

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**"CARACTERIZACIÓN DE *Botrytis cinerea* Pers. AISLADO DE LAS
PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE ARÁNDANO
(*Vaccinium corymbosum*) DE LA COSTA PERUANA"**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

OLENKA INES ALBERCA CRUZ

LIMA – PERÚ

2023

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

Document Information

Analyzed document	TESIS OAC_corregido.docx (D167217314)
Submitted	5/16/2023 9:56:00 PM
Submitted by	LILIANA ARAGON CABALLERO
Submitter email	lili@lamolina.edu.pe
Similarity	5%
Analysis address	lili.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / Tesis Elias Imprimir .pdf Document Tesis Elias Imprimir .pdf (D143415430) Submitted by: medalihuarhua@lamolina.edu.pe Receiver: medalihuarhua.unalm@analysis.arkund.com	 16
SA	TESIS-BOTRYTIS.pdf Document TESIS-BOTRYTIS.pdf (D50973203)	 4

Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
"CARACTERIZACIÓN DE Botrytis cinerea Pers. AISLADO DE LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE ARÁNDANO (Vaccinium corymbosum) DE LA COSTA PERUANA"

70%

MATCHING BLOCK 1/20

SA Tesis Elias Imprimir .pdf (D143415430)

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE INGENIERA AGRÓNOMA OLENKA INES ALBERCA CRUZ LIMA – PERÚ 2023 La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación (Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual) DEDICATORIA A

Dios, por ser siempre mi guía. A mi madre, por ser la generosidad y el cariño hechos persona, por ser mi apoyo y consejera en los buenos y malos momentos, y por ser un motivo más por el cual seguir esforzándome. A mi hermano Jorge, por estar unidos en todo momento y a mis primos hermanos Milagros y Diego por su apoyo incondicional. A todas esas personas que en algún momento conocí, amigos, profesores, muchos de ellos que ya no frecuento, pero que dejaron huella en mi vida, de quienes aprendí tantas cosas y también son mi inspiración y empujé para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Dr. Liliana María Aragon Caballero y mi co-asesora Mg. Sc. Medali Heidi Huarhua Zaquinaula por recibirme en el proyecto de Fondecyt "Diversidad genética de Botrytis spp. causante del mocho gris, en las principales zonas productoras del cultivo del arándano en el Perú" para la realización del presente trabajo de investigación, su orientación, apoyo y consejo, ayudaron a mi formación profesional y personal. Sin ellos el presente trabajo no hubiese culminado con éxito.

Al FONDECYT por haber financiado la investigación.

A mis compañeros y al Ing. Gean Carlo Ciprian Salcedo del Laboratorio de Biotecnología 2 y 3 del PIPS en Cereales y Granos Nativos por su tiempo y múltiples conversaciones que ayudaron a mi formación profesional con su experiencia y consejos.

Agradecimiento especial al Ing. Agr. Mg. Sc. Andrés Virgilio Casas, por la oportunidad otorgada en tiempo de pandemia en la ejecución de la

90%

MATCHING BLOCK 2/20

SA Tesis Elias Imprimir .pdf (D143415430)

presente tesis. A la Blg. Cledy Ureta por sus críticas, comentarios y apreciaciones, valiosos en la investigación.

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

"CARACTERIZACIÓN DE *Botrytis cinerea* Pers. AISLADO DE LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum*) DE LA COSTA PERUANA".

OLENKA INES ALBERCA CRUZ

Tesis para optar el título de:

INGENIERA AGRÓNOMA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

.....
M. S. Andrés Casas Díaz
PRESIDENTE

.....
Ph. D. Liliana Aragón Caballero
ASESORA

.....
Ph. D. Walter Apaza Tapia
MIEMBRO

.....
Mg. Sc. María del Carmen Gonzales Miranda
MIEMBRO

.....
Mg. Sc. Medali Heidi Huarhua Zaquinaula
CO-ASESORA

LIMA - PERÚ

2023

DEDICATORIA

A Dios, por ser siempre mi guía.

A mi madre, por ser la generosidad y el cariño hechos persona, por ser mi apoyo y consejera en los buenos y malos momentos, y por ser un motivo más por el cual seguir esforzándome.

A mi hermano Jorge, por estar unidos en todo momento y a mis primos hermanos Milagros y Diego por su apoyo incondicional.

A todas esas personas que en algún momento conocí, amigos, profesores, muchos de ellos que ya no frecuento, pero que dejaron huella en mi vida, de quienes aprendí tantas cosas y también son mi inspiración y empujé para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Dr. Liliana Maria Aragon Caballero y mi co-asesora Mg. Sc. Medali Heidi Huarhua Zaquinaula por recibirme en el proyecto de Fondecyt "Diversidad genética de Botrytis spp. causante del moho gris, en las principales zonas productoras del cultivo del arándano en el Perú" para la realización del presente trabajo de investigación, su orientación, apoyo y consejo, ayudaron a mi formación profesional y personal. Sin ellos el presente trabajo no hubiese culminado con éxito.

Al FONDECYT por haber financiado la investigación.

A mis compañeros y al Ing. Gean Carlo Ciprian Salcedo del Laboratorio de Biotecnología 2 y 3 del PIPS en Cereales y Granos Nativos por su tiempo y múltiples conversaciones que ayudaron a mi formación profesional con su experiencia y consejos.

Agradecimiento especial al Ing. Agr. Mg. Sc. Andrés Virgilio Casas, por la oportunidad otorgada en tiempo de pandemia en la ejecución de la presente tesis.

A la Blg. Cledy Ureta por sus críticas, comentarios y apreciaciones, valiosos en la investigación.

Agradecer al Ing. Sc. Alejandro Llanos Melo por su tiempo y conversaciones que ayudaron en el presente trabajo

Al Dr. Alexis Dueñas por su valioso aporte brindado para el análisis de los datos del presente estudio.

Al personal de la Clínica de Diagnóstico (Sra. Angelica Garcia y Srta. Elsa Perez) y al laboratorio de Post-cosecha (Srta. Paola Suarez) por su constante apoyo en la realización de mi trabajo de investigación, convirtiéndose como en una segunda familia para mí.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	Generalidades de <i>Botrytis cinerea</i>	3
2.2.	Caracterización morfológica e identificación molecular de especies de <i>Botrytis</i> spp.....	3
2.3.	Análisis filogenéticos	4
2.4.	Genes nucleares	4
2.5.	Control químico de <i>Botrytis</i> spp.....	5
2.6.	Resistencia a fungicidas	6
2.7.	Resistencia fenotípica.....	6
2.8.	Descripción de los fungicidas usados en el ensayo	7
2.9.	Medios de cultivo	9
III.	MATERIALES Y METÓDOS	10
3.1.	Localización.....	10
3.2.	Material biológico.....	10
3.3.	Activación de cepas	10
3.4.	Caracterización morfológica y cultural de aislamientos de <i>Botrytis spp</i>	10
3.5.	Identificación molecular	11
3.6.	Evaluación en medio envenenado.....	14
3.7.	Diseño experimental y tratamientos.....	16
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1.	Aislamiento	18
4.2.	Caracterización morfológica y cultural de los aislamientos	19
4.3.	Análisis filogenético	23
4.4.	Efecto de medios de cultivo.....	33
4.5.	Comparación de medios de cultivo por cada fungicida	34

