



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
AGRÍCOLA

IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis* sp.
ASOCIADOS A BERRIES Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Presenta:

Viviana Alexandra Carvajal Salazar

Bajo la supervisión de: Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz

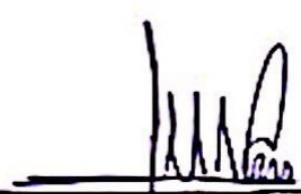


IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis* sp.

ASOCIADOS A BERRIES Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS

Tesis realizada por Viviana Alexandra Carvajal Salazar bajo la dirección del Comité Asesor Indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de: **MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA.**

DIRECTOR:



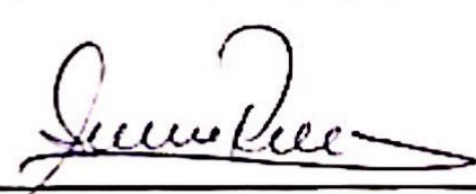
DR. MIGUEL ÁNGEL SERRATO CRUZ

CO-DIRECTOR:



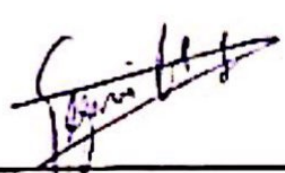
DR. ÁNGEL REBOLLAR ALVITER

ASESORA:



DR. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR:



DR. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
AGRADECIMIENTOS	x
DEDICATORIAS	xi
DATOS BIOGRÁFICOS	xii
RESUMEN	13
ABSTRACT	13
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	14
1.1 Justificación	15
1.2 Objetivos	16
1.3 Hipótesis	16
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA	17
2.1 Taxonomía y diversidad	17
2.2 Ecología y epidemiología	18
2.3 Ciclo biológico	19
2.4 Especies reportadas en berries	20
2.5 Manejo integrado del moho gris	22

2.6 Técnicas moleculares para la identificación de especies de <i>Botrytis spp.</i>	23
2.7 Identificación molecular basada en la reconstrucción filogenética de <i>Botrytis cinerea</i>	24
2.8 Modo de acción de fungicidas y resistencia en <i>Botrytis</i>	26
2.9 Resistencia a fungicidas en <i>Botrytis sp</i>	27
2.10 Técnicas de diagnóstico de la resistencia a fungicidas	30
2.11 Evaluación de la resistencia a fungicidas con el uso de dosis discriminatorias	32
2.12 Literatura citada	33
CAPÍTULO 3. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE <i>Botrytis sp.</i> ASOCIADOS A BERRIES Y SENSIBILIDAD FUNGICIDA	43
Resumen	44
Abstract	44
Introducción	43
Materiales y métodos	47
Colecta de aislamiento de <i>Botrytis sp.</i>	47
Obtención y purificación de aislamientos	48
Identificación molecular y filogenética	55
Secuenciación	56
Análisis filogenéticos	56

Perfil de resistencia de aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> a fungicidas de uso común en berries	57
Análisis de datos	59
Resultados y Discusión	59
Conclusiones	73
Literatura citada	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de <i>Botrytis</i> reportadas causando pérdidas significativas, asociadas con berries en el mundo.	18
Cuadro 2. Técnicas para la identificación molecular de <i>Botrytis cinerea</i> basada en iniciadores específicos o universales.	25
Cuadro 3. Fungicidas autorizados por Aneberries (2017) para el control de <i>Botrytis cinerea</i> para frambuesa, fresa y zarzamora en México.	31
Cuadro 4. Información general de los aislados de <i>Botrytis</i> sp. (anamorfo), colectados por Viviana Alexandra Carvajal Salazar de frutos provenientes de berries.	48
Cuadro 5. Iniciadores usados para la amplificación por PCR y secuenciación de diferentes regiones para la identificación molecular de aislados de <i>Botrytis</i> sp. obtenidos de cultivos de berries de los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán.	54
Cuadro 6 Protocolos de PCR de los iniciadores empleados para la amplificación.	55
Cuadro 7. Dosis discriminatorias de fungicidas usadas para determinar el perfil de resistencia de aislamientos de <i>B. cinerea</i> obtenidos de berries a los fungicidas Azoxistrobin, Fenhexamida, Iprodiona y Pirimetanil.	57
Cuadro 8. Relación de aislados comparados con las secuencias depositadas en el GENBANK.	59
Cuadro 9. Estadística descriptiva del porcentaje de inhibición de fungicidas sobre aislamientos de <i>B. cinerea</i> de frambuesa, fresa y zarzamora.	65

Cuadro 10. Porcentaje de Sensibilidad de ochenta aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> a cuatro fungicidas de uso común para las zonas productoras de berries en México.	69
Cuadro 11. Clasificación de los aislamientos según su resistencia de 1 a 4 grupos químicos.	70
Cuadro 12. Clasificación de los aislamientos con SNPs sometidos a dosis discriminatoria de cada fungicida.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama ciclo de vida de <i>Botrytis cinerea</i> . Elaborado por Viviana Carvajal 2019.	20
Figura 2. Ubicación de los estados donde se realizaron las colectas de frutos asintomáticos de frambuesa, fresa y zarzamora.	46
Figura 3. Alineamiento de las secuencias de los aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> de fresa y zarzamora mostrando la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs).	60
Figura 4. Árbol filogenético construido mediante el método de inferencia bayesiana que muestra relación genética basado en secuencias del espacio interno transcrito (ITS) de <i>Botrytis cinerea</i> en cultivos de fresa y zarzamora en Guanajuato, Jalisco y Michoacán, México.	61
Figura 5. Árbol filogenético mediante el método inferencia bayesiana que muestra relación genética basada en secuencias de gliceraldehido 3 fosfato (G3PDH) de <i>Botrytis cinerea</i> en cultivos de fresa y zarzamora en Guanajuato, Jalisco y Michoacán.	62
Figura 6. Comparación de las distribuciones del crecimiento relativo (CR) de <i>B. cinerea</i> originadas por exposición a dosis discriminatorias de fungicidas: Amistar (Azoxistrobin: 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$); Elevat (Fenhexamida: 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$); Scala (Pirimetanil: 2.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$); Rovral (Iprodona: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$).	64
Figura 7. Distribución del crecimiento relativo de <i>B. cinerea</i> a una dosis discriminatoria: A: Iprodona (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$); B: Fenhexamida; (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$); C: Azoxistrobin (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$); D: Pirimetanil (2.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$).	66

Figura 8. Comparación del crecimiento relativo por fungicida y cultivo: A: Fenhexamida; b: Iprodiona; C: Azoxistrobin; D: Pirimetanil. Aislamientos provenientes de los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo selecto de estudiantes de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por haber sido mi Alma Mater durante mi formación de estudio de maestría, por brindarme gran crecimiento a nivel personal y profesional.

A mi comité asesor Dr. Ángel Rebollar Alviter, Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz y Dr. Juan Porfirio Legaria Solano; quienes han sido el pilar fundamental de este trabajo.

A la Dra. Malgorzata Jedryczka por ser un gran ser humano y acogerme durante mi estancia internacional.

DEDICATORIA

A Dios por ser el autor principal de todo lo que soy, por iluminar mi camino cuando lo he necesitado, por darme sabiduría y entendimiento para realizar este trabajo. A mi madre por la labor que hizo en mí, por creer siempre y apoyarme, por enseñarme los valores de una buena familia. A mi padre por creer y confiar. A mis hermanas, por ser mis compañeras de vida, por estar a mi lado y escucharme en los momentos de soledad. A Sarita por ser una hermanita más para mí. A mis abuelitas por transmitirme su tranquilidad, por sus enseñanzas cada vez que comparto con ellas y sobre todo por iluminar mi sendero. A mis tías: Blanca, Ana, Paty por brindarme su apoyo incondicional durante mi vida, por ser una luz más en mi camino.

A todos mis amigos por su gran apoyo y amistad incondicional.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Viviana Alexandra Carvajal Salazar
Fecha de nacimiento	7 de Julio de 1990
Lugar de nacimiento	Manizales, Caldas, Colombia
Profesión	Ingeniera Agrónoma
Cédula profesional	17209-332917

Desarrollo académico

Licenciatura	Ingeniería Agronómica. Universidad de Caldas, Colombia (2013)
Maestría	Ciencias en Biotecnología Agrícola Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México (2019).

IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis* sp. ASOCIADOS A BERRIES Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS
PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF ISOLATES OF *Botrytis* sp. ASSOCIATED TO BERRIES AND SENSITIVITY TO FUNGICIDES

RESUMEN

El moho gris causado por *Botrytis cinerea* (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*), es la segunda enfermedad de importancia mundial, ataca a especies de berries en México dejando pérdidas hasta del 50 %, el patógeno puede atacar el cultivo en todos los estados de desarrollo y logra infectar cualquier parte de la planta. Una de las estrategias de control es la aplicación de productos químicos, aunque su uso cada vez se recomienda menos por la frecuente aparición de cepas del patógeno con resistencia genética. La identificación de especies de *Botrytis* y la sensibilidad a los fungicidas es una información básica para fortalecer acciones por implementar en la producción de frutillas en México. El objetivo de esta investigación fue identificar filogenéticamente los aislados de *Botrytis* spp. colectados de cultivos de frambuesa, fresa y zarzamora en los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán, México, así como la susceptibilidad a los fungicidas comerciales: Azoxistrobin, Fenhexamida, Iprodiona y Pirimetanil. Treinta y seis aislados de *Botrytis* sp. se usaron para identificación a nivel molecular mediante reconstrucción filogenética del espacio transcrito interno del rDNA (ITS) y genes *Housekeeping* G3PDH, RPB2, HSP60, NEP1 y NEP2; con ITS y G3PDH se constató que se trataba de *B. cinerea* con un 99 y 100 % de identidad, respectivamente. Para la zona productora de berries en Guanajuato, Jalisco y Michoacán, México se puede determinar que el gen G3PDH fue el más informativo. Para la evaluación de la sensibilidad a fungicidas se utilizaron 80 aislamientos, se evaluó el crecimiento del micelio y mediante un análisis de los datos con la prueba Kruskal-Wallis, los ensayos de sensibilidad indicaron que los aislados fueron resistentes (59 %) a Azoxistrobin (perteneciente al grupo químico Metoxiacrilatos) y a Pirimetanil (del grupo Anilino pirimidinas), pero susceptibles a Dicarboxamidas e hidroxianilidas.

PALABRAS CLAVE: Resistencia fungicidas, filogenia, iniciadores específicos.

ABSTRACT

Gray mold caused by *Botrytis cinerea* (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*), is the second disease of importance global, attacks species of berries in Mexico causing losses of up to 50 %, the pathogen can attack the crop in all stages of development and achieves infect any part of the plant. Most of the control strategies is the application of chemical products, although its use is increasingly recommended less by the frequent appearance of strains of the pathogen with genetic resistance. The identification of *Botrytis* species and the sensitivity to fungicides is a basic information to strengthen actions to be implemented in strawberry production in Mexico. The objective of this research was to identify phylogenetically the isolates of *Botrytis* spp. collected from strawberry, raspberry and blackberry crops in the provinces of Guanajuato, Jalisco and Michoacan, Mexico, as well as susceptibility to the commercial fungicides Iprodione, Pyrimethanil, Azoxystrobin and Fenhexamide. thirty-six isolates of *Botrytis* sp. identified by we molecular level through phylogenetic reconstruction of the internal transcribed space of the rDNA and *Housekeeping* G3PDH, RPB2, HSP60, NEP1 and NEP2 were used; like *Botrytis cinerea* with 99 and 100 % identity. For the area producing berries in Guanajuato, Jalisco and Michoacan, Mexico, it can be determined that the G3PDH gene is the most informative. For the evaluation of the fungicide sensitivity, 80 isolates were used, the mycelium growth was evaluated and by means of an exploratory analysis of the data, it was determined that the Kruskal-Wallis test to compare the medians was the most efficient. The sensitivity tests indicated that the isolates are resistant (59 %) to Azoxistrobin belonging to the chemical group Methoxyacrylates and Pyrimethanil, to the anilino pyrimidines but susceptible to dicarboxamides and hydroxylanilides.

KEY WORDS: Fungicide resistance, phylogeny, specific primers.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción mundial de berries (arándano, frambuesa, fresa y zarzamora) se ha incrementado exponencialmente en China, Estados Unidos, Egipto, Países bajos, Polonia y México. México es el segundo país, seguido de Polonia, con un 16.3 % de las exportaciones mundiales, correspondiente a 140 millones de dólares durante 2017 (COMTRADE, 2017). El 96 % del volumen producido de berries y el 97 % del valor total de la producción nacional los cubre Baja California, Guanajuato, Jalisco y Michoacán (SIAP, 2016). La curva de crecimiento de la actividad productiva relacionada con los berries en México está directamente ligada a la problemática fitosanitaria. Entre las enfermedades fungosas importantes sobresalen las ocasionadas por varias especies de *Botrytis* spp., especialmente *B. cinerea*, hongo que tiene la capacidad de infectar a más de 235 hospedantes; se trata de un patógeno que genera serias pérdidas económicas, por ejemplo, en la producción de fresa es cercana al 50 % o más (Davidson *et al.*, 2007).

En plantaciones de berries se reconoce un complejo de 30 especies de *Botrytis* (Hyde *et al.*, 2014). La plasticidad genética de las poblaciones fúngicas de *Botrytis* (Biémont, 2010) y la alta variabilidad reportada para *B. cinerea* (Van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1993), se atribuye a fenómenos de heterocariosis y aneuploidía (Williamson *et al.*, 2007), lo cual se relaciona con la resistencia genética de estos hongos a fungicidas (Fillinger y Elad, 2016). Una manera efectiva de detección de variabilidad genética de hongos asociada con resistencia genética es mediante identificación molecular, con la cual ha sido posible reconocer aproximadamente 30 especies, un híbrido y un complejo de especies (Beever y Weeds, 2004). En la última década, con nuevas técnicas moleculares se han detectado al menos cuatro especies de *Botrytis* en berries (Li *et al.*, 2012) y uno de los marcadores de alta resolución son los SNPs con los que se ha facilitado identificar un gran número de polimorfismos de un solo nucleótido (Schumacher *et al.*, 2013).

En cuanto a la aplicación de fungicidas contra *Botrytis* spp, algunos de ellos han fracasado debido a la plasticidad genética del patógeno, razón por la cual cada vez es menos recomendable y más restringida su utilización (Williamson *et al.*, 2007), ya que representan un alto riesgo para el desarrollo de resistencia genética del hongo; entre estos fungicidas figuran las Dicarboxamidas y los Fenilpirroles (Fillinger y Elad, 2016). De los fungicidas que se recomiendan para el control de *B. cinerea* en las plantaciones de berries en las regiones Occidente y Centro Occidente de México destacan Fenhexamida, Ciprodinil Fludioxonil y Boscalid (Rebollar-Alviter, comunicación personal). Estos productos pertenecen a los grupos químicos hidroxianilidas, anilinopirimidinas, fenilpirroles y carboxamidas (Glättli *et al.*, 2011), grupos caracterizados por su diferente modo de acción, con niveles de riesgo medio a alto en el desarrollo de resistencia (FRAC, 2011). Referencias de campo indican uso indiscriminado de productos y dosificaciones de estos fungicidas aplicados a berries en las principales zonas productoras de México y no se tiene conocimiento sistemático de la efectividad de estos agroquímicos contra *Botrytis* spp, y si estos han contribuido al desarrollo de resistencia genética del patógeno en las condiciones ambientales en las que los berries se están cultivando en México (Álvarez-Medina *et al.*, 2017).

1.1 Justificación

Considerando que México es el cuarto productor de berries a nivel mundial, es necesario conocer los agentes causales de enfermedades clave que impactan la producción, postcosecha y comercialización, como las causadas por especies de *Botrytis* sp., particularmente las asociadas con incidencia del moho gris en berries. Asimismo, dado lo intensivo de estos cultivos y la demanda internacional, el uso de fungicidas de diferente modo de acción en los sistemas de producción convencional ha derivado en falta de eficacia en campo, lo cual resulta en pérdidas económicas para el productor. Realizar estudios que diagnostiquen el estado de la resistencia a fungicidas en las especies de *Botrytis* sp. que inciden en berries, brindará información básica para la toma de decisiones en campo y

optimizar las aplicaciones, eliminando o dejando de usar ingredientes activos que ya no son eficaces.

1.2 Objetivos

Objetivo general

Identificar los aislados de *Botrytis* spp. presentes en frambuesa, fresa y zarzamora para evaluar la sensibilidad a fungicidas de uso común en los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán (México).

Objetivos específicos

Caracterizar filogenéticamente la especie de *Botrytis* sp. asociada con berries en Guanajuato, Jalisco y Michoacán.

Determinar el perfil de resistencia de la especie más frecuente a los fungicidas Fenhexamida, Iprodiona Pirimetanil y Azoxystrobin.

1.3 Hipótesis

General

El agente asociado con la pudrición gris en los berries importantes que se cultivan en México es *B. cinerea* y existen aislamientos con sensibilidad a fungicidas de uso común.

Específicas

La especie del género *Botrytis* asociada con frambuesa, fresa y zarzamora en las regiones productoras de Guanajuato, Jalisco y Michoacán es *B. cinerea*.

