



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

Caracterización molecular y curvas de temperatura de aislados de *Botrytis caroliniana* y *B. cinerea* obtenidos desde manzanas con pudrición calicinal en la Región del Maule

MEMORIA DE TITULO

Patricio Ignacio Vergara Quijada

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:



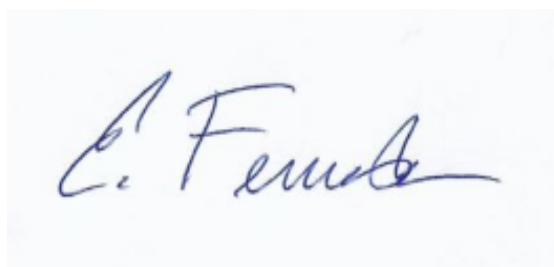
Profesor guía: Ing. Agr. Mg. Cs. Dr. Gonzalo A. Díaz

Profesor Asistente

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, 27 de enero de 2021, Talca, Chile

El presente estudio fue apoyado y financiado por el Proyecto Fondecyt Postdoctorado No. 3170025 (Anid, Chile).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi padre por todo el apoyo y esfuerzo puesto en mí, por guiarme y aconsejarme siempre. Además, quiero agradecer a mi compañera de vida Johana y a mi hija Noelia por darme el motivo más grande para salir adelante. Agradecer sin duda alguna a todos los que me apoyaron en este proceso mi madre y mi hermana que siempre me alentaban a seguir. Finalmente agradezco a mi profesor guía Gonzalo Díaz, que sin dudarlo me ha entregado su apoyo incondicional y sus conocimientos para llevar a cabo mi investigación.

RESUMEN

Los manzanos (*Malus domestica* Borkh.) es un frutal de hoja caduca que presenta una superficie importante con 32.371 ha, siendo la Región del Maule la superficie más importante (60%) a nivel nacional. La pudrición calicinal de la manzana es causado predominantemente por *Botrytis cinerea*, siendo esta enfermedad una de las importantes durante precosecha y poscosecha. Recientemente se han identificado a otras especies de *Botrytis* causando pudrición gris en diferentes hospederos (pera, ciruelo, kiwis, vid entre otros). Por ello, es crucial 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 manzanas en la Región del Maule. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar molecularmente y estudiar el comportamiento bajo distintas temperaturas de aislados de *Botrytis cinerea* de alta esporulación y aislados de *Botrytis* sp. de baja esporulación obtenidos recientemente causando pudrición calicinal en manzanos en la Región del Maule. La identificación molecular determinó que los aislados con fenotipos de *Botrytis* sp. de colonias de baja esporulación (Bca-PC-A3; Bca-PC-A13; Bca-TF-A27; Bca-TF-A28; Bca-TF-A30) obtuvieran similitudes entre 99 al 100% con la especie tipo de *Botrytis caroliniana* con los genes G3PDH, HSP60 y RPB2. De la misma forma los aislados de colonias grises de alta esporulación (Bci-PC-A1, Bci-PC-A6, Bci-TF-A22, Bci-TF-A23 y Bci-TF-A29), mostraron una similitud del 100% para los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 con espécimen tipo de *B. cinerea* aislado MUCL-87. El análisis filogenético identificó los aislados en agrupaciones junto con el ex-type de *B. caroliniana* y *B. cinerea*. La temperatura de crecimiento óptimo para los aislados de *B. caroliniana* fue de 20 °C y para los aislados de *B. cinerea* fue entre los 15 a 20°C. Finalmente, se identificó a la especie *Botrytis caroliniana* que mostró diferencias genéticas y fisiológicas diferentes de *B. cinerea* obtenidos desde manzanas con pudrición calicinal en la Región del Maule.

ABSTRACT

Apple trees (*Malus domestica* Borkh.) are deciduous fruit trees with an important area of 32,371 ha, the Maule Region being the most important area (60%) at the national level. The calyx-end rot of the apple is predominantly caused by *Botrytis cinerea*. This disease is one of the important during pre-harvest and post-harvest. Recently, other *Botrytis* species have been identified, causing gray mold in different hosts (pear, plum, kiwis, grapevine, among others). For this reason, it is crucial to carry out various types of studies that can identify possible *Botrytis* species to more accurately determine the etiology of apple goblet rot in the Maule Region. Therefore, the present study's objective was to characterize molecularly and study optimum temperatures of *Botrytis* spp. The molecular identification determined that the isolates of *Botrytis* sp. (phenotype of low sporulation; Bca-PC-A3; Bca-PC-A13; Bca-TF-A27; Bca-TF-A28; Bca-TF-A30) were 99 to 100% similarities with the type species of *Botrytis caroliniana* with the G3PDH, HSP60, and RPB2 genes. In the same way, the isolates of high sporulation phenotype (Bci-PC-A1, Bci-PC-A6, Bci-TF-A22, Bci-TF-A23, and Bci-TF-A29) showed a similarity of 100% for the G3PDH, HSP60, and RPB2 genes with the type specimen of *B. cinerea* isolated MUCL-87. Phylogenetic analysis identified the isolates in clusters together with the ex-type of *B. caroliniana* and *B. cinerea*, respectively. Additionally, the optimal growth temperature for *B. caroliniana* isolates was 20°C, and for *B. cinerea* isolates was between 15 and 20 °C. Finally, *Botrytis caroliniana* was identified showed different genetic and physiological of *B. cinerea* obtained from apples with calyx-end rot in the Maule Region.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Hipótesis	14
1.2 Objetivo general	14
1.3. Objetivos específicos.....	14
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 El cultivo del manzano.....	15
2.2 Producción y superficie nacional	15
2.3 Fenología del manzano	15
2.4 Enfermedades de los manzanos	17
2.5. Etiología y epidemiología de la pudrición calicinal.	19
2.6. Morfología de <i>Botrytis cinerea</i>	22
2.7 Identificación de <i>Botrytis</i>	23
2.8. Especies de <i>Botrytis</i>	23
2.8.1 <i>Botrytis caroliniana</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. Ubicación del estudio.....	26
3.2. Aislados de <i>Botrytis</i>	26
3.3. Identificación molecular y análisis filogenético de aislados de <i>Botrytis</i>	26
3.4. Determinación de curva de crecimiento a diferentes temperaturas	27
3.5. Diseño experimental	27
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Identificación molecular	29
4.2. Análisis filogenético	29
4.3. Efecto de la temperatura sobre especies de <i>Botrytis</i>	31
4.3.1 Curva de temperatura en aislados de <i>Botrytis caroliniana</i>	31
4.3.2. Curva de temperatura en aislados de <i>Botrytis cinerea</i>	32
4.3.3. Comparación de crecimiento entre especies de <i>Botrytis</i>	33

5. DISCUSION	35
6. CONCLUSION	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 2.1. Fenología del manzano desde la yema en receso hasta desarrollo de frutos. Yema en receso durante el invierno (A), yema comienza a hinchar (B, C, C3), aparición de los botones florales (D, D3), los sépalos dejan ver los sépalos (E, E2), primera flor (F), plena flor (F2), caída de pétalos (G), caída últimos pétalos(H), crecimiento (I), desarrollo de frutos (J).....	16
Figura 2.2. Triángulo de las enfermedades presentadas por hospedero susceptible, patógeno y condiciones ambientales favorables.....	17
Figura 2.3. Síntomas de sarna del manzano en hojas y frutos. A, lesiones sarnosas en hojas cv. Royal Gala. B, lesión sarnosa en la zona calicinal en fruto cv. Fuji.....	18
Figura 2.4. Cancros en manzanos: Cancro europeo del manzano (A) con síntomas de cancros elípticos (papiráceos= aspecto de papel) anaranjados en ramillas que muestra inicio de infección desde alrededor de la yema, y cancro anillado en tronco (B) que provocan estrangulamiento de ramas y troncos asociados a <i>Neonectria ditissima</i> ; Cancro y muerte regresiva de manzanos (C) causado por <i>Diplodia seriata</i>	18
Figura 2.5. Manzanas con ojo de buey causado por <i>Neofabraea vagabunda</i> mostrando lesiones circulares pardas (intercalando un pardo oscuro y pardo claro) después de 90 días de almacenaje a frío. Lesión ecuatorial (A) y Lesión en zona peduncular.....	19
Figura 2.6. Manzanas cv. Cripps Pink con pudrición calicinal y signos de <i>Botrytis cinerea</i> durante precosecha en la Región del Maule. A, fruto con una pudrición que abarca un 85% la zona calicinal. B, fruto con una pudrición que abarca un 100% la zona calicinal.....	20
Figura 2.7. <i>Botrytis cinerea</i> desarrollándose en flores de manzano (A), y en manzanas con pudrición calicinal después de 90 días de almacenaje a 0°C (B y C).....	21
Figura 2.8. Ciclo de la pudrición gris en diferentes especies vegetales hospederos asociados al patógeno polífago fungoso <i>Botrytis cinerea</i>	22