V. CONCLUSIONES.....	51
VI. RECOMENDACIONES.....	52
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	53
VIII. ANEXOS	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Primers usados para la amplificación por PCR y secuenciación de diferentes regiones para la identificación molecular de aislados de <i>Botrytis</i> spp., obtenidos del cultivo de arándano.....	12
Tabla 2: Dosis de acetato de sodio empleados para 1 l de agua en medio in-vitro.	15
Tabla 3: Dosis de fungicidas químicos empleados para el ensayo mediante el método de medio envenenado in vitro.	17
Tabla 4: Aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> obtenidos de las zonas de Trujillo Lima, Ica y Ancash	18
Tabla 5: Rango de dimensiones de las estructuras conidióforos, conidios y esclerocios procedentes de Trujillo, Lima, Ica e Ancash en el medio de cultivo PDA a 25°C.....	20
Tabla 6: Caracterización cultural de aislamientos provenientes de flores y frutos de arándanos aislados de Trujillo, Lima, Ica e Ancash	23
Tabla 7: Características de las secuencias parciales obtenidas para los genes (G3PDH, HSP60 y RPB2)	27
Tabla 8: Modelos obtenidos para los genes G3PDH, HSP60 y RPB2	28
Tabla 9: Diámetro promedio del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> (mm) de todos los tratamientos en las cinco evaluaciones, DDI: Días después de inoculación.....	33
Tabla 10: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de <i>Botrytis cinerea</i> en medio envenenado con Fenhexamid.....	35
Tabla 11: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de <i>Botrytis cinerea</i> en medio envenenado con Fludioxonil.....	38
Tabla 12: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de <i>Botrytis cinerea</i> en medio envenenado con iprodione	40
Tabla 13: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de <i>Botrytis cinerea</i> en medio envenenado con Methyl-Thiophanato.....	42
Tabla 14: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de <i>Botrytis cinerea</i> en medio envenenado con Pyraclostrobin.	45
Tabla 15: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de <i>Botrytis cinerea</i> en medio envenenado con Boscalid.....	47
Tabla 16: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de <i>Botrytis cinerea</i> en medio envenenado con Fluopyram	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Condiciones de amplificación de PCR para los genes ITS, G3PDH, HSP60 y RPB2.....	13
Figura 2: Aislamientos aislados de arándano. A-C. Aislamientos correspondientes a la zona de Trujillo. D-F. Aislamientos correspondientes a la zona de Lima. G. Aislamiento correspondiente a la zona de Ica. H. Aislamiento correspondiente a la zona de Ancash....	21
Figura 3: Árbol filogenético basado en espaciador transcrito interno para el complejo <i>Botrytis cinerea</i> . Los valores de probabilidad posterior (PP) y el soporte Bootstrap (BS) son mostrados en los nodos (PP/BS).	25
Figura 4: Productos de PCR usando los primers HSP60for/HSP60rev.....	26
Figura 5: Productos de PCR usando los primers G3PDHfor/G3PDHrev	26
Figura 6: Productos de PCR usando los primers RPB2for/RPB2rev	27
Figura 7: Árbol filogenético inferido por el modelo Bayesiano GTR+G, con el conjunto de datos que contiene las secuencias de DNA parciales del gen G3PDH.....	29
Figura 8: Árbol filogenético inferido por el modelo Bayesiano GTR+G, con el conjunto de datos que contiene las secuencias de DNA parciales del gen HSP60.....	30
Figura 9: Árbol filogenético inferido por el modelo Bayesiano GTR+G, con el conjunto de datos que contiene las secuencias de DNA parciales del gen RPB2.	31
Figura 10: Árbol filogenético inferido por el modelo Bayesiano GTR+G, con el conjunto de datos que contiene las secuencias parciales del DNA concatenadas de los genes G3PDH +HSP60+RPB2.	32
Figura 11: Comportamiento temporal del diámetro de crecimiento micelial (mm), durante los cinco días después de la inoculación de micelio de <i>Botrytis cinerea</i> para las diferentes concentraciones de sodio.	34
Figura 12: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Fenhexamid para los ocho aislamientos empleados al cuarto día	36
Figura 13: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Fludioxonil para los ocho aislamientos empleados al cuarto día.	38
Figura 14: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Iprodione para los ocho aislamientos empleados al cuarto día	41
Figura 15: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Methyl-Thiophanato para los ocho aislamientos empleados al cuarto día.....	43

Figura 16: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Pyraclostrobin para los ocho aislamientos empleados al cuarto día.....	45
Figura 17: Comparación de medio PDA y YBA en medio envenenado con Boscalid para los ocho aislamientos empleados al cuarto día	48
Figura 18: Comparación de medio PDA y YBA en medio envenenado con Fluopyram para los ocho aislamientos empleados al cuarto día	50

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Medios de cultivo.....	65
Anexo 2: Números de accesoión de las obtenidas del GenBank.....	67
Anexo 3: Secuencia consenso de los genes nucleares empleados.....	70

RESUMEN

En la actualidad *Botrytis cinerea* es la enfermedad de importancia que ataca berries en Perú. Asimismo, es el patógeno que ataca múltiples órganos y en diferentes estados fenológicos de la planta. Por ello las estrategias es la aplicación de diversos ingredientes activos, pero existen reportes sobre ingredientes activos que está generando variabilidad en este patógeno y se desarrolla dentro del mismo campo en el Perú, ya que no están enfocados en su grado de sensibilidad a fungicidas en base a sus grupos químicos. El objetivo del presente trabajo fue determinar la eficacia de siete fungicidas dosis discriminadora y evaluar la utilidad de diferentes marcadores moleculares para caracterizar su diversidad genética. Se estudiaron, ocho aislamientos de diferentes zonas productoras de arándano que fueron caracterizados morfológicamente y molecularmente mediante análisis filogenético cuatro marcadores. La caracterización morfológica no mostró diferencias entre los aislamientos y la caracterizaron molecularmente mediante amplificación de DNA y la secuencia del gen ITS presentó identifican en el género. Por ello se trabajó con los genes nucleares G3PDH, HSP60 y RPB2 donde se confirmó la identificación de los aislados en estudio como *Botrytis cinerea*. A nivel *in-vitro* no se encontró diferencia en medio PDA y MEA para fludioxonil y si se encontró diferencias entre los fungicidas thiofanato-methyl, pyraclostrobin, iprodione y fenhexamid en el uso de medios PDA y MEA, también se encontró una diferencia de sensibilidad en medio YBA en comparación con medio PDA en boscalid y fluopyram.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, G3PDH, HSP60, RPB2, medio envenenado.

ABSTRACT

Currently, *Botrytis cinerea* is a significant disease that affects berries in Peru. It is a pathogen that attacks multiple organs and different phenological stages of the plant. Therefore, strategies involve the application of various active ingredients. However, there are reports of active ingredients that are generating variability in this pathogen within the same field in Peru, as they are not focused on its sensitivity to fungicides based on their chemical groups. The objective of this study was to determine the efficacy of seven fungicides at discriminatory doses and evaluate the utility of different molecular markers to characterize its genetic diversity. Eight isolates from different blueberry-producing regions were morphologically and molecularly characterized using phylogenetic analysis of four markers. Morphological characterization did not show differences among the isolates. Molecular characterization was performed by DNA amplification, and the ITS gene sequence showed limitations in genus identification. Therefore, nuclear genes G3PDH, HSP60, and RPB2 were used, confirming the identification of the isolates as *Botrytis cinerea*. In vitro, no differences were found between PDA and MEA media for fludioxonil, while differences were observed for the fungicides thiofanato-methyl, pyraclostrobin, iprodione, and fenhexamid when using PDA and MEA media. Additionally, a difference in sensitivity was found in YBA medium compared to PDA medium for boscalid and fluopyram.

Key words: *Botrytis cinerea*, G3PDH, HSP60, RPB2, poisoned medium.

I. INTRODUCCIÓN

Botrytis cinerea es el agente causal que causa la enfermedad conocida como "moho gris" y afecta a más de 200 cultivos en todo el mundo, incluyendo uvas de mesa, cítricos, frutas de hueso y arándanos. En particular, la podredumbre por este hongo es una preocupación importante en la producción de arándanos en Perú, donde se han adaptado variedades como Biloxi, Misty y Legacy que han permitido consolidar al país como el principal proveedor mundial de esta fruta, con ingresos de 810 millones de dólares en el 2019 (Collantes y Altamirano, 2020; Saito et al., 2016; Saito y Xiao, 2018).

Es crucial controlar la propagación de *Botrytis* spp., por ello, el uso de fungicidas químicos es el principal mecanismo de control, sin embargo, el uso constante de estos fungicidas ha generado resistencia en *Botrytis cinerea*, lo que significa que se han vuelto menos efectivos en el control de la enfermedad. Esto se debe a mutaciones en el hongo, lo que ha llevado a cambios en su sensibilidad a los ingredientes activos en los fungicidas químicos (Grimmer et al., 2015; Petit et al., 2010).