Existe insensibilidad de los aislados de *B. cinerea* a los fungicidas Iprodiona, Azoxistrobin, Fenhexamida y Pirimetanil.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Taxonomía y diversidad

Las especies de *Botrytis* spp. son hongos *Ascomycota* de la clase *Leotiomycetes*, orden *Helotiales* y la familia *Sclerotiniaceae* (NCBI, 2018). El género *Botrytis* se describió por primera vez por Pier Antonio Micheli y Persoon (1729), quienes lo catalogan en el libro "Nova Plantarum Genera". La mayoría de las especies fueron establecidas por Hennebert (1973) en el cual incluyó 22 especies Groves y Loveland (1953) y Beever y Weeds (2004). Este género está muy relacionado con *Sclerotinia*, con las proteínas codificadas por los genomas de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* con un 83 % de identidad (Amselem *et al.*, 2011).

El género *Botrytis* comprende actualmente 30 especies bien descritas, un híbrido (*B. allii*) y un complejo de especies (Hyde *et al.*, 2014). Anualmente se siguen identificando nuevas especies, como *B. fragariae*, patógena en fresas (Rupp *et al.*, 2017), *B. euroamericana* infectando peonía y uva (Lorenzini *et al.*, 2019). Indudablemente, la especie más común e importante es *B. cinerea*, la cual puede infectar más de 1400 especies de plantas entre ellas monocotiledóneas, dicotiledóneas, gimnospermas, pteridófitas, briófitas y macroalgas (Elad *et al.*, 2016).

Todas las especies de *Botrytis* muestran la característica morfológica que dio origen al nombre del género: la botryosa, o forma de racimo de uva de los conidióforos (los conidióforos llevan racimos de macroconidios que se asemejan a racimos de uvas). El tamaño y forma de los macroconidios ha sido utilizado repetidamente como criterio para distinguir especies; al igual que el número, tamaño de los esclerocios y la morfología del micelio (Jarvis, 1977).

Botrytis produce numerosos conidios en las puntas de los conidióforos ramificados (Frances *et al.*, 2016). En general, los conidios tienen una vida corta,

su tiempo de supervivencia depende de la temperatura, la humedad, la actividad microbiana y la exposición a la luz solar (Nassr y Bakarat, 2013). En condiciones favorables, como los períodos de lluvia interrumpidos en la primavera, los esclerocios "germinarán" para producir micelio y conidios. Estos esclerocios son la fuente de infecciones tempranas al comienzo de la temporada de crecimiento (Hsiang y Chastagner, 1992).

Cuadro 1. Especies de *Botrytis* reportadas causando pérdidas significativas, asociadas con berries en el mundo.

Núm.	Nombre	Año de descripción	Hospedante	Fuente
1	<i>Botrytis cinerea</i>	1794	Múltiples hospedantes	Fillinger y Elad, 2016
2	<i>Botrytis pseudocinerea</i>	2011	<i>Brassica</i> , <i>Fragaria x ananassa</i> Duch, <i>Vitis</i> , <i>Rubus</i> sp. como otros.	Walker et al., 2011
3	<i>Botrytis caroliniana</i>	2012	<i>Rubus</i> sp., <i>Fragaria x ananassa</i> Duch,	Li et al., 2012
4	<i>Botrytis</i> sp. Group S	2013	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch, como otros	Walker, datos no publicados.
5	<i>Botrytis fragaria</i>	2017	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	Rupp et al., 2017

2.2 Ecología y epidemiología

Botrytis spp. se desarrolla principalmente en condiciones del 65 % de humedad y Temperaturas entre 0 y 30 °C, el rango favorable es de 10 a 15 °C teniendo como óptimo 20 °C. La germinación *in vitro* de los conidios ocurre de forma óptima entre 20 y 25 °C. (Latorre, 2007), invernando en forma de esclerocios y micelio en residuos de madera o en materia en descomposición (Araújo et al., 2005). La penetración de los conidios en los tejidos vegetales puede ser directa, pero se favorece por la presencia de heridas en los órganos. La sensibilidad a la enfermedad es máxima durante la maduración, debido a la concentración de azúcares existente que constituye el sustento alimenticio del hongo (Latorre, 2002). Los conidios germinados producen en el interior del órgano parasitado un micelio que lo destruye, saliendo luego al exterior formando conidios que se

tornan de un color grisáceo típico. Los conidios producen sucesivas contaminaciones durante el periodo vegetativo, formando luego el hongo sus órganos de conservación o esclerocios al llegar el otoño (Benito *et al.*, 2000).

Tlapal y Mendoza (2002), mencionan que temperaturas de 10 a 21 °C favorecen el desarrollo de la enfermedad; siendo 18 °C la temperatura óptima; además, señalan que cuando la temperatura durante el día es alta y por la noche desciende entre 16 y 18 °C y humedad relativa del 65 % se favorece el desarrollo de epidemias, ya que estas son las condiciones ideales para la formación de rocío sobre las flores.

2.3 Ciclo biológico

Las estructuras de supervivencia de *Botrytis* spp., conocidas como esclerocios, pueden sobrevivir hasta nueve meses (Daughtrey y Benson, 2005). Los conidios son dispersados mediante el aire y la lluvia, logrando la adhesión y germinación sobre la superficie del hospedante; su penetración en el tejido vegetal se da a través de heridas naturales, mediante la participación de actividades enzimáticas o diversos procesos de diferenciación de estructuras (Van Baarlen *et al.*, 2004). El establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria, generando la expresión de los mecanismos de defensa de la planta; se inicia una fase latente durante la cual la planta mediante los mecanismos de defensa logra controlar al patógeno que permanece localizado en el área de necrosis correspondientes a las lesiones primarias (Gómez, 2001); transcurrido un tiempo, en las lesiones primarias el patógeno vence las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación en el tejido vegetal circundante, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Benito *et al.*, 2000).

El estado asexual (anamorfo) tiene una fase vegetativa, propagativa y de

El diagrama ilustra el ciclo de vida del Moho gris (*Botrytis cinerea*) en una planta. El ciclo comienza con la germinación de las ascosporas en el micelio. El micelio produce conidióforos que liberan conidias. Las conidias infectan partes de la planta (húmedas o mojadas, hojas, frutos, flores y tallos). Las conidias germinan, penetran e invaden los tejidos. Las células infectadas colapsan y se desintegran. El tejido invadido se vuelve suave y se pudre. Los conidióforos y conidias forman el mohogris en los tejidos infectados. El esclerocio germina y produce micelio. El ciclo se completa al producirse más conidióforos.

Etiquetas y descripciones:

- Conidióforo y conidias:** Estructura que produce y libera conidias.
- conidias en parte de conidióforo:** Conidias en desarrollo en la parte superior del conidióforo.
- Micelio:** Hongo filamentoso que crece a partir de la germinación.
- Germinación:** Proceso por el cual las ascosporas germinan para formar el micelio.
- Ascosporas:** Esporas producidas en los apotecios.
- Ascas y ascosporas:** Estructuras que contienen las ascosporas.
- Apotecio con ascas y ascosporas:** Estructura que produce y libera ascosporas.
- Apotecios:** Estructuras que producen y liberan ascosporas.
- Esclerocio:** Estructura que germina y produce micelio.
- Germinación:** Proceso por el cual el esclerocio germina para producir micelio.
- Las conidias infectan partes de la planta que se encuentran húmedas o mojadas, (hojas, frutos, flores y tallos):** Descripción de la infección.
- Los conidios germinan penetran e invaden los tejidos:** Descripción de la penetración de las conidias.
- Las células infectadas Colapsan y se desintegran:** Descripción de la muerte celular.
- El tejido invadido se vuelve suave y se pudre:** Descripción de la pudrición del tejido.
- Conidióforos y conidias forman el mohogris en los tejidos infectados:** Descripción de la formación del mohogris.
- Esclerocio germina y Produce micelio:** Descripción de la germinación del esclerocio.
- hojas, flores y frutos infectados con Moho gris:** Descripción de la infección de las partes de la planta.

Crédito: Juan David Tangarife Botero 2008

2.4 Especies reportadas en berries

20

***B. pseudocinerea*.** Es una especie morfológicamente críptica, la cual se ha distinguido recientemente de *B. cinerea*. Esta especie la reporta Walker (2011) encontrándola sobre restos florales en viñedos franceses, tiene características morfológicas idénticas a *B. cinerea*. Entre muchos otros marcadores, *B. pseudocinerea* es naturalmente resistente a fungicida Fenhexamida e hipersensible a las morfolinas (Albertini *et al.*, 2002). Al igual que *B. cinerea* es un polífago (Plesken *et al.*, 2015) y ambos son simpátricos en los mismos huéspedes, pero *B. pseudocinerea* es más abundante en partes de flores muertas en primavera que en el otoño. También se encuentra en las partes muertas de la vid con mayor frecuencia que en las bayas vivas (Johnston *et al.*, 2013).

***B. caroliniana*.** Por primera vez se aisló en 2010 de moras infectadas (*Rubus fruticosus*) en varias fincas en Carolina del Sur, EE. UU. (Li *et al.*, 2012) en forma simpátrica con *B. cinerea*, que además demostró ser patogénico en hojas de frijol y tomate en condiciones de laboratorio y producir lesiones sin producción de conidios en manzana, pera, limón, naranja, uva de mesa y frambuesa (Li *et al.*, 2012). El análisis filogenético con las secuencias de G3PDH, HSP60, RPB2, NEP1 y NEP2 mostró que estas especies estaban más estrechamente relacionadas con *B. fabiopsis* (infectando el frijol ancho) y con *B. galanthina* (infectando el copo de nieve), y perteneciendo al clado II de la filogenia más reciente (Staats *et al.*, 2007). Este hallazgo contrasta con lo que se esperaría sobre la base de los datos de la planta huésped, lo que sugeriría una relación filogenética con *B. cinerea*. Forma colonias blancas a gris pálido con un micelio aéreo corto y produce esclerocios negros en PDA a 20 °C. Sus conidios son similares a los de *B. cinerea*, pero más pequeños que los de *B. fabiopsis* y *B. galanthina*.

***Botrytis* sp. Group S.** Estudios en el año 2013 en campos de fresa alemanes identificaron una nueva entidad predominante llamada grupo *Botrytis* S (para fresa). Es un novedoso clado de *Botrytis*, que tiene relación con *B. cinerea* y *B. fabae*, que está muy extendido en las áreas de cultivo de fresa en Alemania.

Estas cepas están presentes en otros cultivos, como la vid, pero a menor frecuencia (Walker, datos no publicados citado por Leroch *et al.* (2013).

B. fragaria. Descrita por Rupp *et al.* (2017) en cultivos de fresas en Alemania; forma una colonia al principio blanca y luego gris pálido, desarrollando esclerocios de gris oscuro a negro a veces cubiertos por micelio, solitarios o agregados. Los esclerocios en agar de extracto de malta se desarrollan de forma dispersa dentro de las 4 semanas de incubación a 15 °C en la oscuridad; hemisférica, convexa, a veces hueca en el centro con una superficie cóncava; negro, diámetro 2 a 6 mm (promedio, 3 mm). Es una especie específica del huésped y se encontró tanto en cultivos Alemanes como en cultivos de Estados Unidos (Weber y Hahn, 2019).

2.5 Manejo integrado del moho gris

Control cultural. El manejo de la densidad de plantación es fundamental y se debe procurar tener una distribución que permita la aireación efectiva entre las plantas. La selección de variedades que no producen follaje extensivo y que desarrollan flores y frutas con porte erguido, permite que la fruta quede expuesta a mayor aireación y radiación, reduciendo las condiciones favorables para el desarrollo del hongo. También se debe destruir toda materia muerta o infectada, como hojas senescentes o frutos dañados, así como eliminar los residuos de cosecha del ciclo previo, con el objetivo de reducir la cantidad de inóculo capaz de producir nuevas infecciones. Durante la cosecha se debe retirar toda la fruta madura y aquellas que tengan señales de descomposición o daño por frío u otras causas (Mertely y Peres, 2009). El uso de riego por goteo es una herramienta que permite reducir las condiciones propicias para el desarrollo del moho gris. El establecimiento del cultivo bajo macrotúneles, puede reducir la pudrición de la fruta al disminuir la humedad relativa y hojas húmedas por el rocío, además de minimizar daños por lluvia o heladas. Por otro lado, el uso de plástico en las camas previene el contacto de la fruta con el suelo, reduciendo la incidencia de la enfermedad. La fresa es una fruta extremadamente sensible al daño; en este sentido, minimizar las lesiones en la fruta durante la cosecha y el empaque es

esencial para evitar la proliferación de la enfermedad durante la etapa postcosecha. Durante el manejo anteriormente descrito es esencial enfriar inmediatamente la fruta a 0 o 3 °C, y mantener almacenada la fruta a temperaturas bajas que impidan condiciones óptimas para el crecimiento del moho gris (Mertely y Peres, 2009).

Control químico. Es el método más utilizado para el control del moho gris en los sistemas de producción convencionales. Para el uso de esta estrategia se recomienda el monitoreo de los campos de cultivo y de las condiciones ambientales, mismas que permitirán decisiones acertadas para las aplicaciones preventivas de fungicidas. Dos o tres aplicaciones de fungicidas (Fludioxonil+Ciprodinil, Iprodiona, Fenhexamida o Pyraclostrobin+Boscalid) en precosecha, son suficientes para manejar la enfermedad en postcosecha. Estas aplicaciones pueden ser complementadas con aplicaciones de captan o con el uso de fungicidas biológicos o biocontroladores (Rebollar-Alviter, 2011). Los últimos estudios han constatado una menor efectividad en las aplicaciones, debido al aumento de niveles de resistencia del patógeno a fungicidas benzimidazoles, como también un desarrollo paulatino de resistencia a Dicarboxamidas, por el uso repetitivo de estos grupos de fungicidas (Molina *et al.*, 2006). Experimentos realizados en zarzamora en Michoacán indican que *B. subtilis* aplicado cada 8 a 10 días iniciando en la floración han dado resultados similares al comparar con dos aplicaciones de los fungicidas químicos realizadas solo en precosecha o solo en floración. Diferentes formulaciones de fungicidas biológicos a base de bacterias como *B. subtilis* y *B. pumilus* están disponibles en el mercado. Las aplicaciones de *B. subtilis* contra *B. cinerea* han dado resultados satisfactorios cuando se aplican a partir de la floración hasta la cosecha. Los programas de manejo de estas enfermedades basados exclusivamente en estos organismos no han sido efectivos en Michoacán (Rebollar-Alviter, 2011).

2.6 Técnicas moleculares para la identificación de especies de *Botrytis* spp.

Las técnicas moleculares son aquellas que se usan para aislar el DNA para un propósito específico. El diagnóstico molecular se desarrolló con la introducción

de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) como la base de detección de patógenos, concepto que se ha desarrollado en las últimas dos décadas (Palomino y Gonzáles, 2014).

Con los avances en biología molecular, las técnicas disponibles han evolucionado, brindando nuevas variantes de PCR que permiten la detección de patógenos con mayor eficiencia, además son extremadamente variadas y básicamente son aplicables a cualquier problema diagnóstico asociado a procesos biológicos (Mumford *et al.*, 2006).

La PCR es una técnica *in vitro* que permite amplificar un fragmento de DNA en forma exponencial, empleando una enzima DNA polimerasa termoestable que actúa en un proceso de copiado durante ciclos sucesivos (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

2.7 Identificación molecular basada en la reconstrucción filogenética de *Botrytis cinerea*

Las primeras detecciones de *B. cinerea* se realizaron a partir de regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas por marcadores SCARs, su utilidad se evidencia cuando no existe información genética significativa de un organismo (Rigotti *et al.*, 2002).

B. cinerea posee gran variabilidad genética, debido a las diferencias fenotípicas, en cuanto a morfología, producción de enzimas, patogenicidad y resistencia a fungicidas que se ha evidenciado en aislados de diversos hospedantes (Latorre *et al.*, 2015). La razón de estos cambios está directamente relacionada con la variación en el número cromosómico, pasando a series euploides y aneuploides con facilidad (Williamson *et al.*, 2007). Otro punto que influye en la variabilidad genética de este hongo es que posee elementos extracromosómicos, entre los que se incluyen los cromosomas de las mitocondrias, plásmidos y elementos transponibles (Hahn *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Técnicas para la identificación molecular de *Botrytis cinerea* basada en iniciadores específicos o universales.

Técnica	Tipo de iniciadores	Iniciador/Secuencia del iniciador (5'-3')	Referencia
PCR	Iniciadores específicos	BpNP1-F41 GCTACAGTCCCTCACGATTCTG	Alaniz, 2011; Muñoz <i>et al.</i> , 2015 Rigotti, <i>et al.</i> , 2006
		BpNP1-R510 TAAGGTGGGGTTGGGGAGGG	
		FC108 ACCCGCACCTAATTCGTCAAC	
		BC563 GGGTCTTCGATACGGGAGAA	
		G3PDH	
PCR + Secuenciación	Iniciadores universales	ATTGACATCGTCGCTGTCAACGA	Staats <i>et al.</i> , 2005
		HSP60	
		CAACAATTGAGATTTGCCCAACAG	
		RPB2	Schouten <i>et al.</i> , 2008
		GATGATCGTGATCATTTTCGG	
		NEP 1	
		ACGCGTCGACATGCATTTCTCCAACGCA	
		NEP2	
		ACGCGTCGACATGGTTGCCTTCTCAAATC	

En la actualidad, se dispone de tres bases de datos distintas del genoma de *B. cinerea*, equivalentes dos de ellas a la secuenciación del genoma de la cepa B05.10 (Amselem *et al.*, 2011; Staats y van Kan, 2012) y la tercera la secuenciación del genoma de la cepa T4 (Amselem *et al.*, 2011). Los códigos de acceso de los genes en estas bases de datos son: para la cepa *B. cinerea* B05.10, códigos BC1G y B0510, y para la cepa *B. cinerea* T4, códigos BofuT4. El conocimiento del genoma completo del hongo permite el análisis de la posible presencia de genes codificantes para otras xilanasas, además de la Xyn11A (Brito *et al.*, 2006). Las endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) provocan la ruptura del esqueleto de xilano rompiendo enlaces entre moléculas de xilosa y pertenecen, la gran mayoría de ellas, a las familias 10 (GH10) y 11 (GH11) de las glicosil hidrolasas (Cantarel *et al.*, 2009), según la clasificación en la base de datos CAZy (Carbohydrate-Active EnZymes) aunque también se han descrito algunas en las familias 5, 7, 8 y 43 (Collins *et al.*, 2005). Por ello, se realizó una búsqueda en las bases de datos del genoma de *B. cinerea* utilizando los dominios que el servidor Pfam (Bateman *et al.*, 2004) define como característicos para cada una de estas dos familias de glicosil hidrolasas, a través de las herramientas bioinformáticas.