Figura 2.9. 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 μ m.....	23
Figura 4.1. Árbol filogenético que muestra la cercanía evolutiva de las especies de <i>Botrytis</i> , mediante una prueba de máxima parsimonia en secuencias concatenadas de los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 de aislados de alta esporulación y de baja esporulación obtenidos desde manzanas con pudrición calicinal.....	30
Figura 4.2. Curva de temperatura de aislados de <i>Botrytis caroliniana</i> a diferentes temperaturas de incubación.....	31
Figura 4.3. Curva de temperatura de aislados de <i>Botrytis cinerea</i> a diferentes temperaturas de incubación.....	32
Figura 4.4. Curva de temperatura de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Botrytis caroliniana</i> a diferentes temperaturas de incubación.....	33

1. INTRODUCCIÓN

El manzano (*Malus x domestica* Borkh.) es una de las especies más cultivadas en Chile posicionándose en el cuarto lugar productivo entre las especies frutícolas, alcanzando las 32.371 ha. Dentro de las regiones de nuestro país donde se centra la mayor producción de esta especie destaca principalmente la Región del Maule con 19.637 ha seguido por la Región del General libertador Bernardo O'Higgins con 7.734 ha (ODEPA y CIREN, 2019).

En diferentes estados fenológicos, el cultivo del manzano presenta susceptibilidad a enfermedades fungosas al momento de coincidir condiciones climáticas favorables para generarlas, afectando directamente a sus frutos, disminuyendo su vida en poscosecha como el valor comercial y nutritivo de los frutos (Pinilla, 2013). Las enfermedades más frecuentes en los huertos nacionales de manzanos se pueden encontrar la sarna del manzano causada por el hongo *Venturia inaequalis*, cancro europeo del manzano, causado por *Neonectria ditissima*, cancrrosis y muerte regresiva causado por Botryosphaeriaceae, y pudrición calicinal o moho gris del fruto causado por *Botrytis cinerea* (Latorre, 2004, 2018; Díaz *et al.*, 2019).

La pudrición calicinal de la manzana es una de las enfermedades más importantes que afecta a los frutos durante precosecha y poscosecha asociada a la especie *B. cinerea* (Sutton *et al.*, 2014; Latorre, 2004, 2018). La infección ocurre en el huerto desde el periodo de floración (septiembre-octubre en Chile) hasta la maduración del fruto (Sutton *et al.*, 2014). La infección se favorece con la presencia de agua libre producto de las precipitaciones, alta humedad o neblinas constantes que ocurren en el huerto, durante el periodo crítico (Latorre, 2004). El hongo *B. cinerea* puede permanecer latente en los restos florales adheridos a los frutos, por esta razón es muy frecuente que la pudrición, se inicie en el extremo calicinal del fruto y luego avance hacia el resto del fruto (denominada infección exógena) (Agrios, 2007). Los primeros síntomas se manifiestan, generalmente, después de dos meses de almacenaje en frío (Latorre, 2018).

El avance de una enfermedad en un cultivo en una zona geográfica definida, conduce al desarrollo de una epidemia. Las epidemias pueden progresar lenta o rápidamente como es el caso de *B. cinerea* en la uva de mesa y otros cultivos (Keller *et al.*, 2013). A menudo presenta un rápido y explosivo avance pudiendo comprometer todo el cultivo en pocos días (Latorre, 2018). Esto se debe a su persistencia como esclerocios, como micelio asociado a restos de frutos enfermos que persisten sobre el suelo y en otros hospederos, incluyendo algunas malezas (Sutton *et al.*, 2014; Latorre 2018).

Recientemente, en la Región del Maule se describió una importante prevalencia de pudrición calicinal en frutos de manzanos durante precosecha y poscosecha asociados al hongo *B. cinerea* (Ferrada *et al.*, 2016). *Botrytis* es un género de hongos en que últimamente se le han descrito e incorporado varias especies nuevas, que han mostrado diferencias moleculares y fisiológicas que incluyen a especies como *B. prunorum* en ciruelas y kiwis, que ha sido recientemente descritas en Chile (Ferrada *et al.*, 2016; Elfar *et al.*, 2017). La especie *B. caroliniana* fue descrita inicialmente afectando a frutos de mora (Li *et al.*, 2012) y frutillas en E.E.U.U (Fernández-Ortuño *et al.*, 2012). Esto nos demuestra que es posible que más de una especie de *Botrytis* este asociado a la pudrición gris en diferentes hospederos (peras, ciruelo, kiwis, vid entre otros). Por lo tanto, es crucial 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 manzanas en la Región del Maule.

A continuación, se plantea la hipótesis y objetivos de la presente investigación:

1.1 Hipótesis

La pudrición calicinal en manzanas 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* causando pudrición calicinal en manzanas en la Región del Maule.

1.3. Objetivos específicos

- Identificar molecularmente diferentes especies de *Botrytis* causando pudrición calicinal en manzanas en la Región del Maule.
- Determinar *in vitro* la curva de crecimiento micelial de diferentes especies de *Botrytis* a diferentes temperaturas (0 a 40°C) en la Región del Maule.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cultivo del manzano

El manzano (*Malus x domestica* Bork.), pertenece a la familia Rosaceae, subfamilia Maloideae y género *Malus*. Es una especie leñosa caduca de tamaño medio (1,5 a 2,5 m), que necesita entre 300 a 1000 (promedio 600) horas de frío. Esta especie frutal posee una flor con 5 pétalos blancos, 5 carpelos y ovario ínfero, además tiene un fruto (manzana), el cual es un pomo carnoso de gran importancia comercial, donde su piel puede ser verde o roja (Neira y Yuri, 2004).

2.2 Producción y superficie nacional

En Chile el cultivo de manzanas se da entre las regiones de Valparaíso y Aysén. La superficie total de manzanos es de 32.371 hectáreas, siendo el segundo frutal más cultivado después de la vid de mesa. Las regiones O'Higgins y del Maule concentran la superficie con un 84.5% del total. En la Región del Maule se concentra una superficie de plantación de 19.637 hectáreas (ODEPA y CIREN, 2019). La producción nacional de manzana alcanzó un valor de 1.520.000 toneladas, siendo el 44% exportado en su mayoría a Estados Unidos y otros países (Asoex, 2019).

2.3 Fenología del manzano

La fenología del manzano viene dada por diferentes estados de desarrollo para que logre ser un fruto agradable al paladar, entre ellos el cumplimiento del receso invernal es estimado cuantificando el tiempo en que la planta ha estado expuesta a baja temperatura. El frío más efectivo estaría entre los 3 y 8 °C (Couvillon, 1995; Lakso, 1994). Sin los requerimientos mínimos de frío el manzano no podrá cumplir sus requerimientos fisiológicos efectivamente. Una alta acumulación de frío en invierno reduce las necesidades térmicas post receso para alcanzar brotación y floración (Couvillon, 1995). Durante floración, el comportamiento del ambiente es crítico, puesto que regula la actividad de los vectores polinizadores, el progreso del tubo polínico, así como el crecimiento temprano de las hojas (Yuri *et al.*, 2019). En Chile la floración varía de acuerdo a la geografía. Para asegurar una cuaja exitosa se deben considerar las condiciones ambientales las que deben permitir una serie de eventos interrelacionados: en primer lugar, el vuelo de los vectores polinizadores, al tiempo que el estigma sea receptivo, y en segundo, el crecimiento del tubo polínico hasta el óvulo, mientras este último sea viable. Así como temperatura del aire sobre 15 °C favorece la actividad de las abejas y propicia un rápido crecimiento del tubo polínico (Yuri *et al.*, 2019). Temperaturas bajo 10 °C pueden resultar perjudicial para la cuaja y crecimiento de frutos. El crecimiento de frutos y maduración viene dado

por la acumulación de diferentes factores. Las condiciones térmicas temprano en la temporada, mientras ocurre la división celular, controlarían los procesos que determinan el tamaño del fruto y su maduración (Tromp y Wertheim., 2005). Por un lado, baja temperatura en dicho período reduce el tamaño potencial de la fruta a cosecha (Atkinson *et al.*, 2001). Por el otro, la evolución de los índices de madurez se puede anticipar de acuerdo a las condiciones térmicas en las que los componentes celulares se formaron en la primera etapa de crecimiento del fruto (Tromp, 1997). En temporadas con primaveras más cálidas, los índices de madurez evolucionarán en forma más rápida. En base a ello es posible estimar el tiempo o ventana de cosecha, tempranamente (Sutton *et al.*, 2014; Yuri *et al.*, 2019) (Ver Figura 2.1.).