Los 5 grupos que pertenecen a los siguientes grupos FRAC: Keto Reductase Inhibitors (KRI), Anilino-Pyrimidines (AP), Phenyl Pyrroles (PP), dicarboximides, Methyl Benzimidazole Carbamates (MBC), Quinone outside Inhibitors (QoI), fueron introducidos en el mercado, teniendo como objetivo las distintas funciones celulares: citoesqueleto (microtúbulos), respiración mitocondrial y síntesis de ATP, biosíntesis de ergosterol, biosíntesis de proteínas o aminoácidos, señal de transducción, de los cuales ejercen acción botrycida (Fillinger y Walker, 2016). Este trabajo tiene como objetivo evaluar los niveles de sensibilidad a fungicidas de los aislamientos caracterizados de *Botrytis cinerea* en diferentes zonas de Perú y proporcionar una línea base para futuros estudios sobre el control efectivo de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar e identificar aislamientos de *Botrytis* spp., provenientes de arándanos de la costa peruana, pertenecientes a la colección del proyecto Fondecyt 360-2019.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente ocho aislamientos de *Botrytis* spp.
- Identificar molecularmente ocho aislamientos de *Botrytis* spp., con cuatro genes de filogenia ITS, G3PDH, HSP60 y RPB2.
- Evaluar la sensibilidad en medio envenenado con el método Cosseboom y método convencional para 7 ingredientes activos a una dosis discriminatoria frente a *Botrytis* spp. a nivel de laboratorio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de *Botrytis cinerea*

2.1.1. Taxonomía

Según la clasificación taxonómica, *Botrytis cinerea* Pers., es el nombre que recibe el estado conidial imperfecto de esta especie mientras que el estado perfecto esta como *Botryotinia fuckeliana*. De acuerdo a Espinosa (2006) la clasificación taxonómica:

Reino:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Subphylum:	Pezizomycotin
Clase:	Letiomycetes
Orden:	Heliales
Familia:	Sclerotiniacea
Género:	Botryotinia
Especie:	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

Gran parte de los taxónomos recomiendan usar el nombre en estado sexual *Botryotinia fuckeliana*, pero debido a la extensión que presenta esta enfermedad, el nombre en estado asexual es el más popular (Santos 2003 y Espinosa 2006).

2.2. Caracterización morfológica e identificación molecular de especies de *Botrytis* spp.

En los últimos años, se ha avanzado en el desarrollo de técnicas para la identificación de hongos, tanto a través de características morfológicas como moleculares. La identificación morfológica se basa en la observación de características macroscópicas y microscópicas de las colonias, pero puede resultar limitada en la delimitación de algunas especies debido a la variación que puede presentarse en condiciones de cultivo.(Beever y Weeds, 2007).

La identificación molecular de hongos se basa en la secuenciación de genes específicos o regiones del ADN, lo que permite mayor precisión en la identificación de especies, especialmente en aquellas que son difíciles de distinguir mediante métodos morfológicos. Una técnica comúnmente utilizada es la secuenciación de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADN nuclear ribosomal, que contiene regiones altamente conservadas y variables. La identificación precisa de hongos es crucial en diversos campos de investigación, ya que algunas especies pueden ser patógenas o tener aplicaciones industriales.(Copier, 2013; Díaz, 2016; White et al., 1990).

2.3. Análisis filogenéticos

El análisis filogenético es una técnica que permite estudiar la evolución genética y determinar las relaciones entre diferentes organismos. Esta técnica se basa en homologías, características que se mantienen inalterables desde su aparición. Los árboles filogenéticos son una representación gráfica de la relación ancestros-descendientes entre secuencias de genes u organismos, y se analizan estadísticamente mediante diferentes técnicas. Estos análisis son necesarios en diversos campos, como la biología evolutiva y la taxonomía, y se utilizan para entender la diversidad biológica y las relaciones evolutivas entre los seres vivos.(Li et al., 2012; Meléndez-Hevia et al., 1997; Díaz, 2016).

La inferencia Bayesiana es un método estadístico utilizado en análisis filogenéticos para determinar la relación evolutiva entre diferentes especies. Se basa en tres elementos: la probabilidad a priori, la verosimilitud y la probabilidad de las anteriores hipótesis. Para llevar a cabo este análisis se utiliza el programa informático Mr. Bayes, que se basa en el algoritmo Markov chain Monte Carlo (MCMC). Este proceso permite obtener información precisa sobre la evaluación genética y la relación evolutiva entre diferentes especies (Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Ronquist et al., 2012).

2.4. Genes nucleares

a) Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)

La enzima GAPDH o G3PDH es esencial en la glucólisis, aunque se han propuesto otras funciones adicionales en patógenos eucariotas y procariotas. En los hongos filamentosos, el gen GAPDH normalmente se encuentra en una única copia, aunque también puede existir

en dos o tres copias. Esta proteína suele ser altamente expresada y puede representar hasta el 5% del contenido total de proteínas solubles en diversas especies eucariotas. Además, el gen GAPDH está controlado por un promotor altamente activo que ha sido utilizado para la construcción de sistemas de transformación en varios hongos (Lima et al., 2009).

b) Proteína de shock térmico (HSP60)

Las proteínas de shock térmico (HSPs) son un grupo selectivo de proteínas que son reguladas en respuesta a diferentes condiciones ambientales, metabólicas o de estrés fisiológico. Estas proteínas se dividen en seis familias según su peso molecular y homologías en las secuencias de aminoácidos, incluyendo Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y Hsp pequeñas, y tienen funciones específicas en el plegado, replegado, translocación y/o degradación de proteínas sustrato. La Hsp60 es altamente conservada en la evolución y consta de varios módulos funcionales que pueden ser alterados por mutación o por la unión de compuestos químicos específicos (Bakthisaran et al., 2015; Cappello et al., 2014; Caruso et al., 2020).

c) Subunidad II de la ARN polimerasa dependiente del DNA (RPB2)

En hongos, el gen RPB2 codifica para la segunda subunidad proteica más grande y se encuentra altamente conservado, presentando una sola copia en su genoma. Existen doce regiones altamente conservadas en la subunidad RPB2 que muestran una identidad de aminoácidos mayor al 85% entre los hongos. Debido a esta conservación, la secuencia parcial del gen RPB2 se ha utilizado junto con datos morfológicos, nucleótidos y secuencias polipeptídicas en análisis de parsimonia para comprender la evolución de los ascomicetos superiores e inferiores formadores de líquenes (Malkus et al., 2006; Větrovský et al., 2016).

2.5. Control químico de *Botrytis* spp.

En la protección de cultivos contra el moho gris (*B. cinerea*), el uso principal de control ha sido la aplicación de fungicidas sintéticos, los cuales han demostrado eficacia en su combate (Fillinger y Elad, 2016). Sin embargo, el abuso en el uso de fungicidas ha llevado a la resistencia del patógeno a muchos de ellos (Grabke y Stammler, 2015).

Hay diferentes tipos de fungicidas registrados para el control de *B. cinerea*, que se clasifican en preventivos y curativos, así como en sistémicos y de contacto, en este sentido, se puede

establecer una división entre el control sistémico de contacto y el control preventivo o curativo (McGrath, 2004).

2.6. Resistencia a fungicidas

La resistencia a fungicidas es un fenómeno genético que se produce en la célula del hongo como resultado de mutaciones cromosómicas. La resistencia puede variar en grado y sensibilidad, y es causada por la exposición prolongada a fungicidas agrícolas (Peerzada et al., 2020; Georgopoulos y Zaracovitis, 1967). La reducción hereditaria adquirida de la sensibilidad de un hongo a un fungicida se conoce como resistencia a fungicidas, y puede tener graves consecuencias en los cultivos, incluyendo brotes inesperados de enfermedades y daños severos en los cultivos, lo que requiere un aumento en las dosis de fungicidas (FRAC, 2022; Calderón, 2020).

Los diferentes modos de acción de los fungicidas se han categorizado con letras desde A hasta P, y los mecanismos de acción específicos son responsables de la resistencia fúngica debido a los cambios en la célula del hongo que afectan los diferentes sitios de acción (FRAC, 2022).

2.7. Resistencia fenotípica

B. cinerea es un patógeno que presenta una gran cantidad de enzimas y metabolitos que se liberan en diferentes etapas de invasión, lo que le permite manipular la respuesta hipersensible de la planta y promover la muerte celular programada como parte de su estrategia de virulencia. El conocimiento detallado del perfil del patógeno puede ser útil para contrarrestar de manera efectiva los factores de virulencia de los hongos y para el desarrollo de métodos realistas de protección de las plantas. *B. cinerea* es un modelo ideal para el estudio de fuentes de variación en hongos fitopatógenos debido a las variaciones fenotípicas significativas que presenta, tales como crecimiento, patrón de conidiación, formación de esclerocios, producción de toxinas y virulencia, lo que brinda la oportunidad de realizar investigaciones más profundas en este campo (Sharma y Kapoor, 2017).

