (n=2 aislados) y colonias blancas (n=4 aislados), se utilizó un trozo (5-mm) de agar con crecimiento activo cada aislado de 7 días de incubación a 20°C, el cual se colocó en el centro de una placa de Petri de 88 mm con medio de cultivo APD 2%. Cada placa con cada aislado, se colocó en una cámara de crecimiento con la temperatura de 0°C. Para ello, se utilizarán 3 repeticiones de cada aislado para esta temperatura mencionada. Se realizó su seguimiento y medición cada 7 días, hasta alcanzar el crecimiento máximo en las placas de los aislados.

3.6. Diseño experimental y análisis estadístico.

El ensayo de crecimiento *in vitro* de los aislados de *Botrytis* en APD a una temperatura de 0°C, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), donde la unidad experimental correspondió a una placa Petri. Se utilizaron 3 repeticiones por aislado, donde se relacionó los aislados a través de una regresión lineal entre el crecimiento micelial de cada 7 días (mm) y la temperatura de incubación 0°C. Se utilizó una estadística descriptiva de promedios y desviación estándar utilizando el programa Excel 2016.

4. RESULTADOS

4.1. Identificación molecular

Se obtuvieron secuencias de los 6 aislados de *Botrytis* sp. para los genes G3PDH, HSP60, y RPB2. Todos los aislados se compararon en el análisis de secuencias de Blast, obteniendo desde 99 a 100% de identidad con el aislado Bpru8 accesiones KP339979 (G3PDH), KP339993 (HSP60), y KP339986 (RPB2) de *Botrytis prunorum* (ex-type) disponibles en GenBank.

4.2. Estudios filogenéticos

Los análisis de filogenia de los aislados de *Botrytis* sp. según modelo de máxima parsimonia mostraron que para los genes G3PDH, HSP60, y RPB2, todos los aislados se agruparon en el mismo cluster del aislado ex-type de *B. prunorum*, obteniendo de 98%, 99% y 99% de consistencia para los genes G3PDH, HSP60 y RPB2, respectivamente (Cuadro 4.1). Los aislados de *B. cinerea* se agruparon en el cluster de *B. cinerea*, claramente separado del clado de *B. prunorum*, ratificado en los tres análisis individuales de los genes G3PDH, HSP60 y RPB2.

Para ratificar este resultado, se realizó la prueba de homogeneidad de partición, mostrando que no hay significancia (conflictos) entre los árboles de los genes individuales y por ende se pueden combinar. La combinación de los G3PDH + HSP60 + RPB2 muestra que los aislados de *Botrytis* sp. se agruparon en el mismo cluster que el aislado holotipo de *B. prunorum* (Bpru-21) (Cuadro 4.2)