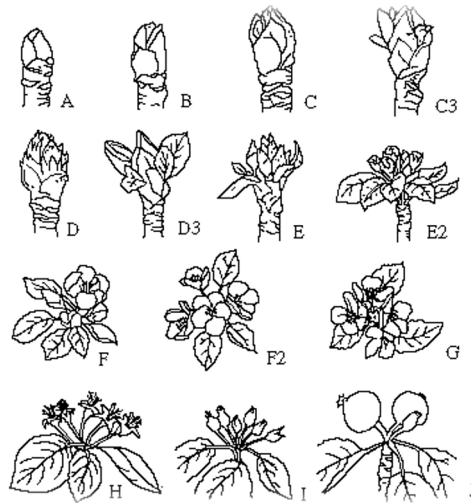


Figura 2.1. Fenología del manzano incluyendo los estados desde yema en receso hasta desarrollo de frutos. Yema en receso durante el invierno (A), yema comienza a hinchar (B, C, C3), aparición de los botones florales (D, D3), los sépalos dejan ver los sépalos (E, E2), primera flor (F), plena flor (F2), caída de pétalos (G), caída últimos pétalos(H), crecimiento (I), desarrollo de frutos (J). (Fuente: <https://i1.wp.com/www.tecnicoagricola.es/wp-content/uploads/2011/10/Manzano-fenologia.gif>).

2.4 Enfermedades de los manzanos

Las plantas se enferman solo al concurrir tres factores en forma simultánea, conocido por constituir el denominado triángulo de las enfermedades, que constituye el principio básico de una enfermedad. Estos factores corresponden a: 1. Hospedero susceptible, 2. Presencia del agente causal y 3. Condiciones ambientales favorables al desarrollo de la infección, los que deben incurrir y persistir en el tiempo. La ausencia de uno de ellos determina la inexistencia de la enfermedad (Latorre, 2018).



Figura 2.2. Triángulo de las enfermedades presentadas por hospedero susceptible, patógeno y condiciones ambientales favorables. (Fuente: <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/12043/3/20190176.pdf>)

El manzano es una especie frutal de hoja caduca que a nivel de campo es afectado por enfermedades fungosas que afectan al follaje, madera y frutos. La sarna del manzano causado por *Venturia inaequalis* es considerada como una de las principales enfermedades que afectan al manzano en Chile (Figura 2.3) (Latorre, 2018), y otras que afectan al tronco y brazos como cancro europeo del manzano causado por *Neonectria ditissima* y cancrrosis de la madera causado por *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia seriata* (Figura 2.4) (Latorre, 2004; Acuña, 2010; Díaz *et al.*, 2019).

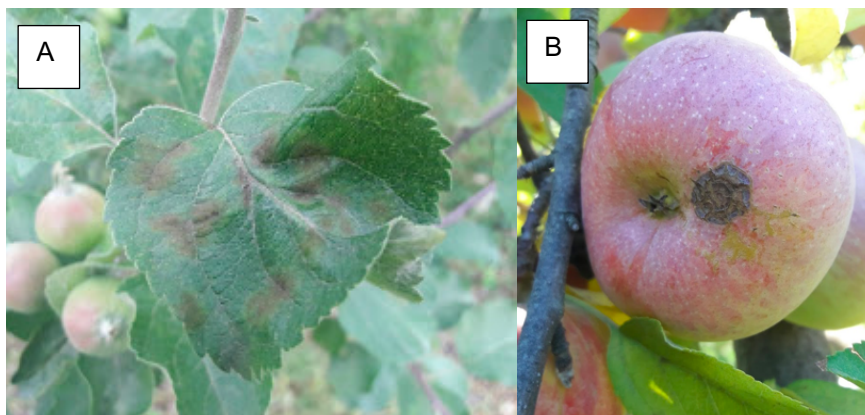


Figura 2.3. Síntomas de sarna del manzano en hojas y frutos. **A**, lesiones sarnosas en hojas cv. Royal Gala. **B**, lesión sarnosa en la zona calicinal en fruto cv. Fuji. Fuente G. Díaz

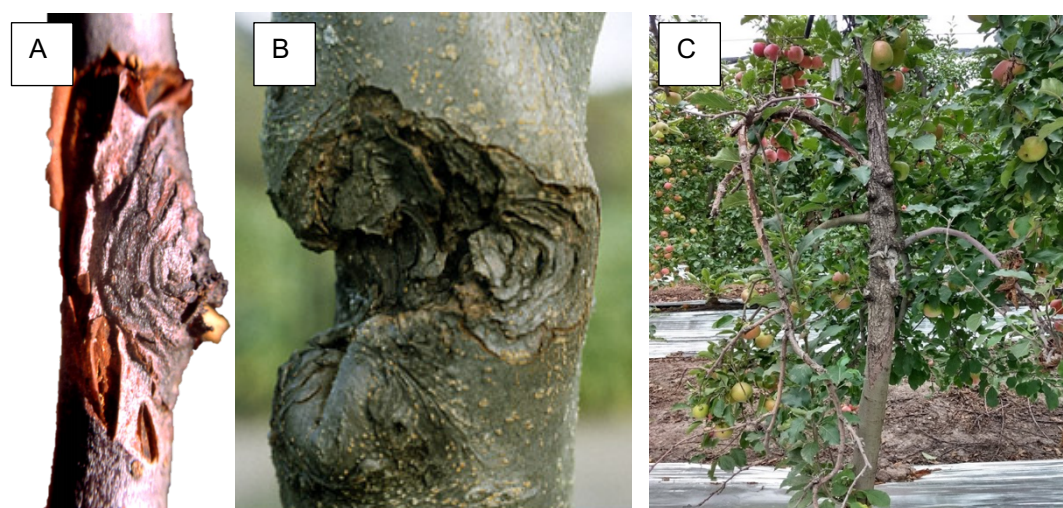


Figura 2.4. Cancros en manzanos: Cancro europeo del manzano (**A**) con síntomas de cancros elípticos (papiráceos= aspecto de papel) anaranjados en ramillas que muestra inicio de infección desde alrededor de la yema, y cancro anillado en tronco (**B**) que provocan estrangulamiento de ramas y troncos asociados a *Neonectria ditissima*; Cancro y muerte regresiva de manzanos (**C**) causado por *Diplodia seriata*. Fuente G. Díaz.

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. arborescens*, *A. infectoria* y *A. tenuissima* (Elfar *et al.*, 2018), ojo de buey 'bull's eye rot' causado por *Neofabraea vagabunda* (Figura 2.5) (Soto-Alvear *et al.*, 2013) y moho azul del fruto causado por *Penicillium expansum* (Latorre, 2004).

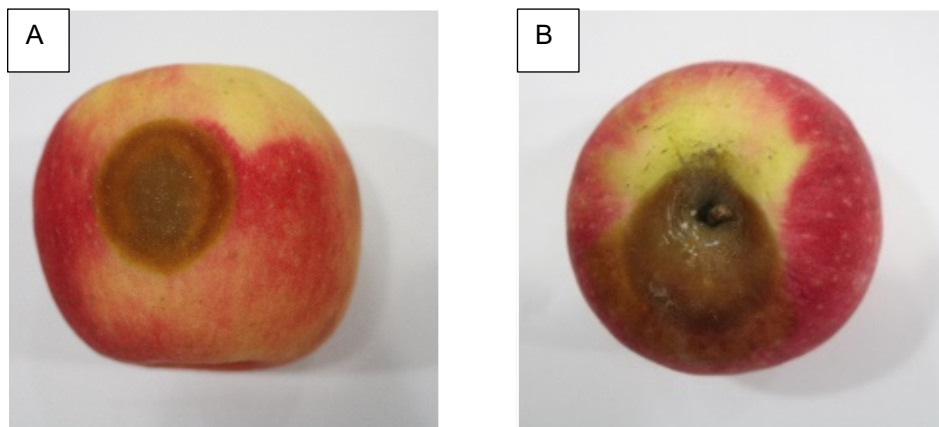


Figura 2.5. Manzanas con ojo de buey causado por *Neofabraea vagabunda* mostrando lesiones circulares pardas (intercalando un pardo oscuro y pardo claro) después de 90 días de almacenaje a frío. Lesión ecuatorial (A) y Lesión en zona peduncular. Fuente G. Díaz.