2.8. Descripción de los fungicidas usados en el ensayo

2.8.1 Fenhexamid

Pertenece al grupo de los hydroxylanilides y es conocido como uno de los fungicidas más utilizados para el control de *Botrytis cinerea*. Su modo de acción se basa en la inhibición de la 3-ketoreductasa (Erg27) en la vía de biosíntesis del ergosterol y pertenece al grupo de los KetoReductase Inhibitors (KRI) (SBI: Clase III). A pesar de su eficacia, existe el riesgo de que aparezcan aislados resistentes debido a su modo de acción específico y su uso excesivo. De hecho, se han reportado aislados resistentes de campo en varios países, incluyendo Francia, Japón, Estados Unidos y Alemania, lo que amenaza la eficacia del fenhexamid para controlar el moho gris. (Fillinger y Walker, 2016; Grabke et al., 2013; Grabke y Stammler, 2015; Mercier et al., 2010; Moorman, 2010; Weber y Hahn, 2011; Weber, 2020).

2.8.2 Fludioxonil

Fungicida de contacto de rápida absorción perteneciente al grupo químico de los phenylpyrroles, con un modo de acción que inhibe la respiración en la mitocondria y un riesgo de resistencia de bajo a medio (Brandhorst y Klein, 2019). Aunque se ha utilizado ampliamente para el control de diversas enfermedades en plantas, desde mediados de la década de 1990 se ha empleado especialmente para el control de *Botrytis cinerea*. Sin embargo, en los últimos años se ha informado de la aparición de resistencia de *B. cinerea* al fludioxonil en diferentes lugares de China y Alemania. Esta resistencia ha sido reportada en varios hongos, incluyendo *B. cinerea*, y se asocia con la sobreexpresión del gen *atrB*, que codifica un transportador de la ATP-binding cassette (ABC), y con una mutación en la histidina kinasa *Os1* (Ren et al., 2016; Sang et al., 2018; Wang et al., 2021; Weber, 2020).

2.8.3 Iprodione

Producto que pertenece al grupo de las dicarboximidias y tiene un alto grado de absorción y sistemicidad local. Aunque no es fácilmente móvil dentro de la planta, su modo de acción es preventivo, ya que inhibe la germinación de las esporas y el desarrollo del micelio. Este fungicida presenta riesgo de resistencia bajo a medio. Desde la década de 1970, se ha utilizado el iprodione para controlar la propagación de *B. cinerea*, aunque se han reportado casos de resistencia en diferentes regiones, como Australia, Alemania, Brasil y China. (Baggio et al., 2018; Yin et al., 2018; Harper et al., 2021; Weber, 2020).

2.8.4 Thiofanato-metil

Pertenece al grupo químico de los tiofanatos, siendo su grupo el Methyl Benzimidazole Carbamates (MBC) actuando sobre la respiración del hongo e impidiendo la normal captación del oxígeno que ocasionan interferencia en la producción de ATP, es decir inhibe el crecimiento del hongo, tienen un doble modo de acción: contacto y sistémica, lo que permite ser efectivo en el control con un riesgo alto de resistencia (FRAC, 2022).

2.8.5 Pyraclostrobin

Fungicida estrobilurínico de uso común que inhibe la respiración mitocondrial del centro de la oxidación de la ubiquinol en el complejo de citocromo bc1 perteneciente al grupo químico de los methoxy-carbamates del grupo Inhibidores de la Quinona externa (QoI), teniendo su modo de acción como un fungicida preventivo-erradicante y a su vez es antiesporulante que bloquea el abastecimiento de energía de la célula del hongo con un riesgo alto de resistencia (FRAC, 2022). Desde la aparición de este ingrediente activo se han hecho reportes de resistencia en los siguientes lugares como China, Estados Unidos y Alemania (Alzohairy et al., 2021; Saito et al., 2019; Shao et al., 2021).

2.8.6 Boscalid

Los fungicidas inhibidores del succinato deshidrogenasa (SDHI) actúan al unirse al sitio de unión de la ubiquinona de la enzima mitocondrial del succinato deshidrogenasas (SDH), impidiendo la producción de energía celular y su modo de acción presenta un efecto preventivo que inhibe el desarrollo y la penetración del tubo germinativo (Cui et al., 2021; FRAC, 2022). A pesar de su eficacia, *B. cinerea* ha desarrollado resistencia a estos fungicidas en varios países como Alemania, Estados Unidos y China, lo que plantea un riesgo de resistencia de medio a alto (Hauschildt et al., 2020; Saito et al., 2019).

2.8.7 Fluopyram

Tiene como modo de acción la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) siendo esta enzima un complejo proteico ligado a la membrana interna mitocondrial que interviene en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones, este complejo enzimático acopla la oxidación de succinato a la fumarato con la reducción de la ubiquinona (UQ) a ubiquinol (UQH₂), el cual transporta los electrones del complejo II al complejo III, continuando con la cadena transportadora de electrones (Avenot y Michailides, 2010; FRAC, 2022). Por ello el reporte de resistencia se ha dado en Alemania y Estados Unidos (Amiri et al., 2013, 2014; Saito et al., 2019; Weber y Hahn, 2019).

2.8.8 Inhibidor alternativo de la oxidasa (SHAM)

B. cinerea puede desarrollar resistencia a fungicidas, incluyendo los inhibidores del transporte de electrones y de la succinato deshidrogenasa. Una posible forma de resistencia es mediante la activación de una vía alternativa de respiración mediada por una oxidasa alternativa (AOX), lo que permite la germinación de esporas aún en presencia de altas dosis de fungicidas. Para suprimir esta vía alternativa, se utiliza comúnmente el ácido salicilhidroxámico (SHAM) en los medios de cultivo artificial. Además, se cree que el SHAM tiene una toxicidad directa sobre el patógeno. Es importante considerar estos mecanismos de resistencia al diseñar estrategias de control de B. cinerea (Kubicek et al., 1980; Liang et al., 2015).

2.9. Medios de cultivo

Preparación sólida o líquida que es empleada para cultivar, transportar y almacenar microorganismo que provee una condición ambiental apropiada y para que sea efectivo, el medio debe contener todos los nutrientes que el microorganismo necesita para multiplicarse. Hay ciertos factores que deben ser controlados durante la multiplicación que incluye los nutrientes, pH, temperatura, aireación, concentración de sales (Anexo 1)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

La presente investigación se realizó en los laboratorios del departamento de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología ubicado en el distrito de La Molina en la ciudad de Lima-Perú.

3.2. Material biológico

Se evaluó ocho los aislamientos de *Botrytis* spp. colectados de flores y frutos con síntomas de las temporadas 2021-2022, de los fundos comerciales que fueron procedentes de las zonas de Trujillo, Lima, Ancash e Ica que fueron aislados de arándano de la colección del proyecto de Concytec titulado “Diversidad genética de *Botrytis* spp. Causante del moho gris, en las principales zonas productoras del cultivo de arándano en el Perú”.

3.3. Activación de cepas

Las cepas conservadas en agua destilada, se activaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), el medio estéril se vació en cajas de Petri de cristal de 8.5 cm de diámetro; una vez solidificado se procedió a sembrar las cepas, y se mantuvieron en oscuridad dentro de una incubadora a temperatura de 25 ± 2 °C.

3.4. Caracterización morfológica y cultural de aislamientos de *Botrytis* spp.

Se realizó a partir de colonias en medio PDA obtenidos por repique por duplicado de disco de 5 mm diámetro de márgenes de colonia de aislamientos activados con cuatro días de crecimiento, mantenido en medio PDA a 20°C (Martinez et al., 2003).

3. 4. 1. Caracterización morfológica

Se midieron las características morfológicas, como la longitud del conidióforo y las dimensiones de los conidios y los esclerocios. Para la producción de los conidióforos y conidios, los aislados de *Botrytis* spp. se cultivaron en placas Petri que contendrán PDA durante 4 días a 25°C bajo luz donde se va ver diariamente la presencia de la esporulación y así se hizo montaje con lactofenol para poder tinturar los conidióforos y conidios para los esclerotes se dejó en la conservadora por 20°C bajo oscuridad por 2 semanas para poder medirlos (Copier, 2013; Mirzaei *et al.*, 2008).

3. 4. 2. Caracterización cultural

Se realizó en colonias cultivadas sobre medio PDA mantenidas a oscuridad continua, empleándose 4 repeticiones por aislamiento por 3 semanas a 20°C. Se evaluaron los criterios de aspecto miceliar, esporulación y capacidad de formadora de esclerocios, propuestos por Martínez *et al.* (2003) adoptados por Esterio (2005).

3.5. Identificación molecular

3. 5. 1. Extracción de ADN

Para la extracción del DNA genómico se cultivó el hongo en medio PDA durante 3 días a 20°C. La extracción del DNA genómico se realizó por duplicado para cada aislamiento siguiendo el protocolo de Saitoh *et al.* (2006) adaptado por Huarhua (2018) empleado por la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología de la UNALM.