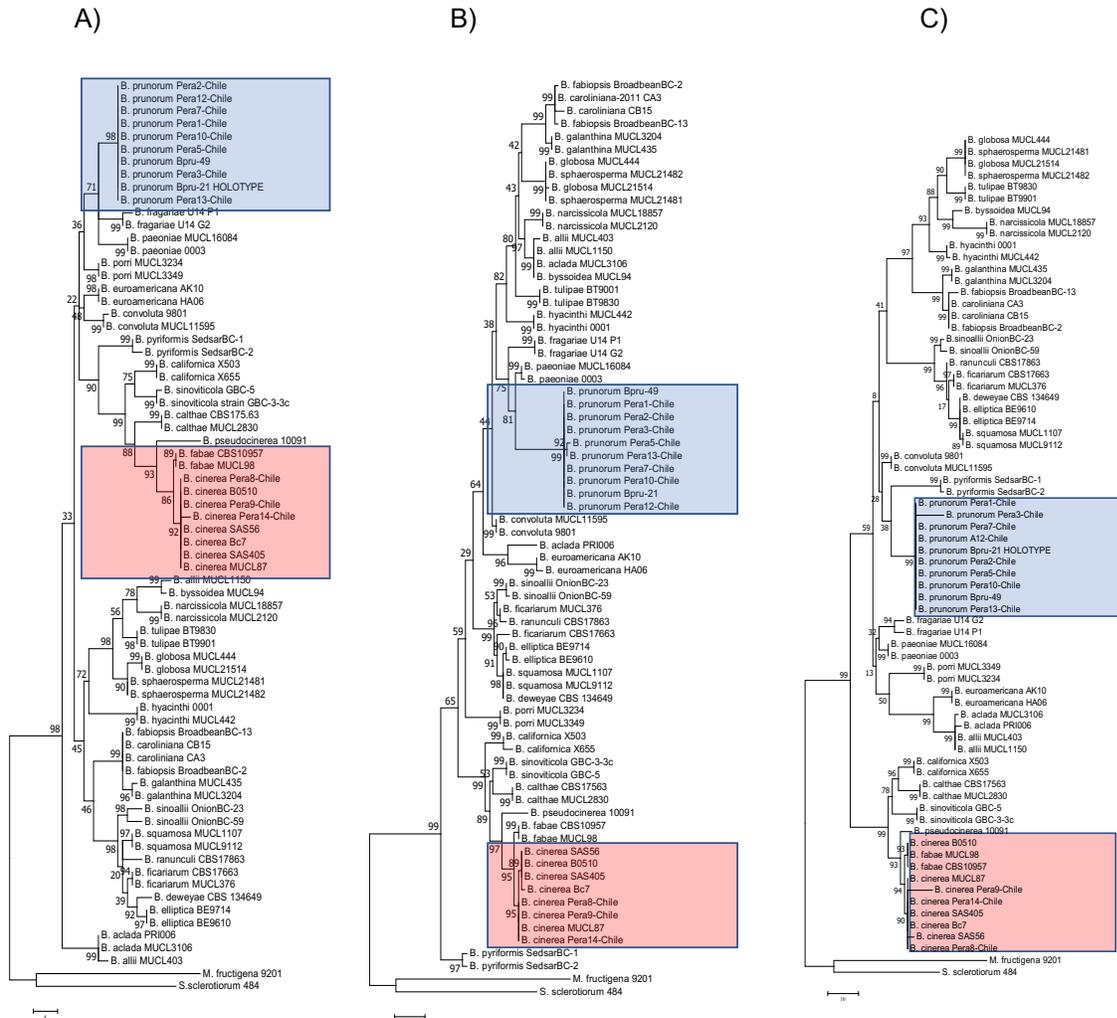


Figura 4.1. Árbol filogenético obtenido desde un análisis de máxima parsimonia basado en secuencias de ADN de los genes G3PDH (A), HSP60 (B), y RPB2 (C) usando el programa MEGA 7.0.18. Los cuadros de color azul y rojo indican las agrupaciones de *Botrytis prunorum* y *Botrytis cinerea*, respectivamente.