2.5. Etiología y epidemiología de la pudrición calicinal.

Botrytis cinerea Pers. es un hongo fitopatógeno de estilo de vida necrotrófico con un amplio espectro de hospederos, incluyendo 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 producir 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 o gris, que corresponden al signo de la enfermedad (Latorre, 2018). 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). Sin embargo, en frutos de manzano, la pudrición calicinal es la más amplia distribuida y sin importar la variedad, siendo una de las limitantes durante la cosecha y el almacenaje. Es más, recientemente, se reportó una alta presencia de pudrición calicinal en frutos cv. Cripps Pink en huertos comerciales durante precosecha en la Región del Maule causado por

Botrytis cinerea (Ferrada *et al.*, 2017). (Figura 2.6) (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).

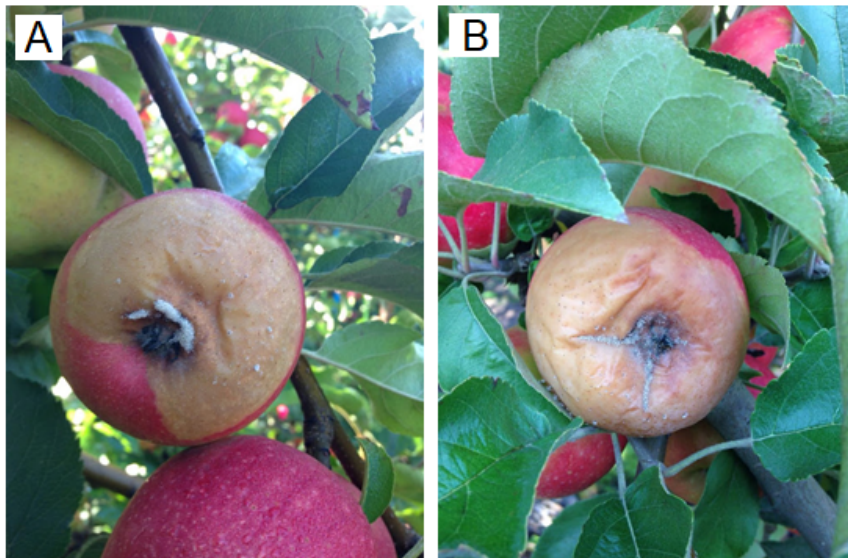


Figura 2.6. Manzanas cv. Cripps Pink con pudrición calicinal y signos de *Botrytis cinerea* durante precosecha en la Región del Maule. **A**, fruto con una pudrición que abarca un 85% la zona calicinal. **B**, fruto con una pudrición que abarca un 100% la zona calicinal (Ferrada *et al.*, 2017).

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 (Figura 2.7) (Sutton *et al.*, 2014), pudiendo desarrollar síntomas durante precosecha o durante el almacenaje. Por lo tanto, la infección ocurre en el huerto desde el periodo de floración (septiembre) hasta la maduración del fruto. Los restos florales son frecuentes sitios donde la infección se puede mantener a una tasa muy lenta (infección latente), para poder manifestarse en condiciones favorables en precosecha o durante postcosecha (Latorre, 2018).

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 las plantas de embalaje de manzanas (Latorre, 2018). La germinación de las conidias es influenciada por la presencia de agua libre o alta humedad relativa, condiciones clave para la germinación y penetración. 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 (Figura 2.7). El hongo *B. cinerea* no solo puede invadir la zona calicinal del fruto sino también la zona peduncular durante la cosecha, como durante el almacenamiento a 0°C, pudiendo colonizar la pulpa del fruto (Figura 2.6; Figura 2.7 y Figura 2.8) (Sutton *et al.*, 2014).

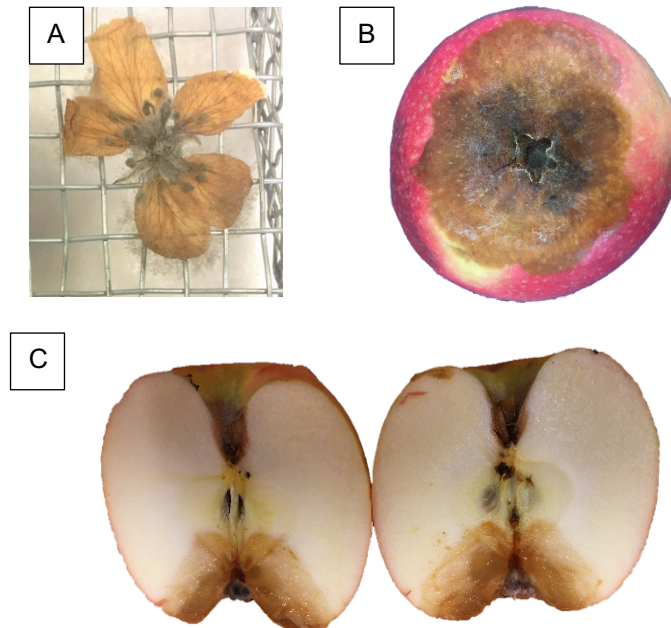


Figura 2.7. *Botrytis cinerea* desarrollándose en flores de manzano (A), y en manzanas con pudrición calicinal después de 90 días de almacenaje a 0°C (B y C). Fuente G. Díaz.

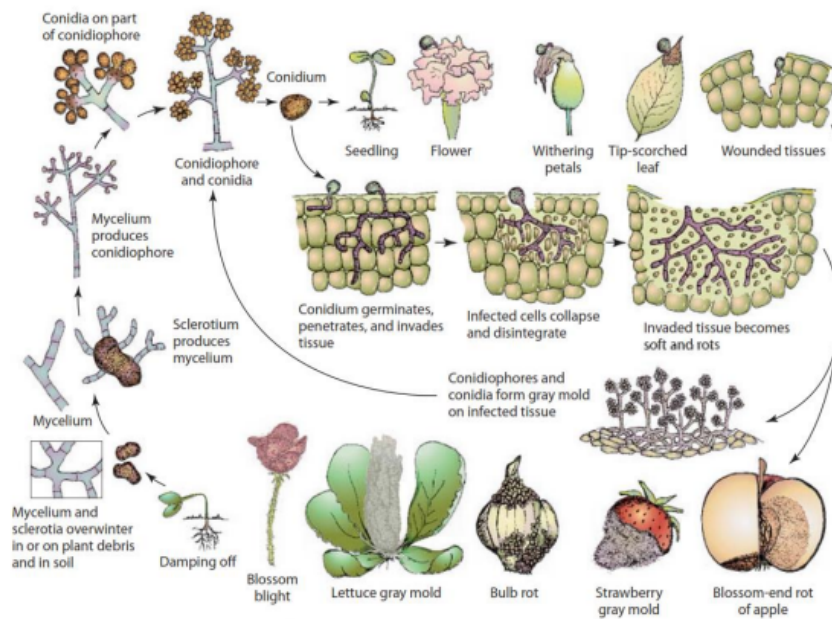


Figura 2.8. Ciclo de la pudrición gris en diferentes especies vegetales hospederos asociados al patógeno polífago fungoso *Botrytis cinerea* (Agris, 2007).

2.6. Morfología de *Botrytis cinerea*

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* (Figura 2.9) (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 se forman desde conidióforos que son erectos (aéreos), libres y ramificados, produciendo las conidias tipo racimos (Figura 2.9) (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 (Figura 2.7) (Latorre, 2018).