B. cinerea aparece compuesta por dos genotipos *Transposa* y *Vacuma*, los cuales aislados son considerados especies (Hahn *et al.*, 2014). *Transposa* posee dos elementos transponibles *Boty* y *Flipper*, mientras que *Vacuma* no los posee, sin embargo, son simpátricos. *Boty* es un retrotransposon de clase I con un tamaño de 6 Kbp; mientras que *flipper* es un elemento de clase II de 1842 pb. Estos patógenos poseen un alto grado de diversidad genotípica (Kecskeméti *et al.*, 2014).

2.8 Modo de acción de fungicidas y resistencia en *Botrytis*

Los fungicidas señalan funciones celulares específicamente esenciales. Según la FRAC (Fungicides Resistance Action Committee) los fungicidas pueden ser clasificados según su modo de acción en: A. Síntesis de ácidos nucleicos, B. Mitosis y División celular, C. Respiración, D. Síntesis de proteínas, D. Traducción de señales, E. Síntesis de lípidos y membranas, F. Biosíntesis de membranas, G. Síntesis de paredes celulares y de glucanos, H. Síntesis de melanina en paredes celulares, I. Inducción de defensa en la planta hospedante, J. Modo de acción desconocido, K. Acción contacto multisitio. De igual forma se pueden clasificar de acuerdo con su comportamiento de resistencia cruzada; las letras se refieren a: P = inductores de defensa de la planta huésped, M = inhibidores químicos de múltiples sitios, U = modo de acción desconocido y riesgo de resistencia desconocido, y BM = productos biológicos con múltiples modos de acción.

Definición de resistencia

Según el Comité de acción de resistencia a fungicidas (FRAC, 2011) la resistencia a fungicidas se define como “una reducción heredable adquirida en la sensibilidad de un hongo, ante un agente antifúngico específico”.

Origen de la resistencia a fungicidas

El desarrollo de la resistencia a los fungicidas es un proceso evolutivo ya que los hongos como muchos organismos cambian constantemente. Los cambios ventajosos permiten que el individuo que contiene el cambio sobreviva y se

reproduzca a mayores velocidades de modo que su progenie sea mayor de las generaciones anteriores. En hongos la frecuencia reproductiva es alta. En la mayoría de los casos de resistencia a fungicidas, el cambio que conduce a una sensibilidad reducida es evolutivamente neutral, excepto cuando se aplica el fungicida específico (Gaujard y Russell, 2002). El fungicida está ejerciendo presión de selección sobre la población de hongos, ya que está matando a la población inicial (silvestre) pero no mata a la población modificada (mutante). Cuando los cambios son ligeramente desventajosos en condiciones normales (ausencia del fungicida), la frecuencia de la población cambiante puede disminuir cuando se elimina la presión de selección. Esto se denomina una penalización de aptitud. (FRAC, 2011). La resistencia a los fungicidas se puede dar de forma preexistente en una población inicial a nivel de especie y se conoce como resistencia natural o puede aparecer en poblaciones después de la selección de fungicidas y se le denomina resistencia adquirida (Albertini y Leroux, 2004).

2.9 Resistencia a fungicidas en *Botrytis* sp.

Entre los grupos químicos comúnmente utilizados y disponibles en el mercado nacional para el control de *B. cinerea* se encuentran los siguientes: hidroxianilidas (Fenhexamida), Anilinopirimidinas (Ciprodinil y Pirimetanil), Dicarboxamidas (Iprodiona), Carboxamidas (Boscalid), Estrobilurinas (Pyraclostrobin), Fenilpirroles (Fludioxonil) y algunos inhibidores de la biosíntesis del ergosterol como Tebuconazole. Además, se encuentran las formulaciones en mezclas de ingredientes activos tales como Ciprodinil + Fludioxonil, Fenhexamida + Tebuconazole, Boscalid + Pyraclostrobin, y Pirimetanil + Trifloxystrobin. El uso de mezclas de los ingredientes activos se empleó con el propósito de evitar el desarrollo de resistencias específicas del hongo a algunas de las moléculas botryticidas base de los programas de control (Anilinopirimidinas, Hidroxianilidas, Dicarboxamidas y Carboxamidas). Sin embargo, debido a las exigencias de los mercados de destino, los cuales en algunos casos llegan a cuatro el número máximo de ingredientes activos residuales en la fruta, se dificulta el uso de fungicidas en el manejo de la enfermedad (Leroux, 2007). Es así también, que se

cuenta con fungicidas alternativos para el control del moho gris basados en compuestos orgánicos naturales y productos biológicos formulados en base a cepas mejoradas de *Bacillus subtilis* y de *Trichoderma* spp. (Yael *et al.*, 2014).

Hay cuatro mecanismos por los cuales los hongos pueden volverse resistentes a los fungicidas (FRAC, 2011):

Alteración del sitio de acción: Es la aparición de mutaciones puntuales en los genes principales a la alteración de la proteína del sitio diana que reduce la unión del fungicida. Un gran número de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que confieren resistencia a varios grupos de fungicidas se han identificado en el campo, se pueden usar como marcadores moleculares para una detección rápida (Lalève *et al.*, 2014). Las mutaciones en el gen *Daf1* es la forma más común en que los hongos pueden volverse resistentes a un fungicida específico. Algunas mutaciones dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos del sitio objetivo alterando la forma del sitio de bloqueo. Dando como resultado una reducción de la sensibilidad ya sea grande o pequeña (Hayes *et al.*, 2014).

Existen tres patrones de resistencia cruzada denominados respectivamente MDR1, MDR2 y MDR3 (Leroux y Walker 2013). Todos los patrones muestran resistencia baja a media (RL bajo o medio) a Anilino pirimidinas, Dietofencarb, Iprodona, Fludioxonil, algunos inhibidores de la respiración e inhibidores de la biosíntesis de tolinaftato (RL alto).

Desintoxicación: La desintoxicación de fungicidas mediante metabolización enzimática que involucra glutatión-S-transferasas (GST), citocromo P450, hidrolasas o esterasas como fenotipo multiresistente MDR, la desintoxicación puede conferir resistencia cruzada a pesticidas con diferentes modos de acción (Kretschmer *et al.*, 2009) En los hongos fitopatógenos, este mecanismo rara vez se ha involucrado en la resistencia a los fungicidas (FAO, 2012). Este fenómeno no interfiere con el control del moho gris, ya que este compuesto no se usa contra *Botrytis* spp. Se propuso la desintoxicación como una posible resistencia (Leroch *et al.*, 2013).

La célula fúngica contiene una amplia gama de maquinaria metabólica para procesos celulares normales. Esta maquinaria metabólica puede modificar el fungicida a una forma no tóxica que ya no sea nociva para la célula. Algunos fungicidas son aplicados como fungicidas inactivos, requiriendo un mayor metabolismo por parte de la célula fúngica para convertirse en la forma activa. Si el metabolismo fúngico se altera de manera tal que no se produce el paso de activación, no se produce la forma activa del fungicida (Delye *et al.*, 2013).

Sobre-expresión del sitio objetivo: A medida que hay mayor aplicación de fungicidas en la célula, hay mayor competencia con el sustrato. La sobreexpresión del objetivo puede aumentar la probabilidad de que suficiente sustrato fúngico sea capaz de unirse con la enzima del sitio objetivo de manera que los procesos celulares como la respiración puedan ocurrir en algún grado (Mernke *et al.*, 2011).

Exclusión o expulsión del sitio: Las bombas de flujo existen naturalmente dentro de la célula para expulsar sustancias extrañas o para exportar sustancias endógenas. En los hongos, las bombas de flujo más comunes son los transportadores ABC y MFS. No obstante estas bombas de flujo, la mayoría de los fungicidas pueden alcanzar concentraciones efectivas dentro de las células del patógeno e inhibir los procesos celulares. Ocasionalmente, los ABC y MFS logran expulsar suficiente fungicida de manera que el aislamiento reduce la sensibilidad. Los fungicidas expulsados de la célula por un transportador específico pueden o no estar activos en el mismo sitio objetivo; es decir, no hay una relación directa entre el transportador que expulsa un fungicida específico y el sitio objetivo del fungicida (Mernke *et al.*, 2011). La resistencia a múltiples fármacos (MDR) se desarrolla cuando un transportador específico puede excluir múltiples fungicidas de diferentes grupos de sitio objetivo. La aplicación de los fungicidas puede ejercer una presión de selección suficiente como para que los aislamientos que contienen estos transportadores exportadores de fungicidas se vuelvan más prevalentes en la población, como es el caso de *B. cinerea* (Kretschmer *et al.*, 2009).

2.10 Técnicas de diagnóstico de la resistencia a fungicidas

Técnica de dilución

Se lleva a cabo en medio PDA con 0.5 mL de ácido láctico para inhibir bacterias. Los fungicidas utilizados son disueltos en agua destilada esterilizada, y se preparan soluciones stock. Después de ser esterilizadas las dosis del fungicida serán agregados volúmenes de las soluciones madre. Para determinar la sensibilidad del patógeno a los fungicidas, se usa un medio mínimo en lugar de PDA, se utiliza 10 g glucosa, 1.5 g de K_2HPO_4 , 2 g de KH_2PO_4 , 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g de levadura extracto (Oxoid) y 12.5 g de agar (Oxoid) por litro (Tuite, 1969).

Método de microdilución en placa

La solución madre del fungicida se prepara en agua hasta obtener una concentración determinada. En los pocillos se marcan controles negativos. Las microplacas contendrán distintas concentraciones de antifúngicos y el inóculo de las diferentes cepas fueron serán almacenadas a las temperaturas adecuadas para desarrollo del micelio. Luego las concentraciones de los fungicidas se utilizan en el microtitulador. Para cada concentración del fungicida, se usan tres pocillos replicados; también se usarán pocillos como blanco. Las placas de microvaloración se colocan en bolsas de plástico para evitar la evaporación y se incuban a 18 °C en la oscuridad. Cinco días después de la inoculación, el crecimiento se mide en un fotómetro a 405 nm. Los valores son corregidos en comparación con los espacios en blanco. Los valores ED se comparan con aislamientos estándar sensibles según FRAC (Stammiller, 2009).

Método fotométrico *in vitro*. Medio GG 1.5 g de KH_2PO_4 , 0.75 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4 g de gelatina de piel de cerdo, 4 g de glucosa disuelto en 1000 mL de H_2O . Después de 20 min de esterilización a 121 °C en la autoclave, el medio se enfría a temperatura ambiente.

Similar al método anterior, los conidios se recogen de las placas de GEA esporuladas, cuidadosamente con un hisopo de algodón estéril. La suspensión de conidios se filtra a través de una punta de pipeta estéril de 5 mL. La densidad

de esporas se ajusta, usando un fotospectrómetro. El OD debe estar entre 0.281 y 0.315 en 600 nm. Las suspensiones de conidios se pueden almacenar a 4 °C durante al menos 24 h, La prueba de sensibilidad se lleva a cabo en placas de fondo plano de 96 pocillos (Sierotzki, 2005).

Fungicidas autorizados para el cultivo de frambuesa, fresa y zarzamora

Debido a que en su mayor parte las berries son destinadas en mayor proporción a la exportación, la Asociación Nacional de Exportadores de Berries (Aneberries), elabora una lista de productos autorizados con base en los destinos de exportación y acorde a las normas internas del país. En la Cuadro 3, se enlistan los ingredientes activos autorizados por dicha asociación para el año 2018 recomendados para el manejo del moho gris en berries.

Cuadro 3. Fungicidas autorizados por Aneberries (2017) para el control de *Botrytis cinerea* para frambuesa fresa y zarzamora en México.

Ingrediente activo	Grupo químico	*FRAC	MoA	Nombre comercial
Azoxistrobin	Metoxiacrilatos	C3	Respiración, Complejo III: citocromo bc1, (ubiquinol oxidasa) en el sitio Qo (gen cyt b).	Amistar, Heritage
Boscalid	Piridinas Carboxamidas	C2	Respiración, SDHI (inhibidores de la succinato-deshidrogenasa)	Cantus
Captan	Ftalimidas	M04	Actividad multisitio. Biosíntesis en esterol, 3-ceto reductasa, C4-de-metilación	Captan, Folpet
Fenhexamida	Hidroxianilidas	G3	(erg27), Fungicidas KRI. (Inhibidores De KetoReductasa) (SBI: Clase III).	Elevat
Ciprodinil+ Fludioxonil	Anilinopirimidinas /Fenilpirroles	D1/E2	Síntesis de aminoácidos y proteínas/Transducción de señales.	Switch
Iprodiona	Dicarboxamidas	E3	Transducción de señales, MAP/histidina-quinasa en la transducción de señales osmóticas (os-1, Daf1).	Rovral

Pirimetanil	Anilinopirimidinas	D1	Síntesis de aminoácidos y proteínas, biosíntesis de metionina (gen cgs).	Scala
-------------	--------------------	----	--	-------

2.11 Evaluación de la resistencia a fungicidas con el uso de dosis discriminatorias

La susceptibilidad de los aislados a los fungicidas se mide mediante ensayos de crecimiento en intervalos de concentraciones de fungicidas, para determinar la concentración que inhibe el crecimiento de hongos en un 50 %, también llamada CE_{50} o eventualmente la concentración inhibitoria mínima. La comparación de los valores de EC_{50} de una cepa dada con los de las cepas de referencia sensibles, generalmente las aisladas antes de la introducción del fungicida permite determinar su factor o nivel de resistencia (FR o NR). A partir de la determinación de las EC_{50} en una población de aislamientos, una sola dosis puede usarse para separar los individuos resistentes de los susceptibles. La categoría de resistente puede subdividirse en más categorías, dependiendo del nivel de crecimiento o germinación relativa de los conidios (Russell, 2004). Los niveles de baja resistencia (LR) para las proporciones de EC_{50} entre 2 y 20, resistencia moderada (MR) para RF entre 20 y 100; Se consideraría una alta resistencia (HR) para relaciones $CE_{50} > 100$ (Hollomon y Brent, 2009). Más recientemente, Fernández-Ortuño *et al.* (2014) en estudios de resistencia de *B. cinerea* en fresa, categorizó los niveles de resistencia en: S = ausencia de crecimiento, LR = menos del 20 % de crecimiento micelial diametral, MR = hasta el 50 % de crecimiento diametral, y R = más del 50 % de crecimiento diametral. Estas categorías pueden ser usadas para evaluar el perfil de resistencia de una población de aislamientos dada, y determinar si las proporciones de resistencia representan un riesgo que compromete la eficacia del fungicida al sobrepasar un nivel crítico, generalmente superior al 20 % (Hollomon y Brent, 2009).

2.12 Literatura citada

- Albertini, C., Leroux, P. 2004. A *Botrytis cinerea* putative 3 – keto reductase gene (ERG27) that is homologous to the mammalian 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7 gene. European for Plant Pathology 110:723-730.
- Albertini, C., Thebaud, G., Fournier, E., Leroux, P. 2002. Eburicol 14 alpha-demethylase gene (CYP51) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. Mycological Research 106:1171–1178.
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A., Viaud, M. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. PLoS Genetic 7: e1002230.
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Couthino, P. M., de Veries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J. M., Quévillon, E., Sharon, A., Simón, A., ten Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V., Beever, R. E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collémare, J., Cotton, P., Danchin, E. G., Da Silva, C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Güldener, U., Henrissat, B., Howlett, B. J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuvéglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rasclé, C., Schumacher, J., Ségurens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D. M., Talbot, N. J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J. A., Lebrun, M. H., Dickman, M. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. PLoS Genetics 7(8): e1002230.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Fin, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L., Studholme, D. J., Yeats, C., Eddy, S. R. 2004. The Pfam protein families database.

Nucleic Acids Research 32: D138-141.