3. 5. 2. PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue realizada usando cebadores ya reportados que son específicos, amplificando las regiones del espacio transcrito interno (ITS) utilizando los cebadores, ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') y ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') para identificar genéticamente a *Botrytis cinerea* (White *et al.*, 1990).

Asimismo, se evaluó los fragmentos parciales de genes nucleares como: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*G3PDH*), proteína de choque térmico (*HSP60*) y subunidad 2 del ARN polimerasa (*RPB2*) (Staats *et al.*, 2005).

Antes de realizar las reacciones para los 8 aislamientos y para poder determinar la cantidad mínima de DNA con la que podríamos obtener una banda visible, se evaluó la sensibilidad de los tres juegos de primers sobre un aislamiento de la colección empleada, para así poder emplear concentraciones de DNA de 50 ng/ μL , 20 ng/ μL y 1 ng/ μL siguiente procedimiento.

La PCR se llevó a cabo utilizando los iniciadores G3PDHfor/G3PDHrev, HSP60for/HSP60rev y RPB2for/RPB2rev (Tabla 1) para amplificar los fragmentos parciales de la *G3PDH*, *HSP60* y *RPB2*, respectivamente (Staats et al., 2005). Las amplificaciones se realizaron con un termociclador (Thermo Scientific). Cada reacción de PCR fue realizada mezclando 5 μL del buffer Taq 5X, 1 μL de DNTP, 3 μL de 25 mM MgCl_2 , 0.25 μL de Taq polimerasa (Promega), 36.75 μL agua ultrapura estéril, 1 μL de 20 μM cada cebador y 2 μL de DNA total obteniendo un volumen final de 50 μL . La programación del termociclador fue descrita por Zhang et al. (2018) en donde la desnaturalización inicial fue de 94°C durante 5 min; seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación por 30 segundos a 64°C para *G3PDH*, 60°C para *HSP60* y 55°C para *RPB2*, seguida de elongación a 72°C por 90 segundos, y una extensión final a 72°C por 10 min (Figura 1). La formación de productos de amplificación por PCR fue comprobada mediante gel de agarosa al 1.5% preparado con tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X), teñido con hydragreen y sometido a 90V por 1 hora; para la observación de los fragmentos se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP. El marcador referencia de corrida utilizado fue Ladder 1kb de Norgen.

Tabla 1: Primers usados para la amplificación por PCR y secuenciación de diferentes regiones para la identificación molecular de aislados de *Botrytis* spp., obtenidos del cultivo de arándano.

Gen	Primer	Secuencias (5'->3')	Producto	Referencias
<i>G3PDH</i>	G3PDH-for	ATTGACATCGTCGCTGTCAACGA	900pb	Staats et al., 2005
	G3PDH-rev	ACC CCACTC GTT GTC GTA CCA		
<i>HSP60</i>	HSP60-for	CAACAATTGAGATTTGCCCAACAAG	1100bp	
	HSP60-rev	GATGGATCCAGTGGTACCGAGCAT		
<i>RPB2</i>	RPB2-for	GATGATCGTGATCATTTTCGG	1200pb	
	RPB2-rev	CCCATAGCTTGCTTACCCAT		

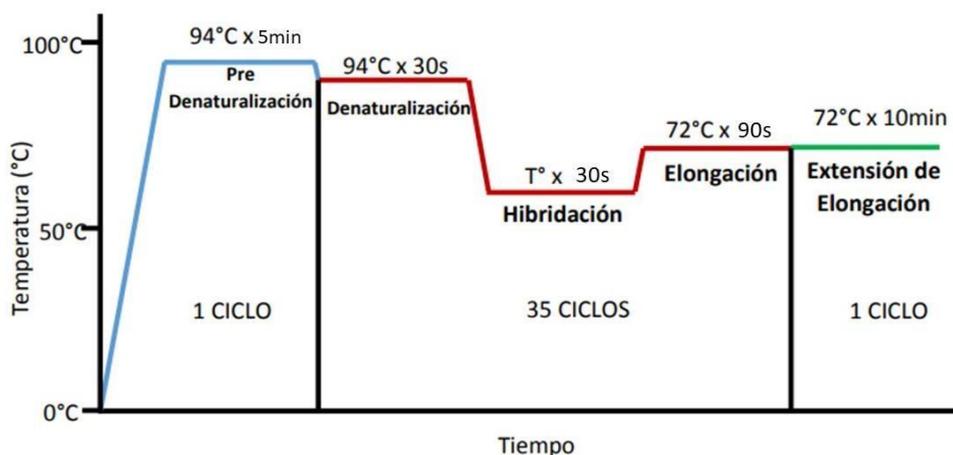


Figura 1: Condiciones de amplificación de PCR para los genes ITS, G3PDH, HSP60 y RPB2

3. 5. 3. Análisis de las secuencias de PCR

De los productos obtenidos por PCR serán enviados y secuenciados en un laboratorio de Corea. Mediante el uso del programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5, se analizará y editará la secuencia de las hebras forward y reverse con respecto al electroferograma correspondiente. Las secuencias de DNA se compararán en el GenBank en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando el programa BLAST (Basic Local alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. 5. 4. Diferenciación de los grupos *Botrytis cinerea*

La diferenciación de los grupos de *B. cinerea*, se amplificó con el DNA obtenido usando los cebadores que se emplearon en el protocolo de Leroy et al. (2013a); Plesken et al. (2015); Rigotti et al. (2002) adaptado por Tauma (2021) empleado en el laboratorio de molecular de la UNALM.

3. 5. 5. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Para obtener los datos de los genes relacionados a *Botrytis* spp. primero se descargaron las secuencias de nucleótidos codificantes de 36 géneros de *Botrytis* del repositorio de genomas del NCBI (del inglés, National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), donde se consideraron 5 especies de *B. californica*, 1 especie de *B. caroliniana*, 12 especies de *B. cinerea*, 3 especies de *B. fabae*, 5 especies de

B. Group S, 7 especies de *B. pseudocinerea* y 1 especie de *B. sinovitcola* (Anexo 2). La selección de estos genomas se llevó a cabo bajo el criterio de que tuvieran ensamble en el GenBank, con el fin de analizar los genomas con mejor anotación de los genomas. Después de obtener las secuencias nucleotídicas para cada gen de las 5 especies incluyendo las secuencias de estudio y el fuera de grupo *S. sclerotiorum*, se alineó utilizando el algoritmo MAFFT v7 (Katoh y Standley, 2013; <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), después del proceso de secuenciación se obtuvieron los datos en forma de lecturas contenidas en archivo fasta (Katoh y Standley, 2013). Las secuencias obtenidas se editaron usando el software MEGA 7.018 Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Biodesign Institute, Arizona State University, USA (Tamura et al., 2011). Cada alineamiento de ITS y los genes nucleares de G3PDH, HSP60 y RPB2 fue concatenado en Mesquite (Maddinson y Maddinson, 2007).

Se determinó el modelo evolutivo de mejor ajuste a los datos, usando el programa jModeltest (Posada, 2009), siendo un problema si se escoge un modelo equivocado para cada gen individualmente, por ello usando el análisis de Inferencia Bayesiana está basado en un modelo probabilístico de evolución de las secuencias que contiene de inserción y delección, así como eventos de sustituciones y así elegir modelos más sencillos, en general, cada gen ha sido analizado solo y con un número de variables de aislados que se analiza usando MrBayes v.3.1.2 (Posada, 2009; Ronquist et al., 2012; Ronquist y Huelsenbeck, 2003)

Todos los árboles se visualizaron en FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Los análisis de máxima verosimilitud (ML) se realizaron con el programa raxmlGUI 2.0 se puede volver a enraizar después del análisis utilizando software de visualización de árboles como FigTree (Rambaut, 2012). Las ramas que recibieron ML (máxima verosimilitud) Bootstrap $\geq 90\%$ y las probabilidades ≥ 0.7 se consideraron creíblemente apoyadas (Edler et al., 2021).

3.6. Evaluación en medio envenenado

3.6.1. Efecto de sales en medio YBA

La evaluación del efecto del acetato de sodio se comparó en función al diámetro diario de *B. cinerea* evaluados por 5 días. El diseño del experimento fue completamente al azar, conformado por cinco tratamientos (dosis de acetato de sodio 0 g, 5 g, 10 g, 15 g y 20 g) y cinco repeticiones. Los factores fueron los tratamientos diferentes formulaciones empeladas del medio YBA (Tabla 2).