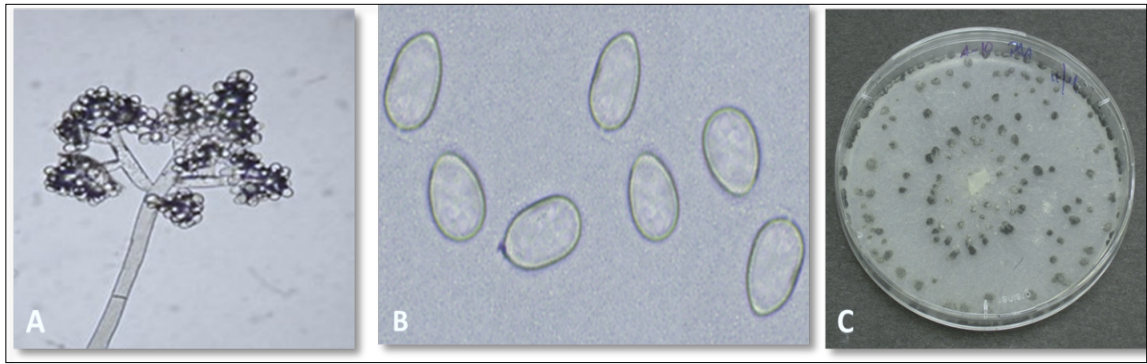


Figura 2.9. Estructuras de *Botrytis cinerea*. Conidióforo con producción de conidias en racimo (A), conidias hialinas y elipsoides (B) y esclerocios (C) de *B. cinerea* en medio de cultivo APDA. Bar = 100 μ m. Fuente G. Díaz.

2.7 Identificación de *Botrytis*

Durante los últimos 15 años de investigación se han descrito varias especies *Botrytis* afectando a diversos hospederos vegetales. La identificación morfológica es tradicionalmente utilizada, mediante las características de crecimiento del micelio y de características de los conidióforos y conidias. Sin embargo, en la actualidad, la incorporación de genes como G3PDH, HSP60, RPB2, NEP1 y NEP2 han permitido discriminar especies que son muy difíciles de poder diferenciar a nivel morfológico comparando secuencias en análisis de Blast con los respectivos especímenes tipo de las especies de *Botrytis* y a través de los análisis filogenéticos obtenidos con los genes mencionados (Staats *et al.*, 2005; Rupp *et al.*, 2017).

2.8. Especies de *Botrytis*.

Sobre la base de varios descriptores clásicos (por ejemplo, fenotípico, ecológico y genético), se sabe desde hace mucho tiempo que *B. cinerea* es una especie muy variable (Walker *et al.*, 2011). Más precisamente en Chile, se describió a la especie *B. prunorum* inicialmente afectando a flores

de ciruelos por (Ferrada *et al.*, 2016) y posteriormente causando pudriciones en kiwis y peras (Elfar *et al.*, 2016; Ferrada *et al.*, 2020). Recientemente, *B. prunorum* fue descrito causando atizamiento de flores de vid en Chile (Esterio *et al.*, 2020). 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). En la especie medicinal *Paris polyphylla*, con síntomas de moho gris, se aisló y describió a *B. polyphyllae* como nueva especie en China (Zhong *et al.*, 2019). En Alemania, se describió a *B. fragariae* como nueva especie causando moho gris en frutillas (Rupp *et al.*, 2017). En especies hortícolas del género *allium* se describió en China a *B. sinoallii* que se caracteriza por la producción de numerosos esclerocios pequeños en agar papa dextrosa. El análisis filogenético utilizó secuencias parciales de tres genes nucleares (G3PDH, HSP60 y RPB2) mostrando que *B. sinoallii* forma un linaje único, que está estrechamente relacionado con *B. squamosa* (Zhang *et al.*, 2010). En California EE.UU. describió en arándano y uva de mesa la especie *B. californica*, que está estrechamente relacionada genéticamente con *B. cinerea*, *B. pseudocinerea* y *B. sinoviticola* (Xiao *et al.*, 2016). *B. pseudocinerea* fue descrita en Francia causando moho gris en viñedos, caracterizándose por adaptarse menos a las bayas de vid maduras que *B. cinerea* y con diferencias significativas en los nichos ecológicos de las dos especies. De manera más general, el espectro de resistencia a fungicidas es uno de los únicos criterios fenotípicos de cualquier uso para distinguir entre las dos especies. en el caso de *B. pseudocinerea* la resistencia a fenhexamid, particularmente en la prueba de crecimiento micelial, y su hipersusceptibilidad a fenpropidina, fenpropimorf y en menor grado, inhibidores de la desmetilación de esteroides, es significativa, pero debe realizarse un análisis del espectro completo de resistencia o susceptibilidad en una prueba apropiada para diferenciar claramente las cepas HydR1 de las de *B. cinerea* con resistencia adquirida a fenhexamid (Walker *et al.*, 2011). Además, en China en el año 2014 se describió en el cultivo de *Vitis vinifera* a *B. sinoviticola* provocando moho gris. Con los ensayos realizados demostraron que *B. sinoviticola* penetra las hojas y bayas sólo a través de heridas. No así *B. cinerea* que ataca a su hospedero por propia acción enzimática o por heridas que facilitan su entrada (Zhang *et al.*, 2014).

En E.E.U.U en el cultivo de frutilla se identificó en el 2017 la especie de *B. mali* causando moho gris, dando como resultado un aislado de una sola espora de *Botrytis* de las afueras de Summerville, Carolina del Sur, y dos de Waldorf, Maryland, exhibieron morfologías de cultivo en agar papa dextrosa (PDA) diferentes de *B. cinerea*. Se evidenció un micelio aéreo más pronunciado que para los aislados de *B. cinerea*, con sólo esporulación irregular esparcida por toda la placa. Los conidios eran hialinos y ovoides a elipsoides redondeados (Dowling and Schnabel., 2017).

2.8.1 *Botrytis caroliniana* y *Botrytis cinerea*

En los estudios más recientes se ha descrito una nueva especie aislada en mora en el sur de carolina, los cuales revelaron a *B. cinerea* como el fenotipo esporulante y una nueva especie aún no descrita como el fenotipo que no esporula. La nueva *Botrytis* sp., fue descrita como *Botrytis caroliniana*, especie que está estrechamente relacionada genéticamente con *B. fabiopsis* y *B. galanthina*. La nueva especie es patógena en frutos de mora y hojas de poroto, lo que la distingue aún más de *B. galanthina*. La nueva especie formó colonias de color blanco a gris pálido con micelio aéreo corto y mechonado y produjo esclerocios negros en APD a 20° C (Li *et al.*, 2012).

El moho gris causado por *Botrytis* spp. es una enfermedad económicamente importante en cultivos de la frutilla cultivada (*Fragaria ananassa*) en todo el mundo, es por ello que, en la zona productora del condado de High Point, en el estado Carolina de Norte (E.E.U.U) se recolectó fruta que fue sintomática a esta enfermedad identificándose lesiones marrones que se agrandaban rápidamente y estaban cubiertas de masas de color verde-gris de esporas seguidas de una suave podredumbre. Para aislar el agente causal, la conidia fue raspada del fruto, suspendida en 1% Tween 20, esparcida en agar de agua enmendado con un 0,1% de ácido láctico, y las colonias emergentes fueron transferidas al medio de agar papa dextrosa (APD) (Fernández-Ortuño *et al.*, 2012), dando como resultado conidióforos y conidias de color gris a marrón identificando de esta manera a *B. cinerea* además de *B. caroliniana* según la secuencia de nucleótidos obtenida de GenBank Adhesión Nos. JF811593, JF811594 y JF811595) (Li *et al.*, 2012; Fernández-Ortuño *et al.*, 2012).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del estudio

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

3.2. Aislados de *Botrytis*

Se utilizaron 10 aislados de *Botrytis* obtenidos previamente desde frutos de manzana con pudrición calicinal (Ferrada et al., 2017). Los aislados se caracterizaron por incluir 5 aislados (Bci-PC-A1; Bci-PC-A6; Bci-TF-A22; Bci-TF-A23; Bci-TF-A29) de fenotipo de colonias grises de altos niveles de esporulación (ANE) y 5 aislados de fenotipo de colonias blancas (Bca-PC-A3; Bca-PC-A13; Bca-TF-A27; Bca-TF-A28; Bca-TF-A30) de bajos niveles de esporulación (BNE).

3.3. Identificación molecular y análisis filogenético de aislados de *Botrytis*

Con el objetivo de realizar la identificación molecular de los 10 aislados de *Botrytis*, se realizó una extracción de ADN desde cultivos puros de 7 días de edad en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD, 2%). Para la obtención de ADN genómico puro, se procedió a utilizar un protocolo del kit de extracción Plant Genomic DNA Miniprep (SigmaAldrich, MO, USA).

El ADN extraído de los 10 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 H₂ 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, Oxford) y alineadas usando Clustal X 2.0 (Conway Institute, DU, Irlanda). Se realizó una búsqueda en BLAST con las secuencias de los aislados de diferentes especies de *Botrytis* 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.

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'). Secuencias de la especie *Monilinia fructigena* aislado 9201 se utilizaron como secuencia de especies fuera de grupo ('outgroups') para enraizar los árboles filogenéticos.