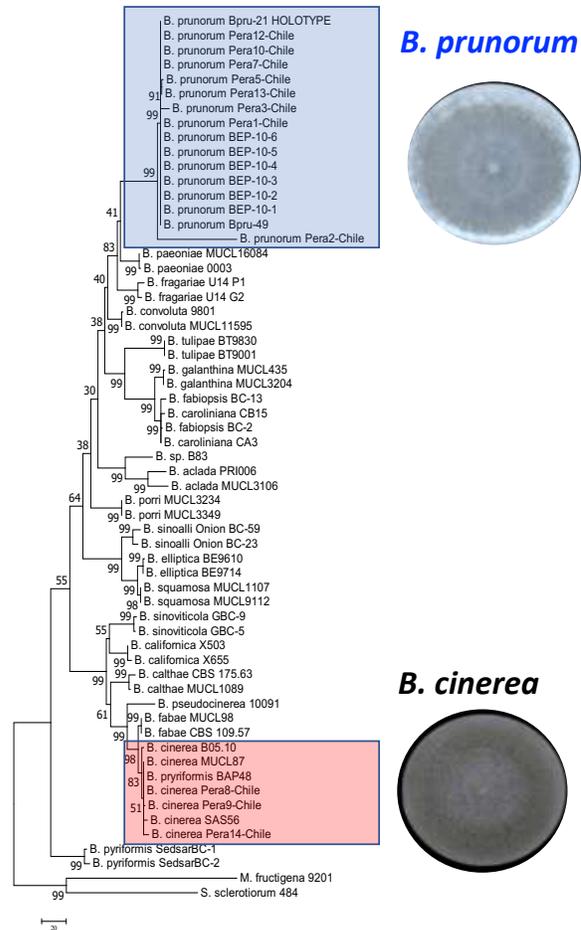


Figura 4.2. Árbol filogenético de aislados de *Botrytis prunorum* obtenido desde un análisis de máxima parsimonia basado en secuencias de ADN concatenadas de los genes G3PDH + HSP60 + RPB2 usando el programa MEGA 7.0.18. Los cuadros de color azul y rojo indican las agrupaciones de *Botrytis prunorum* y *Botrytis cinerea*, respectivamente.

4.3 Efecto de la temperatura sobre especies de *Botrytis*

4.3.1 Curva de incubación a 0°C

Los aislados de *B. cinerea* (AEP-48, AEP-124) mostraron tener un tasa de crecimiento micelial considerablemente mayor con el valor de 5,5 mm/día, al transcurrir los días de incubación a 0°C, llegando al crecer en toda la superficie de las placas de Petri (88 mm diámetro) a los 21 días. En cambio, los aislados de *B. prunorum* (BEP-10-2, BEP-10-3, BEP-10-4, BEP-10-1) resultaron tener una menor tasa de crecimiento (1,8 mm/día) al estar expuestos a las mismas condiciones, no llegando a la mitad del crecimiento micelial de las placas Petri.

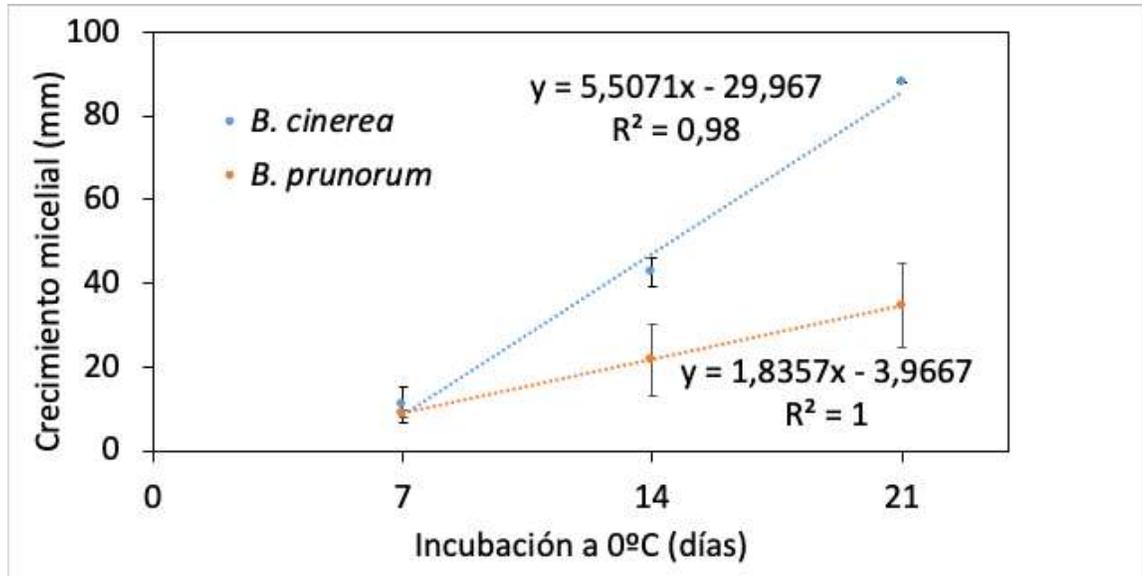


Figura 4.3. Relación lineal entre el tiempo (días) de incubación a 0°C (variable independiente) y el crecimiento micelial (mm, variable dependiente) in vitro en medio de cultivo APD (2%) entre los promedios de los aislados de *B. cinerea* (AEP-48, AEP-124) y *B. prunorum* (BEP-10-2, BEP-10-3, BEP-10-4, BEP-10-1).