Tabla 2: Dosis de acetato de sodio empleados para 1 l de agua en medio in-vitro.

Tratamiento	Levadura (gr/L)	Bacto peptona (gr/L)	Acetato de Sodio (gr/L)	Agar (gr/L)
TS1	20	20	20	15
TS2	20	20	10	15
TS3	20	20	5	15
TS4	20	20	0	15
TS5	10	10	20	15

3. 6. 2. Efecto de medio de cultivos: PDA, MEA, YBA

Se preparó el medio de cultivo PDA (H.-J. Liang et al., 2015), MEA (Cosseboom et al., 2019) y YBA (Miyamoto et al., 2009; Stammler et al., 2007; Stammler y Speakman, 2006; Weber y Hahn, 2011), el cual se vertió en botellas de vidrio a la misma cantidad de (100ml) y posteriormente se esterilizará en el autoclave.

Los fungicidas en forma líquida, se diluyeron de acuerdo a las dosis descritas para los tratamientos tomando en cuenta la referencia la cantidad del medio MEA y del medio YBA (Fernández-Ortuño et al., 2014, 2017; Ishii et al., 2011; Leroch et al., 2013a) preparados en las botellas. Los fungicidas sólidos fueron pesados por una balanza analítica digital. Los fungicidas con dosis por hectárea se midieron de acuerdo a la cantidad de agua utilizada para el cultivo de arándano.

Se emplearon 8 tratamientos donde se evaluó 7 ingredientes activos y 1 control (testigo sin aplicación). Las concentraciones de los fungicidas a aplicar en base a las dosis discriminatorias y dosis comerciales usadas en campo. Estos fungicidas se vertieron antes del plaqueado, cuando el medio de cultivo se encontraba a una temperatura adecuada. Una vez realizado el proceso de plaqueado se procederá a que el medio de cultivo se solidifique. Cada tratamiento estará conformado por 4 repeticiones.

En el centro de cada placa se colocará un disco micelio del aislamiento de 4 días de edad, con un tamaño de 0.5 cm. El testigo consistirá en la siembra del patógeno en medio de cultivo sin fungicida. Los tratamientos se incubaron a temperatura de 20 ± 2 °C bajo condiciones de oscuridad (Cáceres, 2020, Cosseboom et al., 2020).

3.7. Diseño experimental y tratamientos

Cuando al menos una repetición del testigo cubrió el 100 % de la placa de Petri se dio por finalizado el experimento. Para el análisis (con el apoyo de un plumón indeleble de punto fino) se trazó el margen del crecimiento radial de cada colonia evaluados diariamente, se tomaron fotografías.

3.7.1. Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) Factorial para la fase de evaluación se utiliza placas de Petri donde se evaluarán ocho aislamientos (unidades experimentales) de *Botrytis* spp. y un factor discriminatorio (Tratamiento) y un factor de medio de cultivo. Se trabajará con el DCA con el Modelo Aditivo Lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$i = 1, 2, \dots, t(\text{tratamientos})$

$j = 1, 2, \dots, r(\text{repeticiones})$

Y_{ijk} = Observación del i-ésimo tratamiento y j-ésimo repetición.

μ = Media poblacional.

A_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor TRATAMIENTO

B_j = Efecto del i-ésimo nivel del factor MEDIO DE CULTIVO

AB_{ijk} = Efecto de la interacción del j-ésimo del factor TRATAMIENTO y el j-ésimo del factor MEDIO DE CULTIVO

ε_{ijk} = Efecto del error experimental

3.7.2. Tratamiento

Se evaluaron 7 fungicidas y un testigo (sin fungicida), cada tratamiento con cuatro repeticiones (Tabla 3). Cabe señalar que las dosis serán establecidas en función a las dosificaciones de Cosseboom et al. (2019).

Tabla 3: Dosis de fungicidas químicos empleados para el ensayo mediante el método de medio envenenado in vitro.

Tratamiento	Ingrediente Activo	Dosis discriminatoria (μg ia/ml)	Medios de cultivo
T1	Testigo	0.00	MEA, PDA
T2	Fludioxonil	0.50	MEA, PDA
T3	Fenhexamid	50.0	MEA, PDA
T4	Iprodione	10.0	MEA, PDA
T5	Thiofanato-metil	100.0	MEA, PDA
T6	Pyraclostrobin	10.0	MEA, PDA
T7	Boscalid	75.0	YBA, PDA
T8	Fluopyram	10.0	YBA, PDA

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento

Se recuperaron ocho aislamientos monospóricos pertenecientes al patógeno *Botrytis cinerea* a partir de flores y frutos de diferentes campos ubicados en los departamentos de Trujillo (Irrigación Chavimochic), Áncash (Carhuaz), Lima (Barranca, Cañete, Huacho) e Ica (Chinca e Ica) (Tabla 4). Siendo tres aislamientos procedentes del departamento de La Libertad (Trujillo), que fueron obtenidos de la variedad de arándano comercial (Roció) y una variedad patentada (BBP2). Además, tres aislamientos de la provincia de Lima fueron obtenidos de variedades de arándano tal como: Biloxi, Emerald y Ventura. Un aislamiento de Ica de la variedad Biloxi. Por último, un aislamiento de Ancash de la variedad Emerald. Estos aislamientos fueron conservados por cuatriplicado en la clínica de diagnóstico de Fitopatología de la UNALM.

Tabla 4: Aislamientos de *Botrytis cinerea* obtenidos de las zonas de Trujillo Lima, Ica y Ancash

Cod. Cepario	Localidad	Fundo	Georreferencia de campo			
			Cultivar	Altitud (m)	Longitud	Latitud
89	Trujillo	Bluberry	BBP2	488	8°32'13.19"S	78°36'32.45"O
106	Trujillo	Hortifrut	Rocio	523	8°35'17.4"S	78°34'50.6"W
109	Trujillo	Hortifrut	Rocio	523	8°35'39.4"S	78°35'59.8"W
94B	Lima	Virgen de las Mercedes	Biloxi	350	10°41'19.0"S	77°40'16.7"W
100A	Lima	Virgen de las Mercedes	Ventura	350	10°41'12.9"S	77°39'40.7"W
103A	Lima	Virgen de las Mercedes	Emerald	350	10°41'49.4"S	77°39'56.7"W
215	Ica	Los Viñedos	Biloxi	545	13°27'38"S	76°09'06.3"W
223	Ancash	San Lauro	Emerald	2291	9°04'54.9"S	77°47'17.3"W

4. 2. Caracterización morfológica y cultural de los aislamientos

a. Caracterización morfológica

Los ocho aislamientos del estudio, desarrollaron micelio uniforme comenzando con una tonalidad blanquecina durante los primeros 5 días en medio PDA seguido se diferenciaron en colonias de tonalidad grisácea, como se puede apreciar en la (Figura 2). Los conidióforos se ramificaron en forma de racimos, sobre las cuales presentaron fiálides y posteriormente conidios de tipo amensporas en forma redondeada u ovoides los cuales coinciden con los estudios previos para *Botrytis cinerea* (Biche, 2019; Gómez, 2013; Plesken et al., 2015). La evaluación general de todas las medidas del conidióforo en función al largo presentó un mínimo de 586.19 μm y un máximo de 1,930.38 μm para el largo y para el ancho presentó un mínimo de 8.67 μm y un máximo de 13.79 μm y para la relación largo/ancho presentó un mínimo de 7.71 μm y un máximo de 123.75 μm . Para la medición de los conidios se presentó un mínimo de 7.8 μm y un máximo de 10.58 μm para el largo y para el ancho presentó un mínimo de 3.61 μm y un máximo de 6.8 μm y para la relación largo/ancho presentó un mínimo de 1.44 μm y un máximo de 2.42 μm . Finalmente con la medición de los esclerocios presentó un mínimo de 1.47 μm y un máximo de 3.95 μm para el largo y para el ancho presentó un mínimo de 1.11 μm y un máximo de 3.02 μm (Tabla 5).

Las medidas del largo del conidióforo se encontró entre 586.19 - 1,930.38 μm se encuentra dentro de los valores reportados por Zhang et al. (2010) (558 - 1396 μm) pero el más amplio a los encontrados por Li et al. (2012) (741 - 2193 μm) y Terrones-Salgado et al. (2019) (859 - 1,437 μm). Con respecto a la relación de los conidios fue de 7.71 - 10.58 x 3.61 -6.38 μm similar a los reportado por (Terrones-Salgado et al., 2019; Zhang et al., 2010). La media del ratio de la relación entre largo y ancho de la conidios fue de 1.71 μm el cual fue mayor a valores encontrados en estudios previos (1.32 – 1.48 μm) con promedio de 1.41 μm (Saito, Michailides, et al., 2016b).