3.4. Determinación de curva de crecimiento a diferentes temperaturas

Con el objetivo de determinar la temperatura óptima de crecimiento de los aislados fungosos de colonias grises (n=5 aislados) y colonias blancas (n=5 aislados), se utilizó un trozo (5-mm) de agar con crecimiento activo cada aislado de 7 días de edad bajo 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 cámaras de crecimiento con temperaturas de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40°C. Para ello, se utilizarán 3 repeticiones de cada aislado para las temperaturas mencionadas. Se realizó su seguimiento durante un periodo aproximado de 4 días consecutivos, hasta alcanzar el crecimiento máximo en las placas de los aislados. Este experimento fue repetido.

3.5. Diseño experimental

El ensayo de crecimiento *in vitro* de los aislados de *Botrytis* en APD a diferentes temperaturas, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), donde la unidad experimental correspondió a una placa Petri. Se utilizaron 5 repeticiones por aislado, donde se relacionó los aislados a través

de una regresión lineal entre el crecimiento micelial de 7 días (mm) y las temperaturas de incubación (0-40°C).

4. RESULTADOS

4.1. Identificación molecular

En el estudio realizado para los cinco aislados de *Botrytis* de colonias con el fenotipo de baja esporulación (Bca-PC-A3; Bca-PC-A13; Bca-TF-A27; Bca-TF-A28; Bca-TF-A30) se lograron similitudes del 99 al 100% con la especie tipo de *Botrytis caroliniana* aislados CA3 y WM4 con los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 cuando se compararon en el análisis de comparación de secuencias del GenBank (Blast).

En el caso de los aislados de colonias grises con el fenotipo de alta esporulación Bci-PC-A1, Bci-PC-A6, Bci-TF-A22, Bci-TF-A23 y Bci-TF-A29, el análisis de Blast del GenBank mostró una similitud del 100% para los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 con espécimen tipo de *Botrytis cinerea* aislado MUCL-87 mediante el análisis de Blast.

4.2. Análisis filogenético

El análisis de filogenético de máxima parsimonia de los genes concatenados de los genes G3PDH + HSP60 + RPB2 indicó que los aislados de baja esporulación se agruparon junto con los especímenes tipo (type) de *B. caroliniana* con un soporte del 100%, siendo cercanos a los cluster de *B. fabiopsis* y *B. galanthina*. Por otro lado, las especies de alta esporulación se agruparon con un 96% de soporte con los aislados tipos de *B. cinerea*, totalmente distantes de *B. caroliniana* (Figura 4.1).

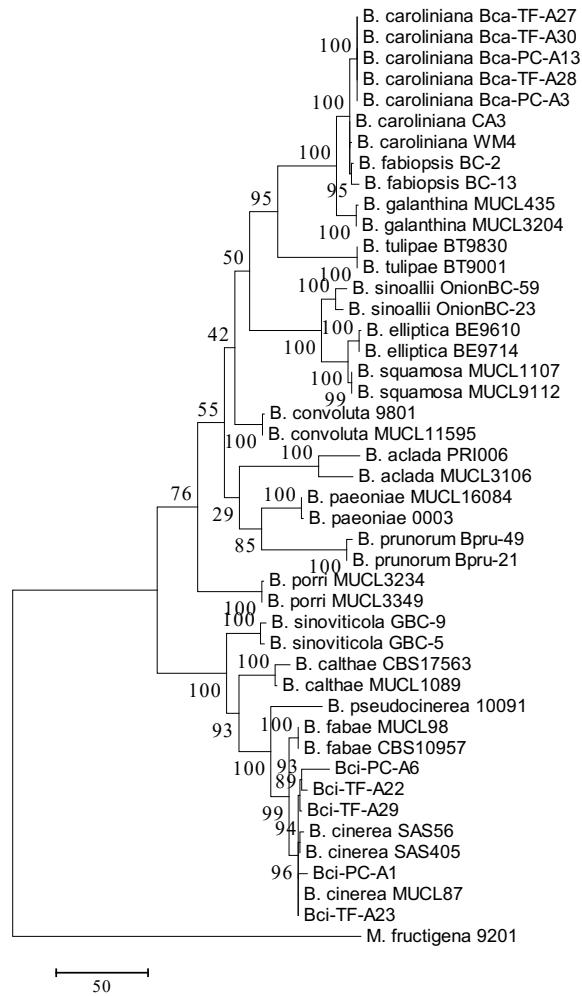


Figura 4.1. Árbol filogenético que muestra la cercanía evolutiva de las especies de *Botrytis*, mediante una prueba de máxima parsimonia en secuencias concatenadas de los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 de aislados de alta esporulación y de baja esporulación obtenidos desde manzanas con pudrición calicinal.

4.3. Efecto de la temperatura sobre especies de *Botrytis*

La temperatura es un factor predisponente para elevar la tasa de crecimiento de las diferentes especies de *Botrytis*. En el caso de la vid se ratificó la información debido a que la infección causada por conidias de *B. cinerea*, tanto en flores como en bayas maduras de uva de mesa dependió de la temperatura y del tiempo de incubación. Tanto la temperatura como la humedad ambiental han sido ampliamente reconocidas como factores determinantes en el desarrollo de la infección causada por *B. cinerea* en la vid (Latorre *et al.*, 2002), además se corrobora la temperatura optima de crecimiento de *B. cinerea* dando como resultado 20°C, La infección causada por *B. cinerea* en flores y bayas de uva de mesa ocurrió en un rango de temperatura de 0 a 30 °C, similar al informado previamente en uvas para vino Cabernet Sauvignon (Nair y Allen, 1993) en Australia o en uvas Red Seedless en California (Broome *et al.*, 1995) y coincidente con la respuesta a la temperatura in vitro, determinada con aislamientos chilenos de *B. cinerea* obtenidos de uva de mesa (Latorre y Rioja., 2002).

4.3.1 Curva de temperatura en aislados de *Botrytis caroliniana*

Los aislados de *B. caroliniana* mostraron un rango de crecimiento de temperatura entre los 0° y los 30 °C (Figura 4.2). La temperatura optima fue a los 20°C, obteniendo un rango entre 70 (aislado Bca-TF-A27) a 80 mm (aislado Bca-TF-A28) de crecimiento micelial entre los aislados. Ninguno de los aislados mostró crecimiento a 35°C y 40°C de incubación por 7 días.

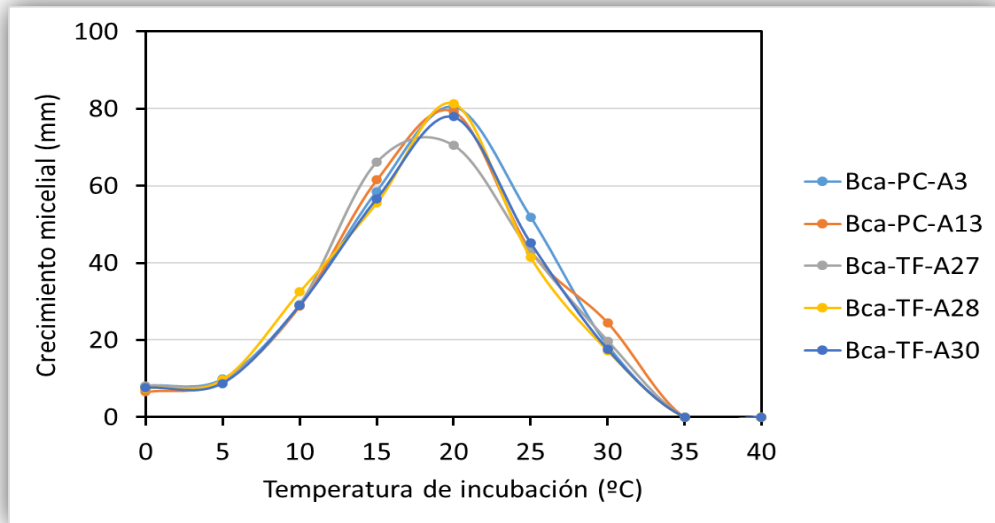


Figura 4.2. Curva de temperatura de aislados de *Botrytis caroliniana* a diferentes temperaturas de incubación.

4.3.2. Curva de temperatura en aislados de *Botrytis cinerea*

Los aislados de *B. cinerea* mostraron un rango de crecimiento de temperatura entre los 0° y los 30 °C (Figura 4.3). La temperatura óptima obtenida para los cinco aislados fue a los 20°C, alcanzando un crecimiento radial sobre los 80 mm de diámetro. Ninguno de los aislados mostró crecimiento a los 7 días de incubación a 35°C y 40°C.