- Beever, R. E., Weeds, P. L. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Denle, N. (eds) *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 30–31.
- Benito, E. P., Arranz, M., Eslava, A. P. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinérea*. Revista Iberoamericana de Micología 17: S43-S46.
- Brito, N., Espino, J. J., González, C. 2006. The endo- β -1,4-xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. Molecular Plant-Microbe Interaction 19:25–32.
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C. 2009. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. Nucleic Acids Research 37:233–238.
- Collins, C. L., Dunshea, F. R., Henman, D. J., McCauley, I., King, R. H. 2005. The apparent ileal digestibility of amino acids in common vetch (*Vicia sativa* cv. Morava). Austria Journal Experience Agriculture 45: 705-709.
- Daughtrey, L. M., Benson, D. M. 2005. Principles of Plant Health Management for Ornamental Plants. Annual Review of Phytopathology 43:141–69
- Davidson, J. A., Pande, S., Bretag, T. W., Lindbeck, K. D., Krishna-Kishore G. 2007 biology and management of *botrytis* spp. in legume crops. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen (eds). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, 295-318p.
- Delye, C., Jasieniuk, M., Le Corre, V. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. Trends in Genetic 29:649–658.
- FAO. 2012. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas, Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia

a los Plaguicidas. <http://www.fao.org/3/a-bt561s.pdf>

- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Pérez, N. A., Schnabel, G. 2014. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern U.S. states. Plant Disease 98:825-833.
- Fillinger, S., Elad Y. 2016. *Botrytis* – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems. Springer International Publishing Switzerland 486p.
- FRAC. 2011. Mecanismos de resistencia de fungicidas, basada en la sexta edición de IRAC internacional, Comité de acción de resistencia a fungicidas. <http://www.frac.info/resistance-overview> (Consulta: Noviembre, 2018)
- Frances, M., Dewey, M., Grant, D. 2016. *Botrytis* - Biology, Detection and Quantification. Fillinger, S., Elad, Y. (eds). *Botrytis* – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. Springer, 17–34p.
- Gaujard, C., Russell, P. E. 2002. Eyespot monitoring in Europe and the decline in prochloraz resistance in Northern France. In: Modern fungicides and antifungal compounds III, Eds Dehne, H. W., Gisi, U., Kuck, K. H., Russell, P. E., Lyr, H. AgroConcept GmbH, Bonn pp 109-119.
- Gómez, V. 2001. La podredumbre gris en los cultivos hortícolas del sudeste español. Terralia. 22. Disponible en Línea: <http://www.terralia.com/articulo.php?recordID=2210#bibliografia>. (Consulta: Mayo, 2018).
- Hahn, M., Viaud, M., van Kan, J. 2014. The Genome of *Botrytis cinerea*, a Ubiquitous Broad Host Range Necrotroph. Ralph, A., Lichens-Park, D. A., Kole, C. Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens. Springer, 19-44p.
- Hayes, B. M. E., Anderson, M. A., Traven, A., van der Weerden, N. L., Bleackley,

- M. 2014. Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. *Cellular y Molecular Life Science* 71:2651–2666.
- Hollomon, D. W., Brent, K. J. 2009. Combating plant diseases the Darwin connection. *Pest Management Science* 65:1156–1163.
- Hsiang T, Chastagner GA (1992) Production and viability of sclerotia from fungicide resistant and sensitive isolates of *B. cinerea*, *B. elliptica* and *B. tulipae*. *Plant Pathology* 41:600–605
- Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., de Cock A. W. A. M., Dissanayake, A. J., Glockling, S. L., Goonasekara, I. D., Gorczak, M., Hahn, M., Jayawardena, R. S., van Kan, J. A. L., Laurence, M. H., Lévesque, C. A., Li, X., Liu, J. K., Maharachchikumbura, S. S. N., Manamgoda, D. S., Martin, F. N., McKenzie, E. H. C., McTaggart, A., Mortimer, P. E., Nair, P. V. R., Pawlowska, J., Rintoul, T. L., Shivas R. G., Spies, C. F. J., Summerell, B. A., Taylor, P. W. J., Terhem, R. B., Udayanga, D., Vaghefi, N., Walther, G., Wilk, M., Wrzosek, M., Xu, J. C., Yan, J. Y., Zhou N. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera. *Fungal Divers* 67:21–125.
- Jarvis, W. R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species; taxonomy, physiology and pathogenicity, Monograph No. 15. Canadian Department of Agriculture, Ottawa. 204 p.
- Johnston, P. R., Hoksbergen, K., Park, D., Beever, R. E. 2013. Genetic diversity of *Botrytis* in New Zealand vineyards and the significance of its seasonal and regional variation. *Plant Pathology* 63(4):888–898.
- Kecskeméti, E., Brathuhn, A., Kogel, K-H., Berkemann-Löhnertz, B., Reineke, A. 2014. Presence of transposons and mycoviruses in *Botrytis cinerea* isolates collected from a German grapevine growing region. *Journal of Phytopathology* 1:582–595.

- Kretschmer, M., Lerouch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Memke D., Schoonbeek, H. J., Pradier, J. M., Leroux, P., Waard, D. A. M., Hann, M. 2009. Fungicide driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. PLoS Pathology 5(12): e1000696.
- Lalève, A., Fillinger, S., Walker, A. S. 2014. Fitness measurement reveals contrasting costs in homologous recombinant mutants of *Botrytis cinerea* resistant to succinate dehydrogenase inhibitors. Fungal Genetics Biology 67:24–36.
- Latorre, B. 2007. Pudrición gris (*Botrytis cinerea*), un factor limitante de la producción de uva de mesa en Chile. Fitopatología 42(1):09-20.
- Latorre, B. A., Elfar, K., Ferrada, E. 2015. Gray mould caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. Ciencia e Investigación Agraria 42:305-330.
- Latorre, B. A., Rioja, M. E., 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. Ciencia e Investigación Agraria 29:145-151.2002.
- Lerouch, M., Plesken, C., Weber, R. W. S., Kauff, F., Scalliet, G., Hahn, M. 2013. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology 79:159–167.
- Leroux, P. 2007. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N. (Eds.): *Botrytis: Biology, pathology and control*, Springer, Dordrecht 195-222.
- Leroux, P., Walker, A. S. 2013. Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance. European Journal of Plant Pathology 135: 683.

- Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., Schnabel, G. 2012. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104:650–658.
- Lorenzini, M., Zapparoli, G., Chastagner, G. A. 2017. *Botrytis euroamericana*, a new species from peony and grape in North America and Europe. *Plant Pathogens* 109:496-507.
- Mernke, D., Dahm, S., Walker, A. S. 2011. Two promoter rearrangements in a drug efflux transporter gene are responsible for the appearance and spread of multidrug resistance phenotype MDR2 in *Botrytis cinerea* isolates in French and German vineyards. *Phytopathology* 101:1176–1183.
- Mertely, J. C., Peres, N. A. 2009. *Botrytis* Fruit Rot or Gray Mold of Strawberry. Plant Pathology Department. Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <https://static1.squarespace.com/static/57285e9e59827e6e7a1467f2/t/5a25fbd69140b751d5c29419/1512438746146/Botrytis+Fruit+Rot+or+Gray+Mold+of+Strawberry.pdf>. (Consulta: Diciembre, 2018)
- Mirzaei, S., Mohammadi-Goltapeh, E., Shams-bakhsh, M. 2007. Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Technology* 3:65–76.
- Molina, M. G., Zaldúa F. S., Gastón G. V., Sanfuentes V. E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque (Valdivia)* 27(2):126-134.
- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., Barker, I. 2006. Advances in molecular phytodiagnostics-new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*. 116:1-19.
- Muñoz, G., Campos, F., Salgado, D., Galdames, R., Gilchrist, L., Chahin, G., Andrade, O. 2015. Molecular identification of *Botrytis cinerea*, *Botrytis*

paeoniae and *Botrytis pseudocinerea* associated with gray mould disease in peonies (*Paeonia lactiflora* Pall) in Southern Chile. Revista Iberoamericana de Micología 43-47.

Nassr, S., Bakarat, R. 2013. Effect of factors on conidium germination of *Botrytis cinerea* *in vivo*. Interaction Journal Plant Soil Science 2:41–54.

NCBI. El Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=40559> (Consulta: Enero, 2019).

Palomino-Camargo, C., Gonzales-Muñoz, Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/93/1932> (Consulta: Agosto, 2018)

Persoon, C. H. 1794. *Botrytis* sect *Botrytis*. Neues Magazine fur die Botanik 1:81-128.

Plesken, C., Westrich, L. D., Hahn, M. 2015. Genetic and phenotypic characterization of *Botrytis calthae*. Plant Pathology 64:128–136.

Rebollar-Alviter, Ángel. 2011. Manejo del mildiu y el moho gris de la zarzamora. Universidad Autónoma Chapingo 34p.

Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., Viret, O. 2002. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers, Fr. in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) using PCR. FEMS Microbiology Letters 209:169–174.

Rigotti, S., Viret, O., Gindro, K. 2006. Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Phytopathology Mediterranean 45:253–260.

- Rupp, S., Plesken, C., Rumsey, S., Dowling, M., Schnabel, G., Weber, R. W. S., 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* 83:1-16.
- Russell P. E. 2005. A century of fungicide evolution. *Journal of Agriculture Science* 143:11–25.
- Russell, P. E. 2004. Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. Brussels, Belgium. FRAC Monograph 3. <http://www.frac.info/docs/defaultsource/publications/monographs/monograph-3.pdf>.
- Sierotzki, H., Kraus, N., Assemat, P., Stanger, C., Cleere, S., Windass, J., Gisi, U., Dehne, H. W., Kuck, K. H., 2005. Evolution of resistance to QoI fungicides in *Plasmopara viticola* populations in Europe. In H. W. Dehne, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell, & H. Lyr (Eds.), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV* (pp. 73–80). Alton: BCPC. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa. *Medigraphic* 2:70:78.
- Staats, M., Van Baarlen, P., van Kan, J. A. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22:333–346.
- Staats, M., Van Baarlen, P., van Kan, J. A. L. 2007. AFLP analysis of genetic diversity in populations of *Botrytis elliptica* and *Botrytis tulipae* from the Netherlands. *European Foundation for Plant Pathology* 117:219–235.
- Staats, M., van Kan, J. A. 2012. Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryotic Cell* 11:1413–1414.
- Stammler, G. 2009. *Botrytis cinerea*. Disponible en: http://www.frac.info/frac/Monitoring_Methods/anhang/BOTRCI_microtiter

[monitoring_method_BASF_2009_V2.pdf](#) (Consulta: Octubre, 2018).

- Tlapal, B. B., Mendoza Z. C. 2002. Enfermedades de origen fungoso en ornamentales. *In*: Bautista, M. N., Alvarado, M. N. J., Chavarín, J. C., Sánchez, H. Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Instituto de Fitosanidad y Colegio de Postgraduados. Montecillo 237 p.
- Tuite, J. 1969. Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria. Burgess Press, Minneapolis 239p. Tomado de FRAC, 2011.
- Van Baarlen, P., Staats, M. van Kan, J. 2004. Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. Molecular Plant Pathology 5: 559-574.
- Walker, A. S., Gautier, A., Confais, J., Marthino, D., Viaud, M., Le Pecheur, 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(12):1433–1445.
- Weber, R. W. S., Hahn, M. 2019. Grey mould disease of strawberry in northern Germany: causal agents, fungicide resistance and management strategies. Applied Microbiology Biotechnology. pp 1-9.
- Whetzel, H. 1945. A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate discomycetes. Mycologia 37(6):648–714.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., van Kan, J. A. L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8:561–580.
- Yael, M. H., Haile, M. Z., Rav-David, D., Yigal, E. 2014. Induced systemic resistance against gray mold in tomato (*Solanum lycopersicum*) by benzothiadiazole and *Trichoderma harzianum* T39. Phytopathology 104:150–157.

IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE AISLADOS DE *Botrytis* sp. ASOCIADOS A BERRIES Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS
PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF ISOLATES OF *Botrytis* sp. ASSOCIATED TO BERRIES AND SENSITIVITY TO FUNGICIDES

RESUMEN

El moho gris causado por *Botrytis cinerea* (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*), es la segunda enfermedad de importancia mundial, ataca a especies de berries en México dejando pérdidas hasta del 50 %, el patógeno puede atacar el cultivo en todos los estados de desarrollo y logra infectar cualquier parte de la planta. Una de las estrategias de control es la aplicación de productos químicos, aunque su uso cada vez se recomienda menos por la frecuente aparición de cepas del patógeno con resistencia genética. La identificación de especies de *Botrytis* y la sensibilidad a los fungicidas es una información básica para fortalecer acciones por implementar en la producción de frutillas en México. El objetivo de esta investigación fue identificar filogenéticamente los aislados de *Botrytis* spp. colectados de cultivos de frambuesa, fresa y zarzamora en los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán, México, así como la susceptibilidad a los fungicidas comerciales: Azoxistrobin, Fenhexamida, Iprodiona y Pirimetanil. Treinta y seis aislados de *Botrytis* sp. se usaron para identificación a nivel molecular mediante reconstrucción filogenética del espacio transcrito interno del rDNA (ITS) y genes *Housekeeping* G3PDH, RPB2, HSP60, NEP1 y NEP2; con ITS y G3PDH se constató que se trataba de *B. cinerea* con un 99 y 100 % de identidad, respectivamente. Para la zona productora de berries en Guanajuato, Jalisco y Michoacán, México se puede determinar que el gen G3PDH fue el más informativo. Para la evaluación de la sensibilidad a fungicidas se utilizaron 80 aislamientos, se evaluó el crecimiento del micelio y mediante un análisis de los datos con la prueba Kruskal-Wallis, los ensayos de sensibilidad indicaron que los aislados fueron resistentes (59 %) a Azoxistrobin (perteneciente al grupo químico Metoxiacrilatos) y a Pirimetanil (del grupo Anilino pirimidinas), pero susceptibles a Dicarboxamidas e hidroxianilidas.

PALABRAS CLAVE: Resistencia fungicidas, filogenia, iniciadores específicos.

ABSTRACT

Gray mold caused by *Botrytis cinerea* (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*), is the second disease of importance global, attacks species of berries in Mexico causing losses of up to 50 %, the pathogen can attack the crop in all stages of development and achieves infect any part of the plant. Most of the control strategies is the application of chemical products, although its use is increasingly recommended less by the frequent appearance of strains of the pathogen with genetic resistance. The identification of *Botrytis* species and the sensitivity to fungicides is a basic information to strengthen actions to be implemented in strawberry production in Mexico. The objective of this research was to identify phylogenetically the isolates of *Botrytis* spp. collected from strawberry, raspberry and blackberry crops in the provinces of Guanajuato, Jalisco and Michoacan, Mexico, as well as susceptibility to the commercial fungicides Iprodione, pyrimethanil, azoxystrobin and Fenhexamide. thirty-six isolates of *Botrytis* sp. identified by we molecular level through phylogenetic reconstruction of the internal transcribed space of the rDNA and *Housekeeping* G3PDH, RPB2, HSP60, NEP1 and NEP2 were used; like *Botrytis cinerea* with 99 and 100 % identity. For the area producing berries in Guanajuato, Jalisco and Michoacan, Mexico, it can be determined that the G3PDH gene is the most informative. For the evaluation of the fungicide sensitivity, 80 isolates were used, the mycelium growth was evaluated and by means of an exploratory analysis of the data, it was determined that the Kruskal-Wallis test to compare the medians was the most efficient. The sensitivity tests indicated that the isolates are resistant (59 %) to Azoxystrobin belonging to the chemical group Methoxyacrylates and pyrimethanil, to the anilino pyrimidines but susceptible to dicarboxamides and hydroxylanilides.

KEY WORDS: Fungicide resistance, phylogeny, specific primers.

Introducción

La producción mundial de los frutos denominados berries, entre los que se incluyen: blueberries (*Vaccinium corymbosum*), frambuesa (*Rubus idaeus*), fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) y zarzamora (*Rubus* sp.), se ha incrementado en países como China, Estados Unidos, Egipto, Países Bajos, Polonia, México; así como su comercio internacional (COMTRADE,2017).

En México, en 2016 se registró una superficie cultivada de 33.6 mil hectáreas, con una producción de 858 mil toneladas lo que equivale a 22,651 millones de pesos. Para el mercado exterior se canaliza el 65 % del volumen de producción y los países que demandan las berries mexicanas son: Estados Unidos, Canadá, y Países Bajos (SIAP, 2016).

La curva de crecimiento de la actividad productiva va relacionada con problemas fitosanitarios (SAGARPA, 2016); enfermedades fúngicas ocasionadas por varias especies de *Botrytis* spp., entre ellas, *B. cinerea*, segundo hongo de mayor importancia a nivel mundial (Hyde *et al.*, 2014) Además de ser un patógeno agresivo, *Botrytis* es un organismo capaz de crecer y reproducirse en tejidos dañados, senescentes y muertos de las berries y otras plantas (Mirzaei *et al.*, 2007).

Se le considera uno de los patógenos de alto riesgo por la aparición de cepas resistentes a fungicidas (Russell, 2005). Para su manejo, esta enfermedad requiere de un manejo integrado, que incluye la aplicación de fungicidas que, aunque efectivos, representan un alto riesgo para el desarrollo de resistencia genética del hongo. Otra necesidad que surge es la identificación de cuáles son las especies de las plantaciones nacionales de berries, en México toda vez que se reconoce un complejo de 30 especies de esta especie. La plasticidad genética de las poblaciones fúngicas de *Botrytis* en general (Biémont, 2010), y en particular la alta variabilidad que se ha reportado para *B. cinerea* (Van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1993), detectable por diversidad somática, metabólica y genética, se atribuye a los fenómenos de heterocariosis y aneuploidía

(Williamson *et al.*, 2007), lo cual se relaciona con la resistencia genética de estos hongos a la aplicación de fungicidas (Fillinger y Elad, 2016).