Ellis (1971) reporta que la dimensión de los conidios de *B. cinera* oscilan de 6 – 18 x 4 – 11 μm , y en conidióforos de 2 mm a más de largo por 16 – 30 μm de grosor. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, las mediciones de conidios y conidióforos realizados en total de asilamientos coinciden con los descrito por dicha especie. Para el Perú las investigaciones han mostrado la importancia que tiene *B. cinerea* en el cultivo de arándano, ya que, mediante la caracterización morfológica,

Tabla 5: Rango de dimensiones de las estructuras conidióforos, conidios y esclerocios procedentes de Trujillo, Lima, Ica e Ancash en el medio de cultivo PDA a 25°C.

Código	Conidióforos			Conidio			Esclerocios	
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo/Ancho	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo/Ancho	Largo	Ancho
89	844.12	8.67	97.36	9.8	6.8	1.44	-	-
106	586.19	12.95	45.27	10.46	4.32	2.42	1.47	1.11
109	1144.18	11.63	98.38	10.58	6.38	1.66	2.53	2.15
94B	1,379.58	13.57	101.66	9.16	6.34	1.45	2.33	1.82
100A	899.36	11.87	75.77	9.23	5.59	1.65	3.58	3.02
103A	795.64	8.86	89.80	10.19	5.88	1.73	2.66	2.04
215	1,472.57	11.9	123.75	7.8	3.61	2.16	3.01	2.56
223	1,930.38	13.79	139.98	7.71	5.38	1.43	3.95	2.89

(*) Los valores medios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según el test HSD de Tukey (P=0.05)

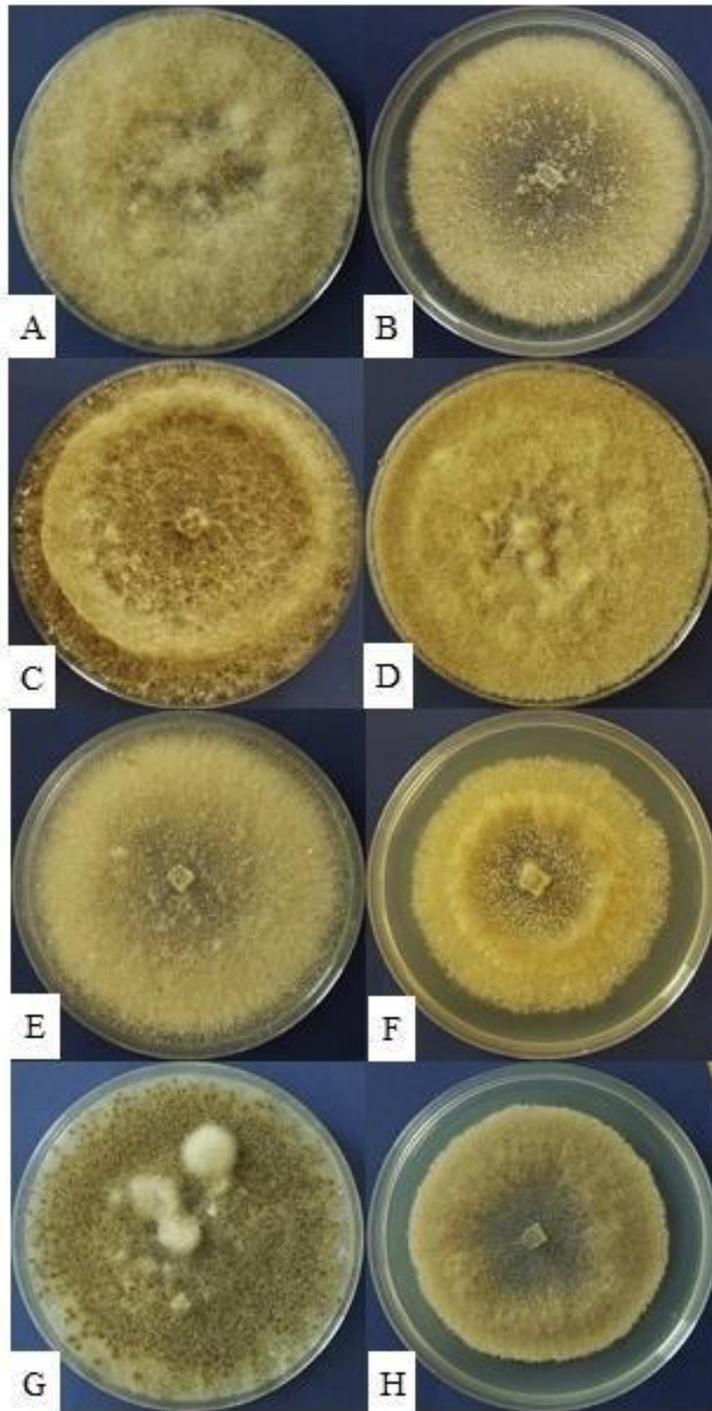


Figura 2: Aislamientos aislados de arándano. A-C. Aislamientos correspondientes a la zona de Trujillo. D-F. Aislamientos correspondientes a la zona de Lima. G. Aislamiento correspondiente a la zona de Ica. H. Aislamiento correspondiente a la zona de Ancash.

Chacón (2014) evaluó los hongos asociados al cultivo y determinó que es uno de los hongos más frecuentes en bayas de arándano bajo condiciones de almacenamiento.

b. Caracterización cultural

Esta caracterización se realizó basada en las clases morfológicas realizadas en este estudio, considerando los criterios de Martínez et al. (2003). Las colonias de los aislamientos se evaluaron en medio PDA a 20°C por 21 días a oscuridad, donde se evaluaron cuatro variables que componen la caracterización morfológica (Tabla 6).

Para la variable tipo morfológico

El crecimiento esclerotial fue más frecuente representando el 75% de todos los aislamientos, se presentó en todas las regiones de Trujillo, Lima, Ica e Ancash, mientras que el crecimiento micelial se presentó en un 25% en la zona de Trujillo.

Para la variable subtipo morfológico

MII (micelio suelto). Fue el menos frecuente representado solo el 12.5% de todos los aislamientos. MII se presentó en la zona de Trujillo en solo un aislamiento (89).

MIV (micelio grueso y lanudo). Fue el menos frecuente representado solo el 12.5% de todos los aislamientos. MIV se presentó en la zona de Trujillo en solo un aislamiento (109).

Para la variable distribución de esclerocios

S2 (esclerocios grandes formados en forma radial). Fue el menos frecuente de los tipos de distribución, solo se halló en un aislamiento que representa el 12.5% de los aislamientos. Se presentó en la zona de Ancash en el aislamiento (223).

S3 (esclerocios grandes y de formación irregular). Estuvo presente en el 50% de los aislamientos. S3 se presentó en las zonas de Lima e Ica en cuatro aislamientos (94B, 100A, 103A y 215).

S4 (esclerocios pequeños e irregulares). Fue el menos frecuente de los tipos de distribución, solo se halló en un aislamiento que representa el 12.5% de los aislamientos. Se presentó en la zona de Ancash en el aislamiento (106).

Para la variable nivel de esporulación

La esporulación E0 se presentó en el 50% en cuatro aislamientos de las zonas de Trujillo, Lima y Ancash, mientras que la esporulación E1 y E3 se presentaron en un 25% en dos aislamientos para cada nivel de esporulación.

Para la capacidad formadora de esclerotes

El más frecuente se presentó en un 37.5% en Cfe-3 en 3 aislamientos, seguido de 25% en Cfe-0 y Cfe2 y el menos frecuente fue de 12.5% en Cfe-1.

Tabla 6: Caracterización cultural de aislamientos provenientes de flores y frutos de arándanos aislados de Trujillo, Lima, Ica e Ancash.