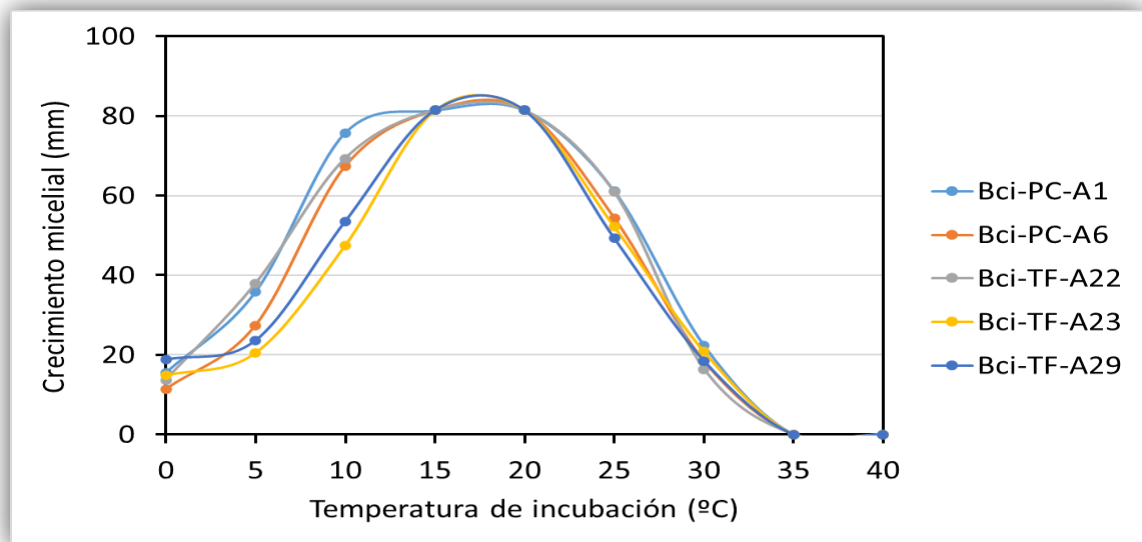


Figura 4.3. Curva de temperatura de aislados de *Botrytis cinerea* a diferentes temperaturas de incubación.

4.3.3. Comparación de crecimiento entre especies de *Botrytis*

Según los resultados de la Figura 4.4 se puede analizar que las curvas de temperatura para la especie *B. cinerea* presentó su mayor crecimiento entre las temperaturas 15°C y 20°C alcanzando diámetros radiales sobre los 80 mm en comparación con la especie de *B. caroliniana* la cual presentó su mayor crecimiento a la temperatura de 20°C alcanzando diámetros radiales de aproximadamente 78 mm, además se logra apreciar crecimiento micelial entre 0°C y 30°C, y un nulo crecimiento entre las temperaturas 35°C y 40°C para ambas especies. La especie de *B. cinerea* presenta un mayor crecimiento a 0°C que *B. caroliniana*.

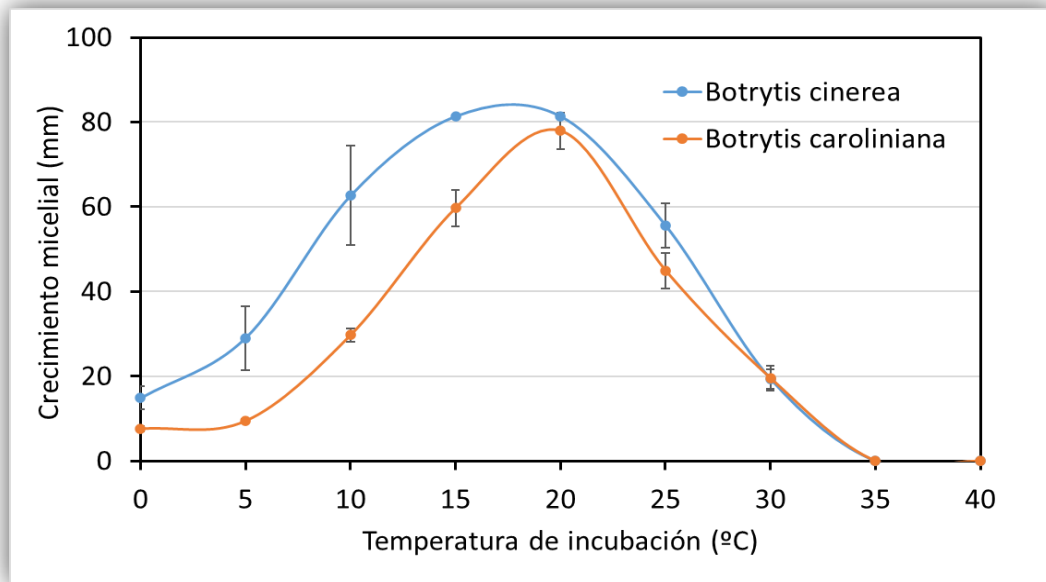


Figura 4.4. Curva de temperatura de *Botrytis cinerea* y *Botrytis caroliniana* a diferentes temperaturas de incubación.

5. DISCUSION

El presente estudio determinó la identificación molecular utilizando los genes G3PDH + HSP60 + RPB2 por medio de análisis filogenético a las especies *Botrytis caroliniana* y *B. cinerea* asociadas a la pudrición calicinal en manzanas. Además, *B. caroliniana* y *B. cinerea* mostraron diferencias fisiológicas obteniendo óptimos de temperatura diferentes. Este trabajo constituye la primera identificación y caracterización de *B. caroliniana* asociada a pudrición calicinal de manzanas en la Región del Maule, Chile.

Las infecciones por *Botrytis cinerea* ocasionan pudriciones de los frutos en huertos comerciales, y durante poscosecha, almacenaje y transporte a nivel nacional (Latorre, 2018) como internacional (Sutton *et al.*, 2014). El hongo *B. cinerea* ha sido identificado afectando a más de 60 diferentes plantas cultivadas de diferentes categorías taxonómicas, incluyendo el manzano (Acuña, 2010; Sutton *et al.*, 2014). En el presente trabajo se caracterizó a aislados de *B. cinerea* causando pudrición calicinal ratificando trabajos previos que describieron a la pudrición calicinal en manzanas en poscosecha, afectando principalmente los cultivares Fuji, Gala, Granny Smith asociados a *B. cinerea* (Álvarez *et al.*, 2004; Latorre, 2018; Ferrada *et al.*, 2017). 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 peras (Latorre, 2018; Ferrada *et al.*, 2020). Por lo tanto, este trabajo es la primera identificación de la especie *B. caroliniana* afectando una especie frutal en Chile.

A nivel internacional, la pudrición calicinal ha sido descrita en E.E.U.U asociados a *B. cinerea* y *B. mali* (Etebarian *et al.*, 2010; Xiao y Kim, 2013; Sutton *et al.*, 2014). Aunque, *B. mali* es considerada una especie rara o escasa (Sutton *et al.*, 2014). De otra forma, en Alemania han descrito a la especie *B. cinerea* y *B. pseudocinerea* causando pudriciones de manzana, destacando que *B. pseudocinerea* es preferentemente asociada al atizonamiento de las flores de manzanos (Weber y Draller, 2013; Weber *et al.*, 2018). En Uruguay se describió a *B. cinerea* causando pudrición calicinal (Mondino *et al.*, 2009). Sin embargo, todos los trabajos describen que *B. cinerea* es la especie predominante de *Botrytis* causando pudrición calicinal de la manzana (Xiao y Kim, 2013; Weber y Draller, 2013; Weber *et al.*, 2018; Sutton *et al.*, 2014).

La temperatura es un factor determinante en conjunto con el agua libre o humedad relativa para proporcionar el ambiente para producir el inóculo para desarrollar infecciones en flores o frutos (Sutton *et al.*, 2014; Latorre, 2018). Los aislados de *B. caroliniana* y *B. cinerea* se desarrollaron entre un rango de 0 y 30°C. Estos resultados obtenidos coinciden con el trabajo de Latorre *et al.* (2002), quienes obtuvieron desarrollo de infecciones por *B. cinerea* en flores y bayas de vides en un rango de 0 y 30 °C, y con un óptimo de infección a los 20°C. Es más, Latorre (2004) menciona que 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. Coincidiendo con el actual trabajo donde la temperatura optima de los aislados de *B. cinerea* fue entre los 15 y 20°C. Por otro lado, en el presente trabajo se establece que la temperatura optima de los aislados de *B. caroliniana* fue a los 20°C. Sin embargo, ambas especies del presente estudio tienen la capacidad de crecer a 0°C.