En cuanto a la identificación molecular de la diversidad y variabilidad de *Botrytis*, se reconocen aproximadamente 30 especies, un híbrido y un complejo de especies (Beever y Weeds, 2004); en la última década, con nuevas técnicas moleculares se han identificado al menos cuatro especies específicas para berries (Li *et al.*, 2012). Recientemente se ha demostrado que las poblaciones de *Botrytis* pueden estar estructuradas genéticamente, no solamente en relación con la planta huésped, sino con otros factores como el sistema de cultivo, la geografía y las aplicaciones de fungicidas (Li *et al.*, 2012); también se ha obtenido evidencia de recombinación y el flujo génico, entre y dentro de los acervos de *Botrytis* (Schumacher *et al.*, 2013), todo lo cual está ayudando a entender la importancia que tienen los estudios previos de reconocimiento de la presencia de *Botrytis* asociada con las especies de berries y las condiciones ambientales y de manejo de las plantaciones.

Fenhexamida, Ciprodinil-Fludioxonil y Boscalid son los fungicidas comerciales que se recomiendan para controlar *Botrytis* en las plantaciones de berries en el centro occidente de México; estos productos contienen hidroxianilidas, Anilinopirimidinas, Fenilpirrol y Carboxamidas, grupos químicos con diferentes modos y mecanismos de acción contra el hongo referido (Glättli *et al.*, 2011). Las Hidroxianilidas inhiben la biosíntesis del ergosterol al igual que la inhibición de germinación de esporas y la elongación del tubo. El grupo de Anilinopirimidina y fenilpirrol generan inhibición de biosíntesis de metionina y de la secreción de enzimas hidrolíticas como: cutinasas, lipasas, celulasas y proteasas.

Para Dicarboxamidas, la coexistencia de núcleos Daf1HR con núcleos Daf1S o Daf1LR puede generar un fenotipo altamente resistente que muestra una osmo tolerancia casi normal. Esto es posible porque la alta resistencia es dominante (o parcialmente dominante) en la sensibilidad, y la hipersensibilidad a la alta osmolaridad es recesiva (o parcialmente recesiva) en la osmotolerancia normal (Faretra y Pollastro 1993). Hasta ahora, hay pocos ejemplos de genes que

confieren resistencia a compuestos antifúngicos localizados en determinantes extracromosómicos. En varios patógenos fúngicos la resistencia a los fungicidas Qol es causada por la mutación G143A en el gen mitocondrial *cytb* (Gisi *et al.*, 2002). En *B. cinerea*, se ha detectado la misma mutación tanto en los mutantes resistentes a Qol de campo como en los de laboratorio que a menudo se encuentran en un estado heteroplásmico en el que coexisten mitocondrias resistentes y sensibles en el mismo compartimiento de hifas (Jiang *et al.*, 2009). El análisis genético clásico de la progenie a partir de cruzamientos sexuales entre aislamientos resistentes y sensibles confirmó que la resistencia se debe a determinantes citoplasmáticos que muestran una herencia materna (es decir, esclerotal) (De Miccolis Angelini *et al.*, 2012). El análisis secuencial del gen *cytb* en *B. cinerea* ha evidenciado una estructura genética altamente polimórfica que conduce a discriminar hasta seis tipos diferentes de genes *cytb* en base a la presencia o ausencia de cuatro secuencias intrónicas (Yin *et al.*, 2012). La presencia de un intrón de empalme en el grupo I, adyacente al codón 143 en aislamientos sensibles del hongo, impide la aparición de la mutación G143A ya que sería letal impidiendo la correcta excitación de la secuencia intrónica a partir de la transcripción génica (Grasso *et al.*, 2006).

En trabajos de sensibilidad de *Botrytis* a fungicidas en cultivos bajo cubierta en E.E.U.U. se ha detectado resistencia a los fungicidas bencimidazol y Dicarboxamidas (LaMondia y Douglas, 1997). La mayoría de los aislamientos resistentes al Benomil también eran resistentes al tiofanato-metilo, y la mayoría de los aislamientos resistentes al Vinclozolin también eran resistentes a la Iprodiona. Como objetivo general de esta investigación se planteo Identificar los aislados de *Botrytis* spp. presentes en frambuesa, fresa y zarzamora en Guanajuato, Jalisco y Michoacán, México para evaluar la sensibilidad a fungicidas de uso común.

Materiales y Métodos

Colecta de aislamientos de *Botrytis* sp. Durante Noviembre-Diciembre 2017 y Mayo-Junio y Octubre del 2018 se colectaron frutos asintomáticos de zarzamora, fresa y frambuesa en las zonas productoras de berries en México de los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán (Figura 2). Una muestra de 25 frutos se colocó en bolsas de plástico individuales, selladas, etiquetadas con datos pasaporte de la colecta y en el laboratorio se guardaron a 5 °C para su posterior procesamiento.



Figura 2. Ubicación de los estados donde se realizaron las colectas de frutos asintomáticos de frambuesa, fresa y zarzamora.

Obtención y purificación de aislamientos. Los frutos se lavaron con agua destilada estéril y se desinfestaron con una solución de hipoclorito al 2 % durante 2 min y sometido a tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, para promover la esporulación, los frutos se colocaron en un recipiente plástico (cámara húmeda) previamente desinfestado con alcohol una toalla de papel humedecida con agua destilada estéril y sobre esta se pusieron los frutos asintomáticos y se incubaron a temperatura del laboratorio (23 ± 2 °C) hasta

observar la esporulación del hongo. El hongo que había esporulado, previamente revisado al microscopio compuesto de marca Zeigen con un aumento de 10x se confirmó que perteneciera al género *Botrytis* sp., por medio de preparaciones temporales. Posteriormente de los frutos esporulados se transfirió a cajas Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA), y se incubaron por cinco días a temperatura del laboratorio.

A partir de los aislamientos obtenidos de cada región y parcela de colecta, se realizaron cultivos monoconidiales tomando una suspensión de conidios 1×10^3 conidios mL^{-1} y 0.1 mL de suspensión en cajas Petri en medio agua agar (AA) y se incubaron a temperatura del laboratorio por 12 a 18 h, hasta que se desarrolló el tubo germinativo. Bajo el microscopio compuesto, se seleccionaron conidios germinados en forma individual y se colocaron en el centro de cajas Petri conteniendo medio PDA. Por cada parcela se seleccionaron de uno a tres aislamientos. Una vez que los cultivos monoconidiales llenaron las cajas, se conservaron de manera temporal a 4 °C para su posterior utilización en los estudios de identificación filogenética y de sensibilidad a fungicidas. Ochenta aislamientos se obtuvieron y se identificaron morfológicamente, de manera preliminar, como *Botrytis* sp., con base en las características morfológicas del género (Barnett y Hunter, 1998). Con la finalidad de confirmar la identificación, se seleccionaron 36 aislamientos para la identificación molecular y filogenética, usando los criterios de cultivo y región.

Cuadro 4. Información general de los aislados de *Botrytis* sp. (anamorfo), colectados de frutos provenientes de berries.

ID CRM	ESPECIMEN VÁUCHER	HOSPEDANTE	LOCALIDAD	COORDENADAS	ÓRGANO	ALTITUD
MZ	CRM-MZV1	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Taretan	19.34 N 101.92 W	Fruto	1160
ZZM4-2	CRM-MZV2	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Ziracuaretiro	19.43 N 101.92 W	Fruto	1389
ZZM6-2	CRM-MZV3	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Uruapan	19.40 N 101.96 W	Fruto	1252
LRZM9-10	CRM-MZV4	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.61 N 102.49 W	Fruto	1283
LRZMZR6-1	CRM-MZV5	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Santa Clara	19.64 N 102.50 W	Fruto	1304
LRZM13-2	CRM-MZV6	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.58 N 102.48 W	Fruto	1305
LRZM16-1	CRM-MZV7	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.59 N 102.51 W	Fruto	1274
LRZMIF-1	CRM-MZV8	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.59 N 102.51 W	Fruto	1305
LRZM4-2	CRM-MZV9	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.65 N 102.43 W	Fruto	1555
ZZM4-1	CRM-MZV10	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Ziracuaretiro	19.43 N 101.92 W	Fruto	1389
LRZM4-3	CRM-MZV11	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.65 N 102.43 W	Fruto	1555
LRZM9-1	CRM-MZV12	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.65 N 102.43 W	Fruto	1555
LRZM6-10	CRM-MZV13	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Santa Clara	19.64 N 102.50 W	Fruto	1304
LRZM13-9	CRM-MZV14B	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.58 N 102.48 W	Fruto	1305
LRZM16-2	CRM-MZV15	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.59 N 102.51 W	Fruto	1274
MFM3-2	CRM-GFV16	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Guanajuato, Tarandacuao	20.03 N 100.52 W	Fruto	1921
LRZM13-5	CRM-MZV17	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Los Reyes	19.58 N 102.48 W	Fruto	1305
ZZM15-1	CRM-MZV18	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Ziracuaretiro	19.38 N 101.92 W	Fruto	1390
ZZM20-1	CRM-MZV19	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Ziracuaretiro	19.40 N 101.92 W	Fruto	1390
LRZM12-1	CRM-MZV20	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Santa Clara	19.64 N 102.50 W	Fruto	1300

Cuadro 4. Continuación.

ID CRM	ESPÉCIMEN VÁUCHER	HOSPEDANTE	LOCALIDAD	COORDENADAS	ÓRGANO	ALTITUD
ZZM8-1	CRM-MFV21	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Maravatío	19.87 N 100.35 W	Fruto	2030
ZAFM4-3	CRM-MFV22	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Chilchota	19.88 N 102.15 W	Fruto	1777
ZZM8-10	CRM-MZV23	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Ziracuaretiro	19.39 N 101.96 W	Fruto	1353
MAFM9B	CRM-MFV24	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Maravatío	19.89 N 100.35 W	Fruto	2032
MAFM18A	CRM-MZV25	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Maravatío	19.96 N 100.50 W	Fruto	2030
MAFM11	CRM-MZV26	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Maravatío	19.89 N 100.36 W	Fruto	2030
MAFM7	CRM-MZV27	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Maravatío	19.88 N 100.36 W	Fruto	2030
MAFM17	CRM-MZV28	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Maravatío	19.94 N 100.50 W	Fruto	2030
LRM8	CRM-MZV29	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tocumbo	19.65 N 102.46 W	Fruto	1600
MAFM19	CRM-GFV30	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Guanajuato, Tarandacuao	19.98 N 100.53 W	Fruto	2278
TAZAM10A	CRM-MZV31	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.21 N 101.43 W	Fruto	1654
TAZA8B	CRM-MZV32	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.20 N 101.44 W	Fruto	1650
TAZA6C	CRM-MZV33	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.20 N 101.45 W	Fruto	1650
TAZAM1B	CRM-MZV34	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.23 N 101.50 W	Fruto	1650
TAZAM11A	CRM-MZV35	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.20 N 101.43 W	Fruto	1650
TAZAM12B	CRM-MZV36	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.22 N 101.43 W	Fruto	1650
TAZAM11B	CRM-MZV37	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.21 N 101.43 W	Fruto	1650
TAZAM4B	CRM-MZV38	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.22 N 101.48 W	Fruto	1650
TAZAM12A	CRM-MZV39	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.22 N 101.43 W	Fruto	1650

Cuadro 4. Continuación

ID CRM	ESPÉCIMEN VÁUCHER	HOSPEDANTE	LOCALIDAD	COORDENADAS	ÓRGANO	ALTITUD
MAFM9J	CRM-MFV40	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.91 N 100.55 W	Fruto	2032
TAZAM3	CRM-MZV41	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.22 N 101.52 W	Fruto	1654
TAZAM7	CRM-MZV43	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Tacámbaro	19.17 N 101.44 W	Fruto	1660
MAFM9A	CRM-MF45	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.90 N 100.55 W	Fruto	2036
MAFM3A	CRM-MFV46	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.90 N 100.34 W	Fruto	2036
MAFM2A	CRM-MFV47	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.88 N 100.28 W	Fruto	2036
MAFM6C	CRM-MFV48	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	20.04 N 102.27 W	Fruto	2036
MAFM2B	CRM-MFV49	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.88 N 100.28 W	Fruto	2036
MAFM10B	CRM-MFV50	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.95 N 100.46 W	Fruto	2036
MAFM2D	CRM-MFV51	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.88 N 100.28 W	Fruto	2036
MAFM10D	CRM-MFV52	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.91 N 100.55 W	Fruto	2036
MAFM6F	CRM-MFV53	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	20.04 N 102.27 W	Fruto	2036
MAFM12A	CRM-MFV55	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.22 N 101.43 W	Fruto	2036
MAFM2C	CRM-MFV57	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Maravatío	19.88 N 100.28 W	Fruto	2036
ZAFM12C	CRM-MFV58	<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	México: Michoacán, Zamora	19.86 N 102.16 W	Fruto	1580

Cuadro 4. Continuación

ID CRM	ESPÉCIMEN VÁUCHER	HOSPEDANTE	LOCALIDAD	COORDENADAS	ÓRGANO	ALTITUD
MAFM10C	CRM-MFV59	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Maravatío	19.91 N 100.55 W	Fruto	2032
MAFM6B	CRM-MFV60	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Maravatío	20.04 N 102.27 W	Fruto	2032
ZARM1B	CRM-GZV61	<i>Rubus idaeus</i>	México: Guanajuato, Tarandacuao	19.99 N 100.52 W	Fruto	2275
ZARM1C	CRM-GZV62	<i>Rubus idaeus</i>	México: Guanajuato, Tarandacuao	19.99 N 100.52 W	Fruto	2278
ZARM2A	CRM-MZV63	<i>Rubus idaeus</i>	México: Michoacán, Zamora	20.05 N 102.36 W	Fruto	1587
ZAFM12E	CRM-JFV64	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Jalisco, Arandas	20.65 N 102.25 W	Fruto	2262
ZAZA11D	CRM-JZV65	<i>Rubus</i> sp.	México: Jalisco, Tapalpa	19.91 N 103.70 W	Fruto	2067
ZAFM12J	CRM-MFV66	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Tangancícuaro	19.86 N 102.18 W	Fruto	1700
ZAFM12K	CRM-JFV67	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Jalisco, Valle de Juárez	19.96 N 102.96 W	Fruto	1140
ZARM2E	CRM-MFV68	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Chavinda	20.03 N 102.47 W	Fruto	1572
ZAZAM11B	CRM-JZV69	<i>Rubus</i> sp.	México: Jalisco, Tapalpa	19.91 N 103.70 W	Fruto	2067
ZAFM12D	CRM-JFV70	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Jalisco, Tapalpa	20.11 N 102.22 W	Fruto	2070
ZAFM12L	CRM-JFV71	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Jalisco, Tapalpa	20.06 N 102.25 W	Fruto	2064
ZAZA11G	CRM-JZV72	<i>Rubus</i> sp.	México: Jalisco, Tapalpa	19.91 N 103.70 W	Fruto	2070
ZAFM6A	CRM-MFV73	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Zamora	20.04 N 102.27 W	Fruto	1580
ZAFM12A	CRM-MFV74	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Purépero	19.90 N 102.00 W	Fruto	2019
ZAFM13	CRM-MFV75	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Zamora	19.96 N 102.27 W	Fruto	1580

Cuadro 4. Continuación

ID CRM	ESPÉCIMEN VÁUCHER	HOSPEDANTE	LOCALIDAD	COORDENADAS	ÓRGANO	ALTITUD
ZAFM9A	CRM-MFV76	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Zamora	20.04 N 102.27 W	Fruto	1579
ZAFM8C	CRM-MFV77	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Atecucario	20.05 N 102.25 W	Fruto	1585
ZAFM9C	CRM-MFV78	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Zamora	20.10 N 102.24 W	Fruto	1579
ZAFM12B	CRM-MFV79	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Purépero	19.90 N 102.00 W	Fruto	2020
ZAFM12P	CRM-JFV80	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Jalisco, Tapalpa	19.91 N 103.70 W	Fruto	2065
ZAFM1A	CRM-MFV81	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Purépero	19.90 N 102.00 W	Fruto	2020
ZAFM8D	CRM-MFV82	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch	México: Michoacán, Atecucario	20.05 N 102.25 W	Fruto	1587
ZAZAM11E	CRM-JZV83	<i>Rubus</i> sp.	México: Jalisco, Tapalpa	19.91 N 103.70 W	Fruto	2070
ZAZAM7C	CRM-MZV84	<i>Rubus</i> sp.	México: Michoacán, Zamora	20.05 N 102.26 W	Fruto	1580

Identificación molecular y filogenética. La identificación molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México y en el laboratorio molecular del Institute of Plant Genetics Polish Academis Sciences, Poznan, Polonia. Para cada aislado de *Botrytis* sp., se tomó una pequeña cantidad de micelio de un cultivo en medio PDA enriquecido con el medio de cultivo V8 (Para mayor desarrollo de micelio), usando una punta estéril de micropipeta de 1 mL y se extrajo DNA genómico utilizando el método CTAB al 2 % con algunas modificaciones propuesto por Doyle y Doyle (1990). La cual se describe a continuación: Se etiquetó tubos Eppendorf de 2 mL. El CTAB 2 % (Tris HCl 10 Mm pH 8; $\text{Na}_2\text{EDTA}_2\text{H}_2\text{O}$ 20 Mm pH 8; CTAB; NaCl 1.4 M a 80 °C) se precalentó en baño maría. En el tubo de 2 mL se agregó 250 μL de H_2O HPLC, posteriormente con una punta de 200 μL se tomó el micelio del hongo que fue extraído y macerado, y se agregó 1 μL de CTAB. Se incubó a baño maría a 98 °C por 60 min, se mezcló con intervalos de 10 min, pudiéndose utilizar vórtex. Se centrifugó a 11000 RPM durante 5 min, se pasó el sobrenadante a tubos nuevos de 2 mL.