5. DISCUSIÓN

El presente estudio determinó la identificación molecular utilizando los genes G3PDH + HSP60 + RPB2 por medio de análisis filogenético a las especies *Botrytis cinerea* y *B. prunorum* asociadas a la pudrición calicinal en peras. Además, *B. cinera* y *B. prunorum* mostraron diferencias fisiológicas obteniendo diferencias en crecimientos a 0°C in vitro. Este trabajo significa el primer estudio que describe a *B. prunorum* como otra especie de *Botrytis* asociado a la pudrición calicinal de peras en Chile.

En los trabajos de Staats *et al.*, (2005) y Rupp *et al.*, (2017), se estudiaron y demostraron la incorporación de genes nucleares para caracterizar la diversidad genética de las especies de *Botrytis*, permitiendo la separación e identificación de especies de *Botrytis*. Los genes nucleares gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), proteína de choque térmico 60 (HSP60), la subunidad II de ARN polimerasa dependiente de ADN (RPB2), NEP1 Y NEP2 propuestos por Staats *et al.*, (2005) y Rupp *et al.*, (2017), han permitido la identificación de nuevas especies de *Botrytis* (Zhang *et al.*, 2010 b; Li *et al.*, 2012). En este sentido, el presente trabajo determinó que los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 identificaron y agruparon a los aislados de *B. prunorum* junto a la especie ex-type, ratificando la utilidad y calidad de los genes para identificar a especies de *Botrytis*. Utilizando el gen NEP1, se ha descrito en Estados Unidos a *B. caroliniana* causando pudriciones de frutos de frutilla y moras en el Sur de Carolina (Fernández- Ortuño *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). También se describió en la misma nación a *B. mali* asociado a pudrición gris en frutillas empleando los arboles filogenéticos de los genes (G3PDH) y Beta Tubulina (Dowling y Schnabel, 2017). Por otro lado, en California, E.E.U.U se describió a *B. californica* asociados a pudrición gris en arándanos y uva de mesa utilizando los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 (Saito *et al.*, 2016). En Europa, se describieron a *B. pseudocinerea* en viñedos franceses con los genes G3PDH, HSP60 y MS547 (Walker *et al.*, 2011), y en Alemania se describió a *B. fragariae* con los genes HSP60, G3PDH, RPB2, NEP1 y NEP2 (Rupp *et al.*, 2017). En China se identificaron a *B. sinoallii* afectando a cebollas utilizando secuencias parciales de tres genes nucleares G3PDH, HSP60 y RPB2 (Zhang *et al.*, 2010) y *B. sinoviticola* en uva de mesa con pudrición gris utilizando los mismos genes (Zhou *et al.*, 2014). Previamente en Chile, se ha identificado molecularmente, utilizando los genes señalados a la especie *B. prunorum* asociados en kiwis, peras y ciruelo en el valle central de Chile (Elfar *et al.*, 2017; Ferrada *et al.*, 2016; Ferrada *et al.*, 2020). Por lo tanto, para tener una buena identificación de especies de *Botrytis* es necesario realizar análisis utilizando al menos estos genes G3PDH, HSP60 y RPB2 para obtener una identificación molecular contundente (Staats *et al.*, 2005; Rupp *et al.*, 2017).