Por otra parte, Staats *et al.*, (2005) y Rupp *et al.*, (2017), han incorporado en los estudios de *Botrytis* a nivel molecular genes como G3PDH, HSP60, RPB2, NEP1 y NEP2, los que han permitido describir especies que son muy difíciles de poder diferenciar a nivel morfológico lo cual ha permitido obtener diferencias genéticas entre las especies y de este modo poder diferenciar las especies de *Botrytis* descritas en este estudio. De este modo, utilizando los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 se han descrito a las especies *B. prunorum* en kiwis, peras y ciruelo en el valle central de Chile (Elfar *et al.*, 2017; Ferrada *et al.*, 2016; Ferrada *et al.*, 2020). Por otro lado, estudios realizados en Estados Unidos se ha descrito a *B. caroliniana* causando pudriciones de frutos de mora y frutilla en el Sur de Carolina (Fernández- Ortuño *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). También se describió en el mismo país en el cultivo de frutillas a *B. mali* asociado a pudrición gris (Dowling y Schnabel, 2017). En California se describió a *B. californica* asociados a pudrición gris en arándanos y uva de mesa (Saito *et al.*, 2016). En China se identificaron a *B. sinoalii*, y *B. sinoviticola* afectando a cebollas (Zhang *et al.*, 2010) y uva de mesa con pudrición gris (Zhou *et al.*, 2014), respectivamente. En Europa, se describieron a *B. pseudocinerea* en viñedos franceses (Walker *et al.*, 2011), y en Alemania se describió a *B. fragariae* (Rupp *et al.*, 2017). Por lo tanto, para tener una adecuada identificación de especies de *Botrytis* es necesario realizar análisis utilizando al menos los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 (Staats *et al.*, 2005; Rupp *et al.*, 2017).

El hongo *B. cinerea* es necrotrófico que tiene la capacidad de colonizar tejidos senescentes o muertos (Sutton *et al.*, 2014; Latorre, 2018). (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 para posteriormente desarrollar las pudriciones

durante almacenaje (Sutton *et al.*, 2014; Latorre, 2018). Por lo tanto, es importante realizar un manejo integrado que incorpore manejos culturales apuntados a la limpieza del huerto (eliminación de residuos de frutos en el suelo como en los árboles, eliminación de malezas entre otros), una fertilización equilibrada (evitar emboscamiento), aplicaciones de fungicidas comerciales y biocontroladores durante precosecha (floración-precosecha) y fungicidas de poscosecha permiten lograr una adecuada protección de los frutos.

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 caroliniana* y *B. cinerea*.
- Las especies *B. caroliniana* y *B. cinerea* crecen a temperaturas entre 0°C y 30°C.

7. BIBLIOGRAFÍA

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

Álvarez, M., Pinilla, B., y Herrera, G. 2004. Enfermedades del manzano. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-La Platina). Santiago, Chile. 71p

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

ASOEX (Asociación De Exportadores De Frutas De Chile, A.G, Chile). 2019. Temporada De Exportaciones De Frutas Chilenas 2018-2019 Cierra Con Un Alza De 16% En Los Envíos A China- Hong-kong. Recuperado de: <https://www.asoex.cl/component/content/article/25-noticias/665-temporada-de-exportaciones-de-frutas-chilenas-2018-2019-cierra-con-un-alza-de-16-en-los-envios-a-china-hong-kong.html>.

Atkinson, C.J., Taylor, L., Kingswell, G. 2001. The importance of temperature differences, directly after anthesis, in determining growth and cellular development of *Malus* fruits. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 76: 721-731.

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.

Broome, J.C.; J.T. English; J.J. Marois; B.A. Latorre, and J.C. Avilés. 1995. Development of an infection model for *Botrytis* bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature. *Phytopathology* 85: 97-102.

Couvillon, G.A. 1995. Temperature and stress effects on rest in fruit trees: A review. *Acta Hortic.* 395: 11-19.

Díaz, G.A, Mostert, L., Hallen, F., Lolas, M., Gutierrez, M., Ferrada, E., and Latorre B.A. 2019. *Diplodia seriata* Associated with Botryosphaeria Canker and Dieback in Apple Trees in Chile. Plant Disease 103:1025.

Dowling, M. E., and Schnabel, 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., Tundzyski, 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 102:2158-2169.

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

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.

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

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

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., Naranjo, P., Briceño, E.X., Lolas, M., and 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.

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.

Keller, M., Viret, O., and Cole, F. M. 2003. *Botrytis cinerea* infection in grapes flowers: Defense reaction, latency and disease expression. *Phytopathology* 93:316-322.

Lakso, A.N. 1994. Apple. En: *Environmental physiology of fruit crops; Vol 1, Temperate crops*, pp. 3-42. Eds. B. Schaffer y P.C. Andersen. CRC Press, Boca Raton.

Latorre, B.A. y M.E. Rioja. 2002. Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. *Cien. Inv. Agr. (Chile)* 29:67-72.

Latorre, B. A., Rioja. M. E. y Lillo. C. 2002. Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. Vol 29, N°3. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 8p.

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

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

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

Li, X., Fernández-Ortuño, Chai, W., and Schnabel, G. 2012. Identification and prevalence of *Botrytis* spp. from blackberry and Strawberry fields of the Carolinas. *Plant Disease* 92:1634-1637.

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

Martínez, M.A. y Moreno, Z.Y. 2008. Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos preventivos para la protección de cultivos. Preventivos para el control de *Botrytis* en condiciones semicontroladas. Universidad Javeriana.

Mondino, P.; Di Masi, S.; Falconí, C.; Montealegre, J.; Henríquez, J.L.; Nunes, C.; Salazar, M.; Stadnik, M; Vero, S., y Usall, J. 2009. Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha. Departamento de Publicaciones. Fagro. Montevideo 67p.

Nair, N.G and R.N. Allen. 1993. Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Mycol. Res.* 97: 1012-1014.

Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA) y Centro de información de recursos naturales (CIREN). (Julio de 2019). *Catastro frutícola*. (M. O. Patricia Larragaña., Ed.) Recuperado el 24 de Septiembre de 2019, de Principales resultados Región del Maule 2019.: https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2019/09/catastro_maule.pdf

Pinilla, B. (Septiembre de 2013). Pomáceas, Boletín Técnico. Principales enfermedades de las pomáceas, *xll(5)*. (j. Yuri, & V. Lepe, Edits.) Talca, Chile.

Pinilla, B., y Alvarez, M. (s.f.). Frutales y Viñas. Obtenido de Pudrición en cámaras frigoríficas: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR23489.pdf>

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. *Appl Environ Microbiol* 83:e00269-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00269-17>.

Saito, S., D. Margosan, T.J. Michailides and C.L. Xiao. 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.

Staat, M., van Baarlen, P., and 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.

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, B. T., Aldwinckle, H., Agnello, A., and 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., and Kumar, S. 2011. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution* 28:2731-2739.

Tromp, J., and Wertheim, S.J. 2005. Fruit growth and development, pp. 240-266. En: *Fundamentals of Temperate Zone Tree Fruit Production*. Eds. J. Tromp, A.D. Webster y S.J. Wertheim. Backhuys Publishers, Leiden.

Tromp, J. 1997. Maturity of apple cv. Elstar as affected by temperature during a sixweek period following bloom. *J. Hortic. Sci.* 72: 811-819.

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.

Weber, R.W.S., and Dralle, N. 2013. Fungi associated with blossom-end rot of apples in Germany. *European Journal of Horticultural Science* 78: 97-105.

Weber, R.W.S., Raddatz, C. and Kutz, S. 2018. Relative abundance and fungicide resistance patterns of *Botrytis cinerea* and *B. pseudocinerea* on apple in Northern Germany. *J. Plant Disease. Prot.* **125**, 501–504.

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.

Yuri, J.A., Sepúlveda, A., y Arenas, L. 2019. *Clima y Calidad de Manzanas*. Ediciones Universidad de Talca. 93 p.

Zhang, L., Zhou, Y. J., Li, G. Q., Yang, L., Jiang, D. H., Zhuang, W. Y., and Huang, H. C. 2010. *Botrytis sinoallii*, a new species of the gray mold pathogen on *Allium* crops in China. *Mycoscience* 51:421-431.

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*, 106:1, 43-56.