Se agregó 500 μL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión durante 10 min. Se centrifugó a 11000 RPM durante 10 min, se extrajo la fase acuosa y se colocó en tubos nuevos de 2 mL. Se agregó 700 μL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión por 10 min, luego se centrifugó a 11000 RPM durante 10 min. Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL con 950 μL de etanol al 100 %, previamente enfriados a -20 °C, se mezcló muy suavemente por inversión durante 10 veces.

Se colocó por 2 h a -20 °C. Se Centrifugó a 11000 RPM durante 30 min y se decantó evitando perder la pastilla. Se resuspendió la pastilla de isopropanol al 70 % y se centrifugó por 10 min a 11000 RPM y se dejó secar la pastilla durante por lo menos 30 min. Los lavados dependieron de la coloración de la pastilla. Se resuspendió la pastilla según su tamaño con agua HPLC y se almacenó a 80 °C durante 10 min. Se dio un spin, se cuantificó y se almacenó a -20 °C.

Amplificación de DNA. Se realizó la amplificación de la región ITS1, 5.8S e ITS2 del rDNA con los iniciadores ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990). Asimismo, se usaron las secuencias parciales de los genes gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), proteína de choque térmico (HSP60), subunidad 2 del RNA polimerasa (RPB2) (Staats *et al.*, 2005) y proteínas inductoras de etileno (NEP1 y NEP2) (Schouten *et al.*, 2008). Los iniciadores utilizados y las referencias en este estudio se describen en la Cuadro 5.

Cuadro 5 Iniciadores usados para la amplificación por PCR y secuenciación de diferentes regiones para la identificación molecular de aislados de *Botrytis* sp. obtenidos de cultivos de berries de los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán.

Región	Iniciador	Secuencia del iniciador (5'-3')	Referencia
ITS	ITS5+	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4+	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
G3PDH	G3PDHfor+	ATTGACATCGTCGCTGTCAACGA	Staats <i>et al.</i> , 2005
	G3PDHrev+	ACCCCACTCGTTGTCGTACCA	
HSP60	HSP60for+	CAACAATTGAGATTTGCCCAACAAG	Staats <i>et al.</i> , 2005
	HSP60rev+	GATGGATCCAGTGGTACCGAGCAT	
RPB2	RPB2for+	GATGATCGTGATCATTTTCGG	Staats <i>et al.</i> , 2005
	RPB2rev+	CCCATAGCTTGCTTACCCAT	
NEP1	NEP2for+	ACGCGTCGACATGCATTTCTCCAACGCA	Schouten <i>et al.</i> , 2008
	NEP2rev+	TCCCCGCGGCTGACAGGACAACTTCCAGATTC TCC	
NEP2	NEP2for+	ACGCGTCGACATGGTTGCCTTCTCAAAATC	Schouten <i>et al.</i> , 2008
	NEP2rev+	TCCCCGCGGCCAATAGACTCCCAGAATATAGCC CCT	

La PCR se llevó a cabo con un termociclador modelo C1000 Touch BioRad Foster (California, USA) en tubos Eppendorf de 15 µL que contenían 0.18 µL de cada iniciador, 0.18 µL de dNTPs, 0.9 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y 3 µL de DNA (20 ng mL⁻¹). Los protocolos de PCR fueron estandarizados para cada gen de la manera siguiente: ITS, desnaturalización

inicial de 95 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos con 95 °C por 2 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 10 min; G3PDH, un primer paso a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 64 °C durante 30 s, 72 °C durante 90 s, y un paso final a 72 °C durante 10 min; HSP60 y RPB2, un primer paso a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos con 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 90 s, y un paso final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR obtuvieron un volumen final de 15 µL y se conservaron a 4 °C; se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1 %, se determinó el tamaño del fragmento y fue visualizado en un fotodocumentador (Infinity-3026/WL/LC/26MX, ICT, S.L. Barcelona, España).

Cuadro 6. Protocolos de PCR de los iniciadores empleados para la amplificación.

Iniciadores	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
ITS	95 °C x 4 min 35 ciclos a 95 °C x 2 min	55 °C x 1 min	72 °C x 2 min 72 °C x 10 min
G3PB2	94 °C x 5 min 35 ciclos a 95 °C x 30 s	64 °C x 30 s	72 °C 90 s 72 °C x 10 min
HSP60 y RPB2	94 °C x 5 min 94 °C X 30 s	55 °C x 30 s	72 °C 90 s 72 °C x 10 min
NEP1 y NEP2	94 °C x 5 min 94 °C X 30 s	59 °C x 30 s	72 °C 90 s 72 °C x 10 min

Secuenciación. Los productos de PCR amplificados se limpiaron usando ExoSAP (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.) y fueron analizados en: Macrogen EE. UU.; Polish Academic Science, Polonia y en la unidad de secuenciación del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, México. Las lecturas de los cromatogramas de estas secuencias fueron realizadas con el software FinchTV (Geospiza, Seattle, WA, USA).

Análisis bioinformático Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas con otras secuencias de referencia mediante el programa MUSCLE (Edgar, 2004). Posteriormente, se realizaron análisis evolutivos en MEGA 7

(Tamura *et al.*, 2013) y se compararon con las depositadas en la plataforma GenBank, mediante la herramienta BLAST (NCBI) (Altschul *et al.*, 1997).

Análisis filogenéticos La reconstrucción filogenética se realizó mediante estadística bayesiana concatenada con el programa MrBayes v.3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2003). Para todos los genes se utilizó el modelo Generalized Time Reversible (GTR) con 2 M generaciones hasta que la desviación estándar fue menor de 0.01 (Tavaré, 1986). Cabe aclarar que se secuenciaron los otros genes *housekeeping* pero por cuestiones de tiempo no fueron realizadas las reconstrucciones filogenéticas.

Pruebas de sensibilidad

Ochenta aislados de *Botrytis* fueron caracterizados fenotípica y genotípicamente para las pruebas de sensibilidad, de acuerdo a las características morfológicas del género, descritas por Barnett y Hunter (1998).

Perfil de resistencia de aislamientos de *Botrytis cinerea* a fungicidas de uso común en berries

Fungicidas Se usaron formulaciones comerciales de Fenhexamida (ELEVAT®, Arysta, México), perteneciente a la familia de hidroxianilidas; Iprodiona (ROVRAL® 50 WP, Bayer CropScience, México), correspondiente a la familia de Dicarboxamidas; Pirimetanil (Scala®400 SC, Bayer CropScience, México) de la familia de las Anilinopirimidinas y Azoxistrobin (AMISTAR®, Syngenta, México) perteneciente a los Metoxiacrilatos.

Bioensayos Los bioensayos de sensibilidad se llevaron a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Centro Regional Universitario Centro-Occidente (CRUCO) de la Universidad Autónoma Chapingo, en Morelia, Michoacán. Se usaron 80 aislamientos monospóricos. Estos bioensayos se establecieron en cajas Petri de 60 x 10 mm en medio PDA. Por cada combinación aislamiento-fungicida se usaron 4 cajas (repeticiones) y por cada aislamiento se tuvo un control sin fungicida con sus correspondientes repeticiones. El perfil de resistencia se determinó usando las dosis discriminatorias previamente establecidas para *B.*

cinerea como se indica en el Cuadro 7, las cuales se adicionaron al medio como se indicó previamente.

Cuadro 7. Dosis discriminatorias de fungicidas usadas para determinar el perfil de resistencia de aislamientos de *Botrytis cinerea* obtenidos de berries a los fungicidas Pirimetanil, Azoxistrobin, Iprodiona y Fenhexamida.

Fungicida	Ingrediente activo	Grupo químico	Concentración	Dosis discriminatoria	Referencia
Scala	Pirimetanil	Anilino pirimidinas	600 g L ⁻¹	2.79 µg mL ⁻¹	Fernández-Ortuño <i>et al.</i> , 2014
Amistar	Azoxistrobin	Metoxiacrilatos	500 g Kg ⁻¹	25 µg mL ⁻¹	Rupp <i>et al.</i> , 2017
Rovral	Iprodiona	Dicarbamidas	500 g Kg ⁻¹	10 µg mL ⁻¹	Fernández-Ortuño <i>et al.</i> , 2014
Elevat	Fenhexamida	Hidroxianilidas	536.8 g Kg ⁻¹	50 µg mL ⁻¹	Fernández-Ortuño <i>et al.</i> , 2014

Se prepararon soluciones madre de cada uno de los fungicidas en su formulación comercial, considerando la concentración del ingrediente activo en agua destilada estéril. A partir de esta solución concentrada se hicieron diluciones seriales 1:10 para la obtención de las concentraciones deseadas en forma logarítmica. La solución con la concentración correspondiente de fungicida se adicionó al medio de cultivo cuando este estuvo a una temperatura entre 50 y 60 °C, se agitó constantemente para un buen homogenizado y se vació inmediatamente en cajas Petri, un volumen total de 7.5 mL para cada caja. Para Azoxistrobin (Estrobilurinas: Metoxiacrilatos) el cual inhibe el proceso de respiración, además de la dosis discriminatoria correspondiente, a la suspensión, se le agrego 100 mg L⁻¹ de ácido salicilhidroxámico (SHAM), los hongos como *B. cinerea* podrían utilizar una vía oxidativa alternativa (AOX), superando la

toxicidad de Estrobilurinas (Wood y Holomon, 2003). De cada aislamiento se sembraron treinta y dos cajas, cuatro de testigo y cuatro para el medio enmendado con el fungicida, se dejó crecer el hongo hasta que el testigo lleno completamente la caja (5 días) para la evaluación del crecimiento micelial posteriormente se midió el diámetro de la colonia en dos sentidos (Hu *et al.*, 2016). Para esta evaluación de sensibilidad las cepas fueron categorizadas de acuerdo con Fernández-Ortuño *et al.* (2014).

Análisis de datos Con los datos del diámetro de crecimiento micelial en cada repetición proveniente de la combinación fungicida-aislamiento se calculó el crecimiento relativo en relación con el crecimiento en el control. Con los datos de crecimiento micelial relativo se construyeron histogramas para ilustrar la distribución de la sensibilidad de los aislamientos y se calculó la estadística descriptiva por región y cultivo, y por fungicida. Adicionalmente, con base en los valores se categorizaron por su nivel resistencia de acuerdo con Fernández-Ortuño *et al.* (2014) y se determinó el perfil de resistencia considerando el total de los aislamientos y por cultivo a los fungicidas evaluados. Todos los análisis se realizaron con el software Minitab (versión 18).

Resultados y Discusión

Las secuencias de la amplificación de productos en la región del espacio transcrito interno (ITS) de DNA ribosómico de 36 aislados seleccionados de los cultivos comerciales de fresa y zarzamora en las diferentes zonas de muestreo obtenido por PCR, mostraron un 100 % de identidad para *Botrytis* sp. al comparar con las secuencias del GenBank (Figura 4); como lo reportan Holst-Jensen *et al.* (1998) el análisis de ITS se limita a demostrar que el género es monofilético, no logrando resolver las relaciones entre especies debido a los caracteres de secuencia filogenética informativa limitada.

Las secuencias de la amplificación por PCR, de productos de DNA nuclear de gliceraldehido tres fosfato (G3PDH) de 12 aislados seleccionados de los cultivos comerciales de fresa y zarzamora en las diferentes zonas de muestreo mostraron un 99 % de identidad comparadas con las secuencias del GenBank (Figura 5).

Cuadro 8. Relación de aislados comparados con las secuencias depositadas en el GENBANK.

Aislamiento	Cultivo	Zona	ITS (% similitud Acc Number)	G3PDH (% similitud Acc Number)
CRM-MZV6	<i>Rubus</i> <i>sp.</i>	Michoacán- Los Reyes	99, JX981485	100, MK051165
CRM- MZV8	<i>Rubus</i> <i>sp.</i>	Michoacán- Los Reyes	100, KX443701	100, MH974746
CRM-MZV11	<i>Rubus</i> <i>sp.</i>	Michoacán- Los Reyes	100, MG204872	100, MK051165
CRM-MZV18	<i>Rubus</i> <i>sp.</i>	Michoacán- Ziracuaretiro	100, MK346204	100, MH974746
CRM-MZV28	<i>Fragaria</i> <i>x</i> <i>ananassa</i> Duch	Michoacán- Maravatío	100, KX858915	-
CRM-MZV38	<i>Rubus</i> <i>sp.</i>	Michoacán- Tacámbaro	100, MK078594	99, MH974746

EL análisis filogenético del DNA nuclear de G3PDH permitió observar tres clados; en el clado I se agrupan las siguientes especies de *Botrytis*: *B. mali*, aislada de fresa y *B. prunorum* aisladas de cultivos de ciruela, kiwi y manzana. En el clado II se ubicaron las secuencias de este estudio seguida de *B. fabae* KR030053 y *B. pseudocinerea* KJ796658; en el tercer clado se agruparon otras especies

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv	Group Name	* * * * *	* * * * *
1. KY200473_Botrytis_pseudocinerea_OP52		T T T T C A C C A C C A C C G A G A A G G C T A A G G C A C A T	
2. MG917659_Botrytis_cinerea		T T T T C A C C A C C A C C G A G A A G G C C A A G G C A C A T	
3. CRM-MZV6		T T T T C A C C A C C A C C G A G A A G G C C A A G G C A C A T	
4. CRM-MZV8		T T T T C A C C A C C A C C G A G A A G G C C A A G G C A C A T	
5. CRM-MZV10		T T T T C A C C A C C A C C G A G A A G G C C A A G G C A C A T	
6. CRM-MZV18		T T T T C A C C A C C A C C G A G A A G G C C A A G G C A C A T	
7. CRM-MZV38		T T T T C A C C A C C A C C G A G A A G G C C A A G G C A C A T	
8. CRM-MZV1		T T T T C A C C A C C A C C G A A A A G G C C A A G G C A C A T	
9. CRM-MZV2		T T T T C A C C A C C A C C G A A A A G G C C A A G G C A C A T	
10. CRM-MZV7		T T T T C A C C A C C A C C G A A A A G G C C A A G G C A C A T	
11. CRM-MZV9		T T T T C A C C A C C A C C G A A A A G G C C A A G G C A C A T	
12. CRM-MZV11		T T T T C A C C A C C A C C G A A A A G G C C A A G G C A C A T	
13. CRM-MZV17		T T T T C A C C A C C A C C G A A A A G G C C A A G G C A C A T	
14. CRM-MFV22		T T T T C A C C A C C A C C G A A A A G G C C A A G G C A C A T	
15. KF878373_Sclerotinia_sclerotiorum_DAOM24167		T T T T C A C C A C C A C C G A G A A G G C T A A G G C A C A T	

60

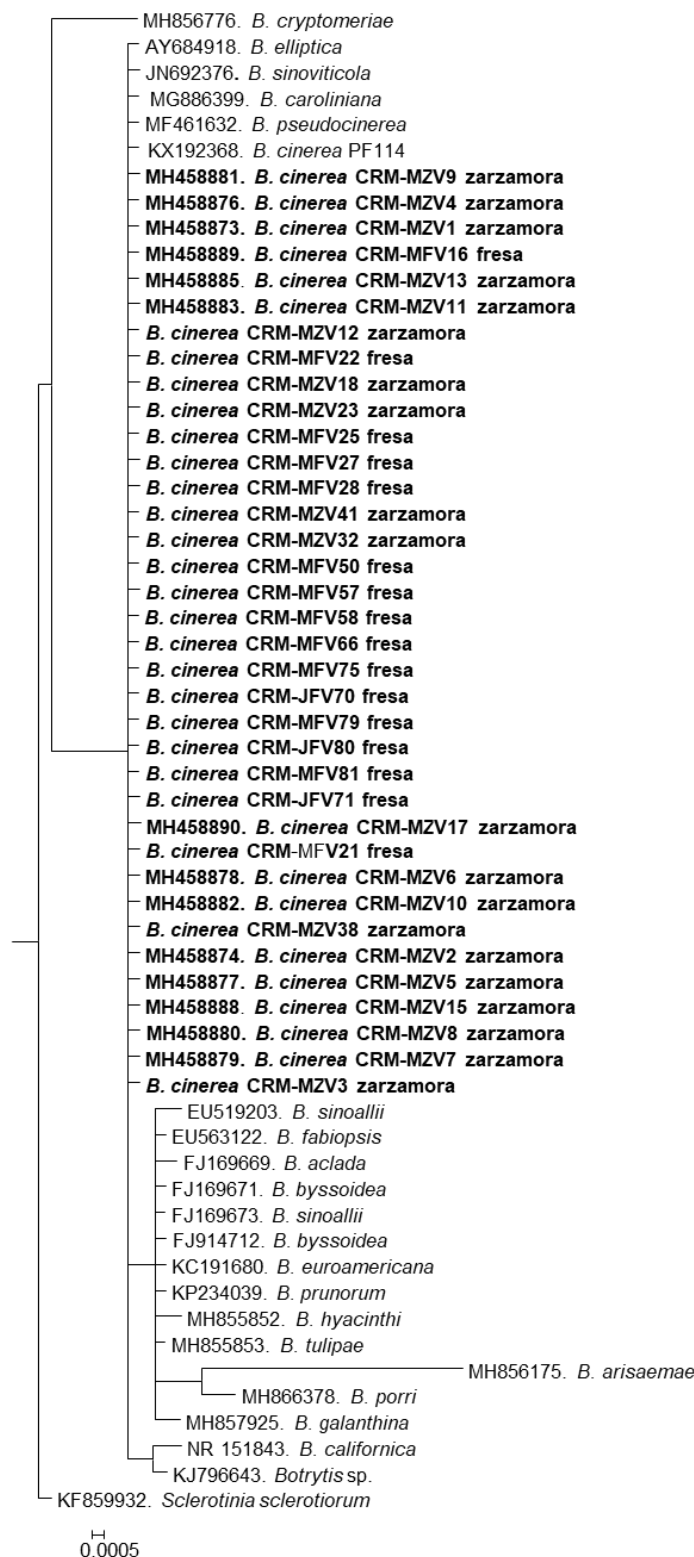


Figura 4. Árbol filogenético construido mediante el método de inferencia bayesiana que muestra relación genética basado en secuencias del espacio interno transcrito (ITS) de *Botrytis cinerea* en cultivos de fresa y zarzamora en Guanajuato, Jalisco y Michoacán, México.