Las infecciones por *B. cinerea* ocasionan pudriciones de los frutos en huertos comerciales, y durante poscosecha, almacenaje y transporte a nivel internacional (Sutton *et al.*, 2014) como nacional (Latorre, 2018). El hongo *B. cinerea* ha sido identificado afectando a más de 60 diferentes plantas cultivadas de diferentes categorías taxonómicas, incluyendo al peral en todo el mundo (Acuña, 2010; Sutton *et al.*, 2014). En el presente trabajo se caracterizó aislados de *B. cinerea* obtenidos desde pudrición calicinal de peras. La pudrición calicinal de peras es considerado como una importante enfermedad que afecta el almacenamiento de peras en varios países donde se cultiva el peral como en E.E.U.U, Turquía, Sudáfrica y Chile entre otros (Sutton *et al.*, 2014; Latorre 2018; Sardella *et al.*, 2016; Kurbetli *et al.*, 2016). Es más, en los Estados Unidos, destacan los estados de Oregon y Washington, donde la enfermedad produce importantes pérdidas (Lennox y Spotts, 2004; Sutton *et al.*, 2014). En especial *B. cinerea* afecta de manera importante al cultivar 'd'Anjou' que es la principal variedad de invierno en el noroeste del Pacífico de E.E.U.U (Xiao, 2006; Lennox *et al.*, 2004). En Chile *B. cinerea* es la especie de *Botrytis* predominante que ha sido descrita causando pudrición calicinal en peras (Latorre, 2018; Sutton *et al.*, 2014; Ferrada *et al.*, 2020). En Chile, recientemente se han determinado incidencia de pudrición calicinal entre *B. prunorum* y *B. cinerea*, en variedades que se almacenan durante períodos prolongados como lo son Beurré Bosc, Forelle y Packham's Triumph (Ferrada *et al.*, 2020). En Chile, especies de *Botrytis*, especialmente *B. cinerea* y *B. prunorum* han sido descritas afectando a ciruelas (Ferrada *et al.*, 2016), uva de mesa (Latorre, 2018; Esterio *et al.*, 2020), kiwis (Latorre, 2018; Elfar *et al.*, 2017), y manzanas (Álvarez *et al.*, 2004; Latorre, 2018; Ferrada *et al.*, 2017). *B. prunorum*, es una especie originalmente aislada de ciruela (*Prunus salicina*) en Chile (Ferrada *et al.*, 2016), posteriormente se ha informado oficialmente como un patógeno natural del kiwi (*Actinidia deliciosa*) (Elfar *et al.*, 2017), uva (*Vitis vinifera*) (Esterio *et al.*, 2020) y pera (*Pyrus communis*) (Ferrada *et al.*, 2020) y provisionalmente en semillas de peonía en E.E.U.U (Garfinkel *et al.*, 2019) y leguminosas (Fabaceae) (Garfinkel *et al.*, 2021). Por lo tanto, el presente trabajo amplía la lista de hospederos donde se ha descrito a la especie *B. prunorum* causando enfermedades.

Un factor determinante es la temperatura en conjunto con el agua libre o humedad relativa para entregar el ambiente ideal para producir el inóculo para desarrollar infecciones en flores o frutos (Sutton *et al.*, 2014; Latorre, 2018). Los aislados de *B. cinerea* y *B. prunorum* fueron expuesto a la temperatura de 0°C para su desarrollo. Esto es respaldado porque este hongo *Botrytis cinerea* es termo tolerante y puede crecer a temperaturas tan bajas como -2°C y germinar a 0°C (Coley-Smith *et al.*, 1980; Rosenberger y Xiao, 2014). Su crecimiento se ralentiza significativamente a temperaturas superiores a 32°C. Las condiciones húmedas durante la temporada de crecimiento pueden ser muy propicias para infecciones por *Botrytis* (Sommer

1985). También coincide con el trabajo realizado por Riquelme *et al.* (2020) quienes obtuvieron infección de flores y frutos de *B. prunorum* y *B. cinerea* en kiwi, respaldando así de forma *in vitro* que los aislados de *B. prunorum* son menos virulentos que los aislados de *B. cinerea*, estando en las mismas condiciones, presentaron mayor crecimiento (*B. cinerea*).

El hongo *B. cinerea* es necrotrófico que tiene la capacidad de colonizar tejidos muertos (Sutton *et al.*, 2014; Latorre, 2018). Se desarrolla en restos florales senescentes que pueden permanecer adheridos al fruto hasta la cosecha (zona calicinal), 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). Por lo tanto, el control de pudrición calicinal es muy importante, y se hace 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).

Finalmente es importante destacar que las pudriciones de peras asociadas especies fungosas son un importante aspecto que necesita una actualización de las enfermedades y de sus impactos, al desconocerse un actual estatus de los patógenos (especies fungosas) que causan problemas en fruto de peras en Chile. En la zona más importante de E.E.U.U, se han descrito pudrición por *Phacidiopycnis* causada por el hongo *Potebniamyces pyri* y pudrición por *Sphaeropsis* causada por el hongo *Sphaeropsis pyriputrescens* son dos enfermedades que causan altas incidencia de pudriciones. Además, los síntomas iniciales de estas dos enfermedades son similares y suelen confundirse con la pudrición calicinal causado por *Botrytis cinerea* (Xiao, 2006). Estas especies se desconocen si están presentes en Chile.

6. CONCLUSION

En base al estudio realizado se concluye que:

- Los aislados fungosos obtenidos en el presente estudio en la Región del Maule se caracterizaron molecularmente como *Botrytis prunorum* y *Botrytis cinerea*.
- Las especies *B. prunorum* y *B. cinerea* crecen a temperatura de 0°C, pero la tasa de crecimiento de los aislados de *B. prunorum* fue considerablemente menor (1,8 mm/diario), al compararla con los aislados de *B. cinerea* (5,5 mm/diario).

II. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña, R. 2010. Compendio de bacterias y hongos de frutales y vides de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Santiago, Chile. 150p

Adaskaveg J.E., H. Förster., N.F. Sommer. 2002. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. (ch.17, pp.163–195). In: Kader, A. (Ed.). Postharvest Technology of Horticultural Crops. 4 th edition. USA: University of California. 535p.

Agrios, G. 2007. Fitopatología. Segunda edición. Ed. Limusa. Ciudad de México, México. 4p.

Álvarez, M., Pinilla, B., Herrera, G. 2004. Enfermedades del manzano. INIA La Platina. Santiago, Chile. 71 p.

Beever, R.E. and Weeds, P.L. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds), pp. 29– 52. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.

Chen, P.M. 2004. Pear. In: Gross, K.C., C.Y. Wang., M. Saltveit (Eds.). The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. USDA, ARS, Agriculture Handbook 66. Consultado el: 24 de noviembre del 2020.

Coley-Smith JR., Verhoeff K., Jarvis WR. 1980. The Biology of *Botrytis*. Academic Press, 318p.

Díaz G., Lolas M., 2016 Boletín técnico no. 16. Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Talca, Chile. 11 p. Consultado el: 14 de septiembre de 2020. Disponible en:
<http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/enfermedades-pre-y-pos-cosecha.pdf>

Dowling, M., Hu, M., Schnabel, G. 2017. Identification and Characterization of *Botrytis fragariae* Isolates on Strawberry in the United States. *Plant Disease* 101(10): 1769-1773.

Elad, Y., Williamson, B., Tundzyski, P., Delen, N. 2007. *Botrytis* spp. and diseases they cause in Agricultural systems. En: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Ed. Springer. Netherlands. 412p.

Elfar, K., Riquelme, D., Zoffoli, J., Latorre, B. 2017. First Report of *Botrytis prunorum* Causing Fruit Rot on Kiwifruit in Chile. *Plant Disease* 101(2): 388.

Esterio, M., Osorio-Navarro, C., Carreras, C., Azócar, M., Copier, C., Estrada, V., Rubilar, M., Auger, J. 2020. *Botrytis prunorum* Associated to *Vitis Vinifera* Blossom Blight in Chile. *Plant Disease* 104(9): 2324-2329.