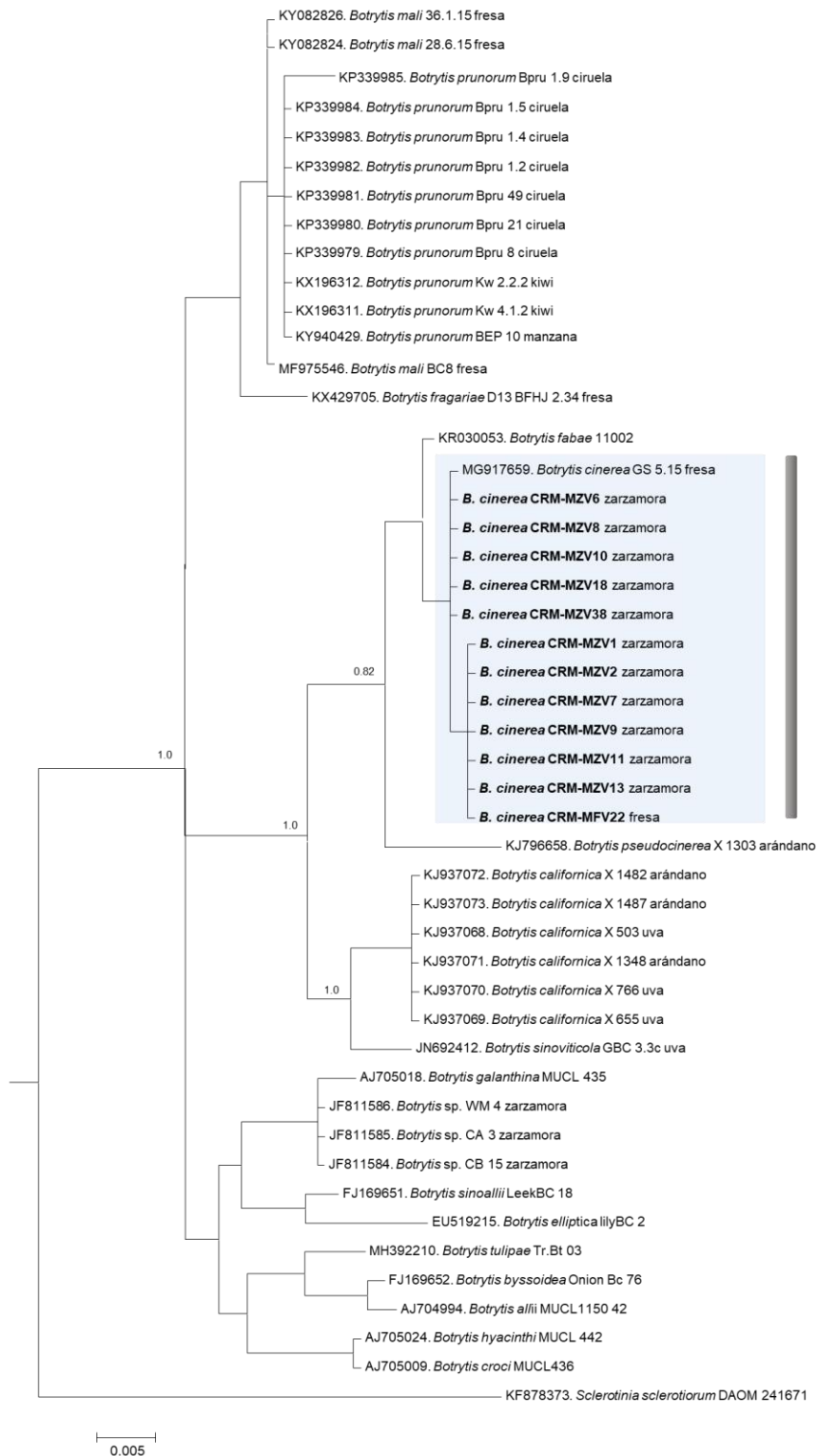


Figura 5. Árbol filogenético mediante el método inferencia bayesiana que muestra relación genética basada en secuencias de gliceraldehído 3 fosfato (G3PDH) de *Botrytis cinerea* en cultivos de fresa y zarzamora en Guanajuato, Jalisco y Michoacán.

En el estudio se pudo observar que un grupo de aislamientos (CRM-MZV1, CRM-MZV2 CRM-MZV7, CRM-MZV9, CRM-MZV11, CRM-MZV17, CRM-MFV22) presentaron un polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) de G/A en la posición 195 de la secuencia G3PDH (Figura 3); lo cual indica que dentro del clado II hay un subgrupo de poblaciones que se están comportando de una forma similar.

Los aislamientos anteriormente mencionados pertenecen a cultivos de zarzamora a excepción de uno que pertenece a fresa, en los municipios de Taretan, Chilchota, Ziracuaretiro y Los Reyes (Michoacán).

La sensibilidad a cuatro ingredientes activos de uso común (Pirimetanil, Azoxistrobin, Fenhexamida e Iprodiona) se determinó con sus dosis discriminatorias según lo postulado por Fernández-Ortuño (2014) en las zonas productoras de berries en Guanajuato, Jalisco y Michoacán, México. La comparación del crecimiento relativo por fungicida, sin considerar el cultivo mediante la prueba de Kruskal-Wallis, indicó que hubo diferencias significativas entre los fungicidas en el crecimiento relativo en respuesta a las dosis discriminatorias aplicadas, confirmando que el crecimiento relativo de Azoxistrobin (Amistar) y Pirimetanil (Scala) fue superior en contraste con los demás fungicidas (Figura 6); estos datos revelan la existencia de poblaciones de *B. cinerea* resistentes a fungicidas Metoxiacrilatos y Anilinopirimidinas en las áreas más importantes para la producción de berries en México, las cuales tienen condiciones socioeconómicas y tecnológicas contrastantes.

Al respecto Fernández *et al.*, (2014) afirman que los aislamientos presentaron resistencia a piraclostrobin 81.8%, fenhexamida 31.5%, iprodiona 8.2%. Amiri *et al.*, (2013) reportaron resultados más altos de resistentes para piraclostrobina 86.5%, fenhexamida 44.4% y pirimetanilo 59.5%.

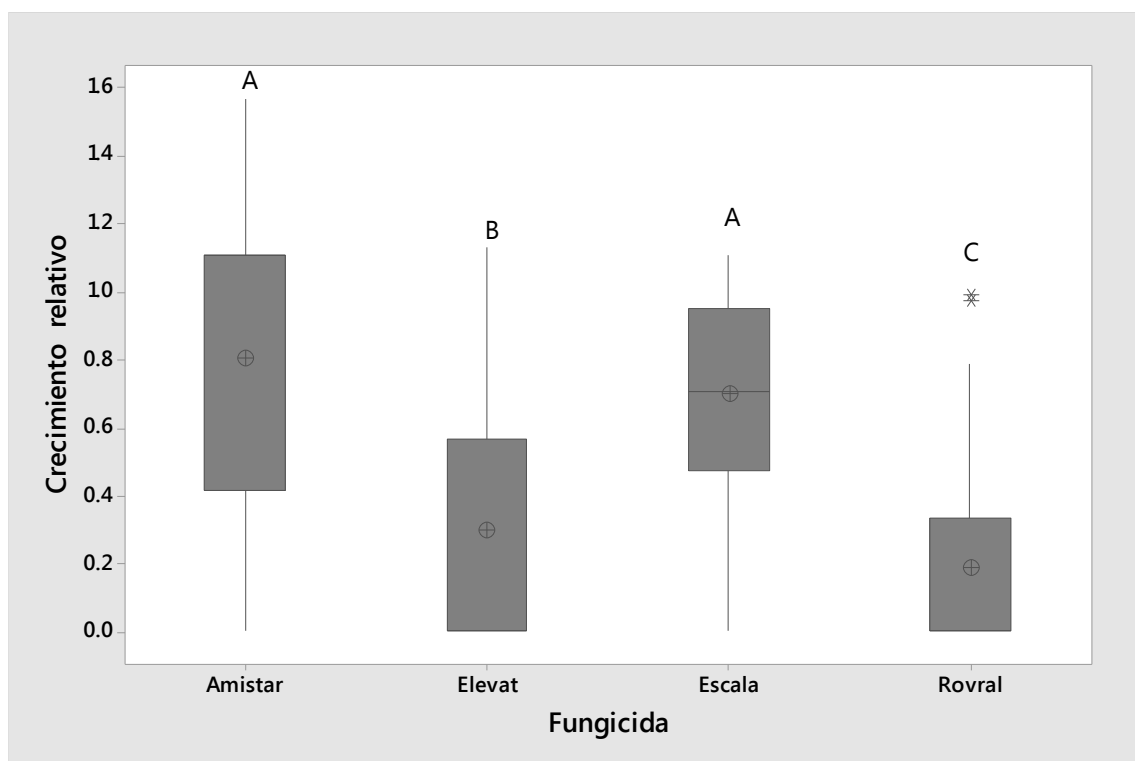


Figura 6. Comparación de las distribuciones del crecimiento relativo (CR) de *Botrytis cinerea* originadas por exposición a dosis discriminatorias de fungicidas: Amistar (Azoxistrobin: 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$); Elevat (Fenhexamida: 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$); Scala (Pirimetanil: 2.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$); Rovral (Iprodona: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Cuadro 9. Estadística descriptiva del crecimiento relativo de *Botrytis cinerea* de frambuesa, fresa y zarzamora sometidos a dosis discriminatorias de los ingredientes activos.

IA	N	$\bar{X}$	EE	StDev	Mín	Q1	Med	Q3	Máy
Iprodiona	80	0.1855	0.0295	0.2637	0	0	0	0.3347	0.9874
Fenhexamida	80	0.2979	0.0389	0.3477	0	0	0	0.566	1.1306
Pirimetanil	79	0.6954	0.034	0.3023	0	0.4765	0.7072	0.9528	1.1111
Azoxistrobin	77	0.8004	0.0532	0.467	0	0.4181	1.1111	1.1111	1.5702

IA: Ingrediente activo; N: Total de aislamientos; $\bar{X}$: Media; StDev: Desviación estándar; Mín: Mínimo Med: Mediana; EE: Error estándar; Q1: Primer cuartil; Q3: Tercer cuartil; Max: Máximo.

La distribución de la sensibilidad a la dosis discriminatoria aplicada (que caracteriza los aislamientos en sensibles y resistentes), considerando todos los aislamientos y sin separar por cultivo (Figura 7), indicó que para el caso del Iprodiona, alrededor del 50 % de los aislamientos aún se consideran como sensibles, pero la distribución se extiende de manera gradual hacia la derecha indicando una tendencia hacia una mayor frecuencia de aislamientos resistentes. De manera similar, la Fenhexamida parece haber una tenencia hacia un cambio drástico o hacia la resistencia o de un solo paso (aislamientos sin crecimiento, y aislamientos con crecimiento mayor al 20 %).

La distribución de la sensibilidad en el caso del Azoxistrobin, claramente separó los individuos sensibles de los resistentes, siendo los primeros, los de menor frecuencia y notándose claramente la separación de los segundos al crecer más del 20 % en relación con el testigo sin fungicida. En el caso del Pirimetanil, los datos indicaron que prácticamente el total de los aislamientos fueron resistentes a este fungicida con base en la muestra tomada (80 aislamientos).

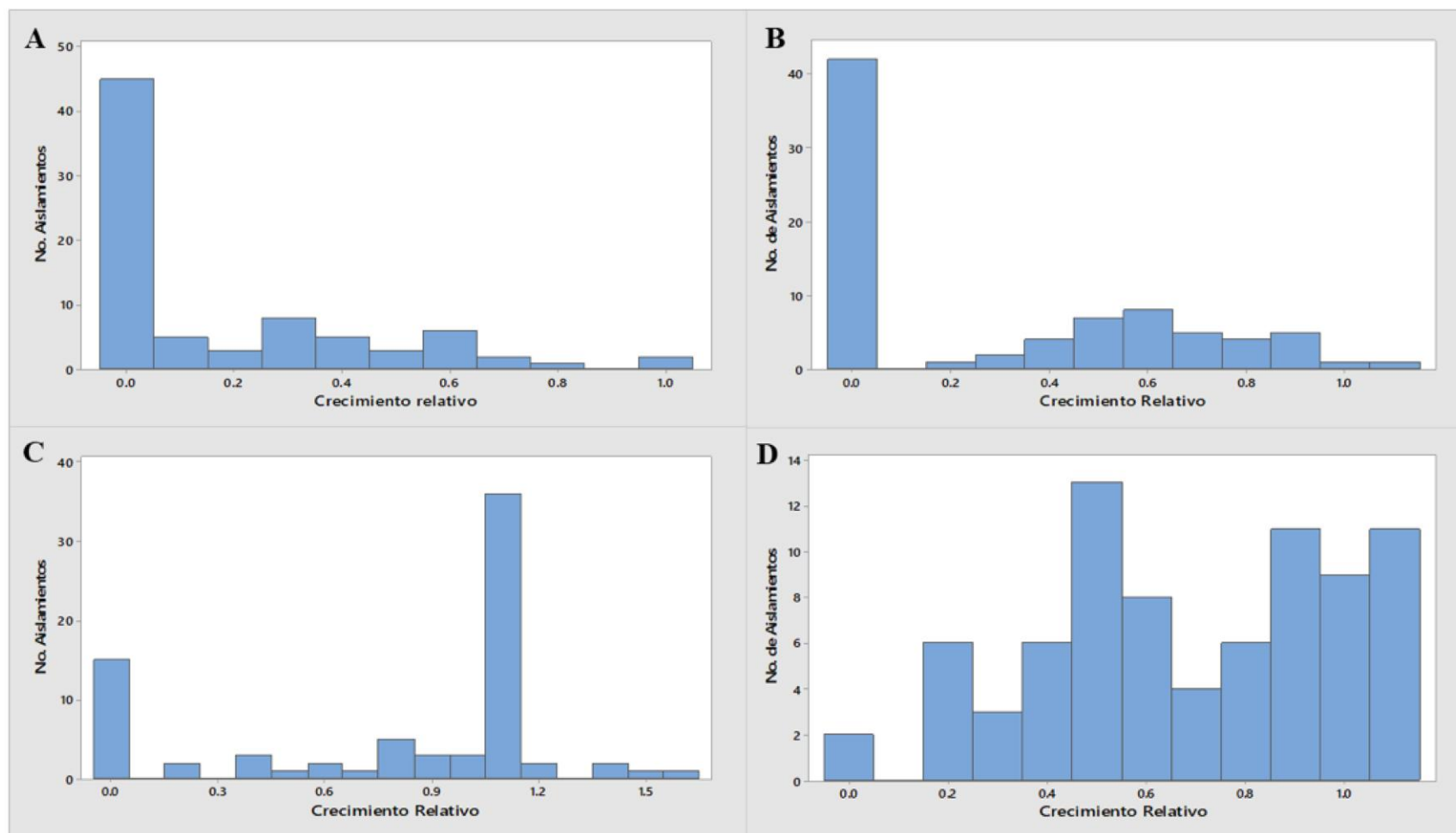


Figura 7. Distribución del crecimiento relativo de *Botrytis cinerea* a una dosis discriminatoria: **A:** Iprodona (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$); **B:** Fenhexamida (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$); **C:** Azoxistrobin (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$); **D:** Pirimetanil (2.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Los datos aportados por este estudio permitieron determinar diferencias en sensibilidad en aislamientos de *B. cinerea* a fungicidas en varios cultivos de berries en Guanajuato, Jalisco y Michoacán.

La mayoría de los aislamientos analizados en el presente trabajo resultaron ser resistentes al Pirimetanil y Azoxistrobin, lo cual se puede explicar por la frecuencia de uso repetitiva a las Anilopirimidinas y Metoxiacrilatos y las características de cambios genéticos que confieren resistencia frente a ellos, ya que algunas mutaciones en una sola base en el sitio de acción son capaces de conferir insensibilidad al fungicida (Lennox y Spotts, 2003). Ma y Michailides (2005) hacen referencia a las mutaciones más frecuentes en campo, conocidas como mutaciones naturales, las cuales aparecen en los codones 198 o 200 del gen que codifica para la betatubulina. El Azoxistrobin, es un metoxiacrilato del grupo de los denominados QoI (Quinone outside inhibitors) que inhiben la cadena respiratoria actuando sobre el complejo III. Sin embargo, actualmente FRAC (Stammler, 2009) no lo recomienda y en este estudio fue utilizado ya que es uno de los productos usados por los productores para combatir la enfermedad.