Fernández-Ortuño, D., Li, X. P., Wang, F., Schnabel, G. 2012: First report of gray mold of strawberry caused by *Botrytis caroliniana* in North Carolina. *Plant Disease* 96: 914-914.

Ferrada, E., Latorre, B., Zoffoli, J., 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(2): 155-165.

Ferrada, E E., Lolas M., Pacheco C.V., 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., Naranjo, P., Briceño, E.X., Lolas, M., Díaz, G.A. 2020. Occurrence of *Botrytis prunorum* causing calyx-end rot in European pear fruits during cold storage in Chile. *Plant Disease* 104: 590-590.

Garfinkel, A., Lorenzini, M., Zapparoli, G., Chastagner, G. 2017. *Botrytis euroamericana*, a new species from peony and grape in North America and Europe. *Mycologia* 109(3): 495-507.

Garfinkel, A., Coats, K., Sherry, D., Chastagner, G. 2019. Genetic analysis reveals unprecedented diversity of a globally-important plant pathogenic genus. *Scientific Reports* 9: 6671.

Garfinkel, A. 2021. The history of *Botrytis* Taxonomy, the Rise of Phylogenetics, and Implications for Species Recognition. *Phytopathology* 111(3): 437-454.

Gil, G. 2009. Fruticultura. El potencial productivo. Crecimiento vegetativo y diseño de huertos. Ediciones Universidad Católica. 400p.

Jones, A.L., and H.S. Aldwinckle. 1990. Compendium of apple and pear diseases, 224. APS Press, Saint Paul, MN.

Kurbetli İ, Aydoğdu M, Sülü G, Polat İ, 2016. First report of pre-harvest rot of pear fruit caused by *Botrytis cinerea* in Turkey. *New Disease Reports* 34: 16.

Lakso, A.N. 1994. Apple. pp. 3-42. En: Environmental physiology of fruit crops; Vol 1, Temperate crops. B. Schaffer y P.C. Andersen (eds). CRC Press. 358 p.

Larrañaga, P y Osoreo, M. 2019. CATASTRO FRUTÍCOLA Región del Maule. Oficina de Estudios y Política Agraria (ODEPA). [En línea] Recuperado en https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2019/09/catastro_maule.pdf. Consultado el 17 de septiembre de 2019.

Latorre, B. A. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. Sexta edición. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 638.

Latorre, B. A. 2018. Compendio de las enfermedades de las plantas. Primera Edición. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 733.

Lennox, C. L., Spotts, R. A. 2004. Timing of preharvest infection of pear fruit by *Botrytis cinerea* and the relationship to postharvest decay. *Plant Disease* 88: 468-473.

Lennox, C., Spotts, R., Cervantes, L., 2004. Populations of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* spp. on Pear Fruit, and in Orchards and Packinghouses, and Their Relationship to Postharvest Decay. *Plant Disease* 87(6): 639-644.

Li, X. P., Kerrigan, J., Chai, W. X., Schnabel, G. 2012. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104: 650-658.

Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., Schnabel, G. 2017. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104: 650-658.

Lorenzini, M., 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.

Merlet, H., D'Etigny. 1989. Centro de información de recursos naturales (Chile). Requerimientos de clima y suelo: Frutales de hoja caduca. Pub, CIREN 83.

Moggia, C., Pereira, M., Yuri, J.A., Moya, M.A. 2005. Evolución de madurez en pre y postcosecha y potencialidad de almacenaje de peras Packham's Triumph. *Agricultura Técnica*, 65(3): 246–257.

Núñez, J. 2012. Evaluación de distintas técnicas de conservación en peras 'Packham's Triumph' mínimamente procesadas. Tesis ingeniero Agrónomo y Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Frutícola. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 230h.

Pinilla; Álvarez. 2015. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Pudrición en cámaras frigoríficas. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. [En línea] Recuperado en <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR23489.pdf>. Consultado el: 17 de septiembre de 2019.

Pinilla B., 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. 47p.