En el caso de las Dicarboxamidas, a pesar de que se han utilizado desde la década de los 80 en varios cultivos en México, 46 % de la población de *B. cinerea* resultó ser sensible a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Iprodona (Russell, 2004). Fernández-Ortuño *et al.* (2014) reportan 91.8 % de sensibilidad a Iprodona y 68.5 % a Fenhexamida, la restricción al uso de los fungicidas por su riesgo de resistencia va en ascenso debido a la implementación de un número creciente de cambios genéticos desventajosos en el genoma durante la presión de selección por la presencia del fungicida. La distribución de sensibilidad de los aislamientos a Pirimetanil es similar a lo expuesto por Myresiotis *et al.* (2008) para los Anilopirimidinas y Pirimetanil. Este comportamiento sería característico de una resistencia determinada por un gen.

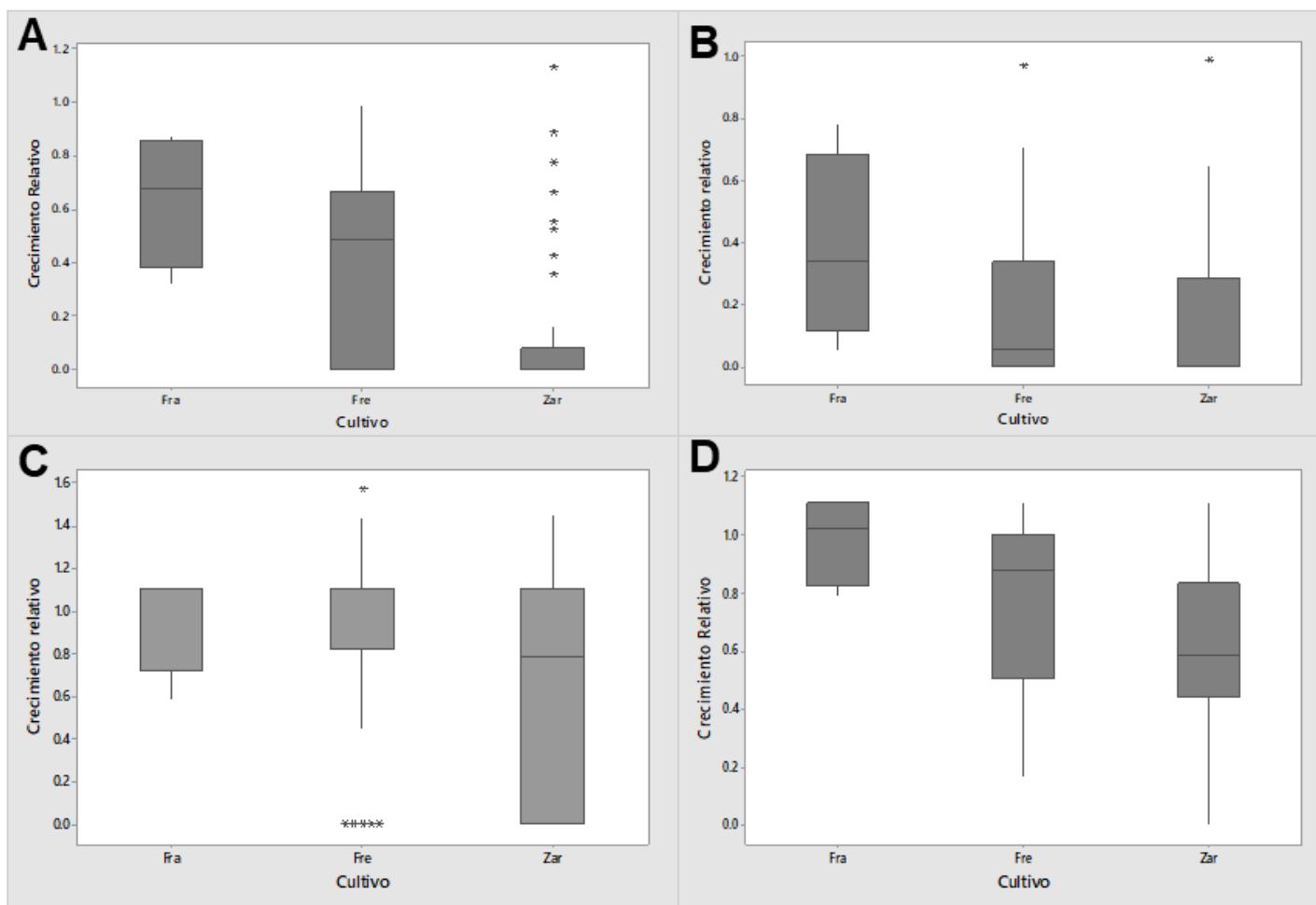


Figura 8. Comparación del crecimiento relativo por fungicida y cultivo: **A:** Fenhexamida; **B:** Iprodiona; **C:** Azoxistrobin; **D:** Pirimetanil. Aislamientos provenientes de los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán.

Por otro lado, separando por fungicida y cultivo (Figura 8), el estudio sugiere (no suficiente tamaño de muestra) que para el caso del Iprodiona y Fenhexamida, hubo una tendencia a una mayor tolerancia en los aislamientos de frambuesa en comparación con los de fresa y zarzamora. Sin embargo, debido que en este cultivo el tamaño de muestra fue pequeño, lo anterior deberá ser corroborado con estudios posteriores; lo que estaría indicando un uso muy intenso de fungicidas en el cultivo de frambuesa. Para el caso de Azoxistrobin y Pirimetanil, los datos confirman la falta de sensibilidad de los aislamientos de *B. cinerea* en los tres cultivos.

Cuadro 10. Porcentaje de Sensibilidad de ochenta aislamientos de *Botrytis cinerea* a cuatro fungicidas de uso común para las zonas productoras de berries en México.

Fungicida	Susceptible	Baja Resistencia	Moderadamente Resistente	Resistente
Iprodiona	45.56	5.63	17.21	13.16
Fenhexamida	42.53	1.13	10.13	27.33
Pirimetanil	3.38	2.25	16.20	59.74
Azoxistrobin	15.19	1.13	5.63	59.74

Al respecto, Fernández-Ortuño *et al.* (2014) afirman que raramente observó resistencia al Iprodiona. Por su parte, Grabke *et al.* (2014) tampoco encuentran altas frecuencias de aislamientos resistentes a la Iprodiona, lo que hace de esta clase química una herramienta atractiva para los programas de manejo de la resistencia. Sin embargo, la presencia de aislamientos resistentes a Azoxistrobin y Pirimetanil demuestra la vulnerabilidad de los Metoxiacrilatos y Anilinopyrimidinas al desarrollo de la resistencia; contrastando estos resultados con la clasificación de riesgo inherente a familia o grupo químico citada por Brent y Hollomon (2007) y FRAC (2011); los Metoxiacrilatos efectivamente tienen un

alto riesgo asociado, mientras que las Anilinopyrimidinas un riesgo medio; este último no se ajusta a los resultados obtenidos en este estudio.

De los 80 aislamientos colectados en las zonas productoras de frambuesa, fresa y zarzamora de Guanajuato, Jalisco y Michoacán (México), diez aislamientos fueron resistentes a los cuatro fungicidas CRM-MZV6, CRM-MZV9, CRM-MZV13, CRM-GFV16, CRM-MFV28, CRM-GFV30, CRM-MFV47, CRM-MFV55, CRM-MFV57, CRM-JFV67 y dos fueron sensibles CRM-MZV20 y CRM-MFV40, los cuales se obtuvieron de cultivos de fresa y zarzamora (Cuadro 4).

Los aislamientos que fueron resistentes a los cuatro grupos químicos podrán tener asociada una característica de pérdida de genes bikaverina la cual puede ser asociada con una mayor virulencia como lo reporta Zhu *et al.* (2012), promoviendo la patogenicidad en estos individuos.

Cuadro 11. Clasificación de los aislamientos según su resistencia de 1 a 4 grupos químicos.

Cultivo	Resistentes a 1 Fungicida	Resistentes a 2 fungicidas	Resistentes a 3 fungicidas	Resistentes a 4 fungicidas
Fresa	2	10	15	12
Frambuesa	-	-	1	2
Zarzamora	11	14	7	4

Las sensibilidades diferenciales a fungicidas han sido útiles como marcadores fisiológicos preliminares para distinguir diferentes especies (Plesken *et al.*, 2015); lo cual sirve como base para hacer posibles estudios de secuenciación en las cepas que mostraron sensibilidad a los cuatro fungicidas evaluados. La prueba de sensibilidad indicó que Azoxistrobin y Pirimetanil fueron los fungicidas que presentaron los valores más altos de resistencia. Es probable que estos fungicidas sean los más usados por los agricultores y que la presión de selección haya sido mayor con base en información provista por los productores.

De los cuatro fungicidas evaluados, Iprodiona y Fenhexamida son moléculas relativamente nuevas, no mayor a cinco años, comparadas con los Metoxiacrilatos y las Anilinopyrimidinas, que han sido usadas ampliamente en las zonas productoras de fresa y zarzamora de Jalisco y Michoacán. En este estudio, la insensibilidad de *B. cinerea* a los Anilinopyrimidinas y Metoxiacrilatos fue mayor que para los fungicidas Hydroxianilidas y Dicarboxamidas.

Cuadro 12. Clasificación de los aislamientos con SNPs sometidos a dosis discriminatoria de cada fungicida.

Código	Iprodiona	Pirimetanil	Fenhexamida	Azoxistrobin
CRM-MZV1	S	R	S	R
CRM-MZV2	S	R	S	S
CRM-MZV7	S	MR	S	S
CRM-MZV9	R	R	R	R
CRM-MZV11	MR	R	R	R
CRM-MZV17	S	R	S	R
CRM-MFV22	MR	R	S	R

B. cinerea es una enfermedad de importancia económica a nivel mundial que durante los últimos años se ha expandido en las regiones productoras de fresa zarzamora y frambuesa en Guanajuato, Jalisco y Michoacán, México. Aunque los resultados de la identificación filogenética indicaron su presencia como única especie encontrada en los doce aislamientos que fueron escogidos para su secuenciación, observaciones directas no registradas en el presente trabajo, refieren la presencia de heterogeneidad en el crecimiento y color de la colonia, al igual que diferenciación en los tamaños de los conidios. Actualmente hay diferentes técnicas de marcadores moleculares, pero se evidencia la necesidad de acordar métodos moleculares específicos a través de la combinación de las técnicas actuales para la identificación temprana de especies en las zonas productoras de berries aquí consideradas.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en *B. cinerea* tienden a conferir resistencia a varios grupos de fungicidas que se han identificado en el campo y mutantes resistentes en laboratorio (Fillinger y Elad, 2016), que es posible usarlos como marcadores moleculares para una detección y cuantificación rápidas. En este sentido, los genotipos de *B. cinerea* resistentes en muestras de campo conforman un valioso material. Otro aspecto esencial en futuros trabajos será tomar en cuenta que el grupo de aislamientos que presenta SNPs en la posición 195, apunta a que todos son resistentes a Pirimetanil (Cuadro.12), lo cual hace pensar que tienen características de comportamiento similares entre ellos. Es necesario realizar los estudios correspondientes de genotificación para corroborar los cambios mutacionales en el hongo a través de la secuenciación y análisis molecular de la región específica asociada con el sitio de acción del fungicida.

Los fungicidas Rovral (Iprodiona) y Elevat (Fenhexamida) mostraron una gran eficiencia por su porcentaje de inhibición para el crecimiento de las cepas, por lo que se recomienda su utilización con frecuencias bajas para evitar exceder los valores de nivel máximo de residuos (LMR). Con Amistar y Scala las cepas de *B. cinerea* presentaron mayor resistencia, es decir, el porcentaje de inhibición fue menor. Sin embargo, la distribución de la sensibilidad a una dosis discriminatoria sugiere un cambio progresivo hacia la insensibilidad. Los resultados son de gran interés para la creación de programas de manejo integrado de *B. cinerea* en frambuesa, fresa y zarzamora para las zonas productoras en México e implementar estrategias anti-resistencia para los fungicidas Anilopirimidinas y Metoxiacrilatos.

Conclusiones

El análisis filogenético de los aislamientos obtenidos de fresa y zarzamora de los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán, basado en las regiones ITS y G3PDH indicó que pertenecen a la especie *B. cinerea*.

Los aislamientos de *B. cinerea* provenientes de frambuesa, fresa y zarzamora en

lugares referidos, mostraron niveles de resistencia moderada a alta para los fungicidas Azoxistrobin y Pirimetanil; y en general, con sensibilidad a Iprodiona y Fenhexamida.

Literatura citada

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST a new generation of protein. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Edition, APS Press, St. Paul, 218p.
- Beever, R. E., Weeds, P. L. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Denle, N. (eds) *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 30–31p.
- COMTRADE, 2017. World Merchandise Exports and Imports by Commodity. Obtenido de http://data.trendeconomy.com/dataviewer/trade/statistics/commodity_h2?kf=kfv_commodity_h2&commodity=081110,081120&trade_flow=Export,Import&time_period=2017 (Consulta: Enero, 2019).
- Doyle, J. J., Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Edgar, R. C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797.
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Pérez, N. A., Schnabel, G. 2014. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern U.S. states. *Plant Disease* 98:825-833.
- Fillinger, S., Elad Y. 2016. *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing Switzerland 216p.
- FRAC. 2011. Mecanismos de resistencia de fungicidas, basada en la sexta edición de IRAC internacional, Comité de acción de resistencia a fungicidas. <http://www.frac.info/resistance-overview> (Consulta: Noviembre, 2018).
- Glättli A, Grote T, Stammler G. 2011. SDH-inhibitors: history, biological performance and

- molecular mode of action. In: Dehne H. W, Deising H. B, Gisi U, Kuck K. H, Russell P. E, Lyr H (eds). Modern fungicides and antifungal compounds VI. DPG-Verlag, Braunschweig, 159–170.
- Grabke, A., Fernández-Ortuño, D., Amiri, A., Li, X. P., Peres, N. A., Smith, P., Schnabel, G. 2014. Characterization of Iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology* 104:396-402.
- Holst-Jensen A, Vaage M, Schumacher T. 1998. An approximation to the phylogeny of *Sclerotinia* and related genera. *Nordic Journal of Botanic* 18:705–719.
- Hu, M.-J., Cox, K. D., y Schnabel, G. 2016. Resistance to Increasing Chemical Classes of Fungicides by Virtue of “Selection by Association” in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 106 (12), 1513–1520.
- Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., de Cock A. W. A. M., Dissanayake, A. J., Glockling, S. L., Goonasekara, I. D., Gorczak, M., Hahn, M., Jayawardena, R. S., van Kan, J. A. L., Laurence, M. H., Lévesque, C. A., Li, X., Liu, J. K., Maharachchikumbura, S. S. N., Manamgoda, D. S., Martin, F. N., McKenzie, E. H. C., McTaggart, A., Mortimer, P. E., Nair, P. V. R., Pawlowska, J., Rintoul, T. L., Shivas R. G., Spies, C. F. J., Summerell, B. A., Taylor, P. W. J., Terhem, R. B., Udayanga, D., Vaghefi, N., Walther, G., Wilk, M., Wrzosek, M., Xu, J. C., Yan, J. Y., Zhou N. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera. *Fungal Diversity* 67:21–125.
- Lennox, C. L., Spotts, R. A. 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 87:645 - 649.
- Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., Schnabel, G. 2012. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104:650–658.
- Ma, Z., Michailides, J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in

- phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24:853–863.
- Mirzaei, S., Mohammadi-Goltapeh, E., Shams-bakhsh, M. 2007. Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Technology* 3:65–76.
- Myresiotis C. K., Bardas G. A., Karaoglanidis G. S. 2008 Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine and benzimidazole resistant strains by these fungicides. *Plant Disease* 92:1427–1431.
- Plesken, C., Westrich, L. D., Hahn, M. 2015. Genetic and phenotypic characterization of *Botrytis calthae*. *Plant Pathology* 64:128–136.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic reference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rupp, S., Plesken, C., Rumsey, S., Dowling, M., Schnabel, G., Weber, R. W. S., 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*. 83:1-16.
- Russell P. E. 2005. A century of fungicide evolution. *Journal of Agriculture Science* 143:11–25
- Russell, P. E. 2004. Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. Brussels, Belgium. FRAC Monograph 3. <http://www.frac.info/docs/defaultsource/publications/monographs/monograph-3.pdf>.
- Schouten, A., Van Baarlen, P., van Kan, J. A. L. 2008. Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytologist* 177: 493–505.
- SIAP, 2016. Sistema de información agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/articulos/berries-frutillas-frutos-rojos-bayas-mexicanas-entre-lo-comun-y-lo-biologico-para-identificar-estos-frutos-que-se-posicionan->

[en-el-mercado-nacional-e-internacional?idiom=es](#) (Consulta: Enero, 2019).

- Staats, M., Van Baarlen, P., van Kan, J. A. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22:333–346.
- Stammler, G. 2009. *Botrytis cinerea*. Disponible en: http://www.frac.info/frac/Monitoring_Methods/anhang/BOTRCI_microtiter_monitoring_method_BASF_2009_V2.pdf (Consulta: Octubre, 2018).
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. 2013. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis 6.0. *Molecular Biology Evolution*, 30:2725–2729.
- Tavaré, S. 1986. "Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences," *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17:57-86.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. A guide to methods and applications. pp. 315–322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols*, Academic Press, Inc. San Diego, CA, USA.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., van Kan, J. A. L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8:561–580.
- Zhu, B., Zhou, Q., Xie, G., Zhang, G., Zhang, X., Wang, Y., Sun, G., Li, B., Jin, G. 2012. Interkingdom gene transfer may contribute to the evolution of phytopathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Evolutionary Bioinformatics Online* 8:105–107.