Pinilla, S. 2013. Principales enfermedades de las pomáceas. Boletín técnico volumen 13 no.5.

Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Talca, Chile. Recuperado en: http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_N13_5.pdf. 17 de septiembre de 2019.

Riquelme, D., Aravena, Z., Valdés, H., Latorre, B., Díaz, G.A. Zoffoli, J.P. 2020. Characterization of *Botrytis cinerea* and *B. prunorum* from Healthy Floral Structures and Decayed 'Hayward' Kiwifruit During Post-Harvest Storage. *Plant Disease*. doi: 10.1094/PDIS-04-20-0878-RE.

Rosenberger., Xiao, C.L. 2014. Compendium of apple and pear diseases and Pests. Second Edition, American Phytopathological Society Press. St. Paul. MN. Postharvest Diseases 75-86.

Rupp S, Plesken C, Rumsey S, Dowling M, Schnabel 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*. 83:e00269-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00269-17>.

Saito, S., D. Margosan, T.J., Michailides., 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*, 108:2, 330-343.

Sardella, D., Muscat, A., Brincat, J., Gatt, R., Decelis, S., Valdramidis, V. 2016. A Comprehensive Review of the Pear Fungal Diseases. *International Journal of Fruit Science*, 16: 4, 351-377.

Sommer, N. F. 1985. Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7:331-339.

Spotts R., Serdani M. 2006. Inoculum Sources of *Botrytis cinerea* important to pear Orchards in Oregon. *Plant disease* 90 (6): 750.

Staat, M., van Baarlen, P., Van Kan, J.A.L. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology Evolution* 22:333-346.

Stanley, C.J., Tustin, D.S., Lupton, G.B., McArtney, S., Cashmore, W.M., de Silva, H.N. 2000. Towards understanding the role of temperature in apple fruit growth responses in three geographic regions within New Zealand. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 75: 413-422.

Sutton, B. T., Aldwinckle, H., Agnello, A., Walgenbach, J. 2014. Compendium of Apple and Pear Diseases and Pests. Editorial: Amer Phytopathological Society. Segunda edición. Minesota, USA. 224p.

Tamura, K., Petersen, D., Petersen, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*. 28:2731-2739.

Tromp, J. 1997. Maturity of apple cv. Elstar as affected by temperature during a six-week period following bloom. *Journal of Horticultural Science* 72: 811-819.

Walker, A.-S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., Dupont, J., Fournier, E. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101:1433-1445.

Warrington, I.J., Fulton, T.A., Halligan, E.A., de Silva, H.N. 1999. Apple fruit growth and maturity are affected by early season temperatures. *Journal of American Society of Horticultural Science* 124: 468-477.

Westwood, M.N. 1993. Temperate-zone pomology. 3a ed. Timper Press, Oregon, OR.

Xiao, C., R. Boal. 2004. Prevalence and incidence of Phacidiopycnis rot in d'Anjou pears in Washington state. *Plant Disease* 88(4): 413-418.

Xiao, C. 2006. Postharvest fruit rots in d'Anjou pears caused by *Botrytis cinerea*, *Potobniamyces pyri*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. *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* 10: 1094.

Zhang, J., Wu, M. D., Li, G. Q., Yang, L., Yu, L., Jiang, D. H., Huang, H. C., 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., Zhou, Y., Wang, X., Yang, L., Jiang, D. 2017. Morphological and phylogenetic identification of *Botrytis sinoviticola*, a novel cryptic species causing gray mold disease of table grapes (*Vitis vinifera*) in China. *Mycologia* 106(1): 43-56p.

Zhong, S., Zhang, L., Zhang, G. 2019. *Botrytis polyphyllae*: A New *Botrytis* Species Causing Gray Mold on *Paris polyphylla*. *Plant disease* 103(7): 1721-1727p.

Zhou, Y.J. Zhang, J. Wang, X.D. Yang, L. Jiang, D.H., Li, G.Q. Hsiang, T., 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*, 106:1, 43-56.