Código	Región	Tipo morfológico	Subtipo morfológico	Nivel de esporulación (E)	Capacidad formadora de esclerotes (cfe)
89	Trujillo	Micelial	M2	E3	Cfe-0
106	Trujillo	Esclerotial	S4	E0	Cfe-3
109	Trujillo	Micelial	M4	E0	Cfe-0
94B	Lima	Esclerotial	S3	E3	Cfe-3
100A	Lima	Esclerotial	S3	E1	Cfe-1
103A	Lima	Esclerotial	S3	E0	Cfe-3
215	Ica	Esclerotial	S3	E1	Cfe-2
223	Ancash	Esclerotial	S2	E0	Cfe-2

4. 3. Análisis filogenético

4. 3. 1. Secuencia de ITS

Las secuencias de los productos de PCR del gen ITS fueron alineadas mediante el programa MAFFT (Kato y Standley, 2013), la filogenia se desarrolló mediante inferencia Bayesiana (BI) a través del programa Mr Bayes v.3.2.5 (Ronquist et al., 2012), tomándose el mejor modelo evolutivo para la región ITS, determinado por Mr Modeltest

v.2.3 (Nylander, 2004). El mejor modelo de sustitución fue dado por TIM2+I, modelo equivalente para bayesianos GTR+I. Para la generación del árbol filogenético, los análisis se detuvieron una vez que la desviación estándar promedio por debajo de 0.01. los árboles fueron repetidos 50000 generaciones. Las longitudes de los árboles fueron calculadas por parsimonia y análisis Bootstrap (BS) basadas en 50000 repeticiones con soportes de BS $\geq 50\%$ se consideran como significativos por consiguiente se empleó el programa Fig Tree V.1.4.4 para la visualización del árbol (Figura 3).

La región ITS agrupó a los aislamientos 89, 106, 109, 100A, 103A, 94B, 215, 223 dentro del género *Botrytis*, al comparar con 24 secuencias tomadas del GenBank (Figura 3) correspondientes a especies similares a *Botrytis* sp., como *Botrytis cinerea*, *B. fabae*, *B. pseudocinerea*, *B. siniviticola* y *B. caroliniana*, debido a que estas especies se encuentran en berries y frutos de exportación (Leroch et al., 2013b; Q. Liu et al., 2016; Saito, Margosan, et al., 2016; Staats et al., 2005; Zhou et al., 2014) y a la especie de *Sclerotinia sclerotiorum*, el cual fue seleccionado como un grupo externo del árbol (Anexo 1).

Como lo reportan Hoist-Jensen et al., (1998) el análisis de ITS se limita a demostrar que el género es monofilético, por ello no se logra resolver las relaciones entre especies debido a que los caracteres de las secuencias filogenéticas son limitadas. Por ello una vez determinado el género del hongo, se realizó el análisis con las secuencias parciales de los genes nucleares *G3PDH*, *HSP60* y *RPB2*.

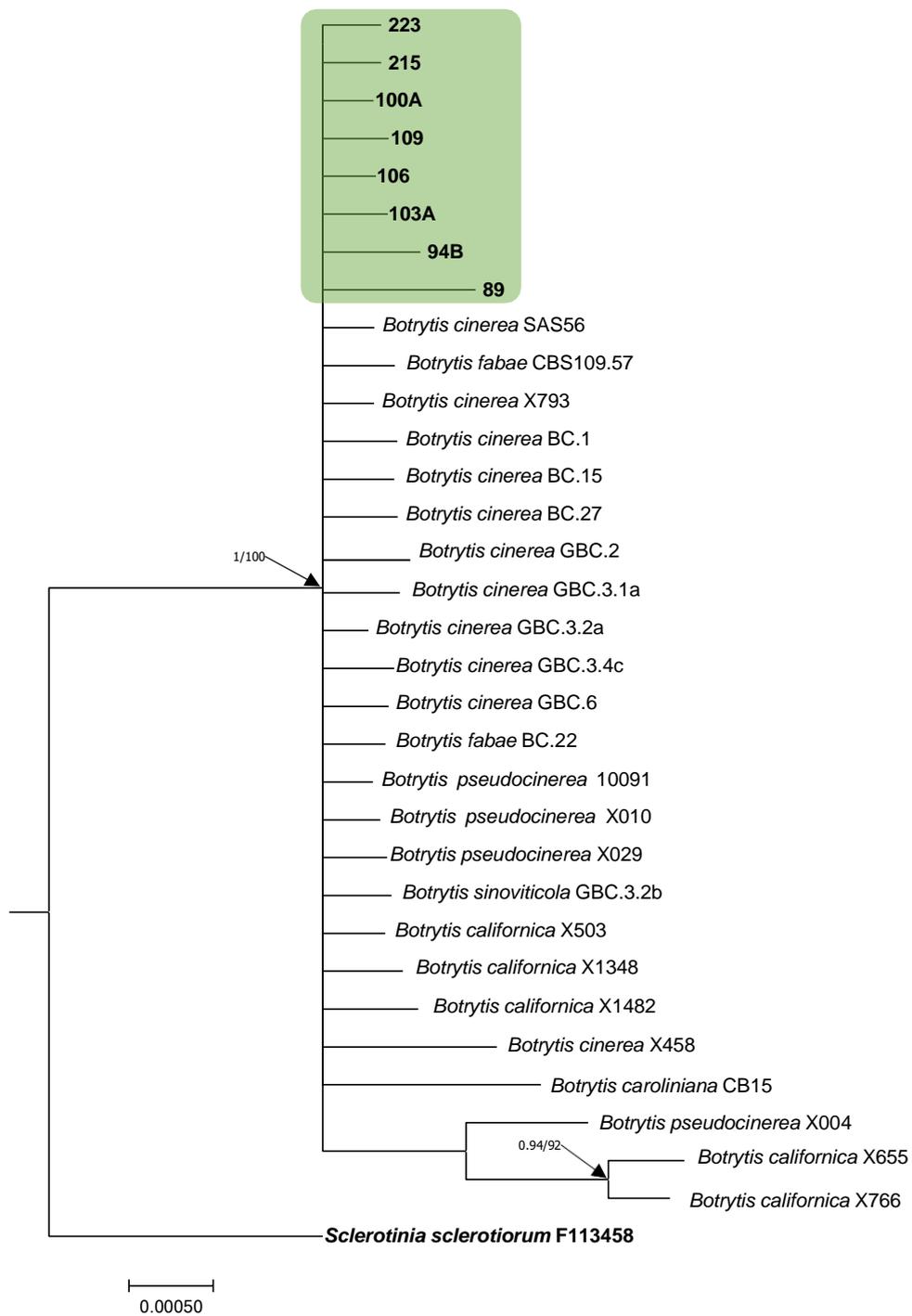


Figura 3: Árbol filogenético basado en espaciador transcrito interno para el complejo *Botrytis cinerea*. Los valores de probabilidad posterior (PP) y el soporte Bootstrap (BS) son mostrados en los nodos (PP/BS).

4.3.2. Genes nucleares

Los productos de amplificación de los fragmentos parciales de la *G3PDH*, *HSP60* y *RPB2* se muestran en la Figura 4, 5 y 6, donde se puede observar una única banda en cada carril, correspondiente a las muestras evaluadas, en los controles no se evidenció la presencia de bandas de DNA o amplificados por contaminación de los reactivos. Todos los productos de PCR se ubicaron cercanos a la banda de 1kb del marcador.

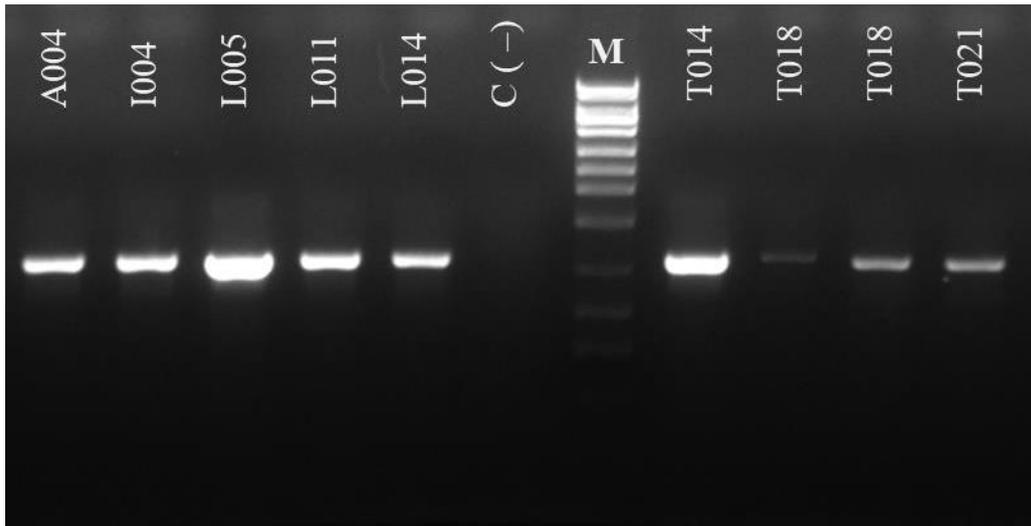


Figura 4: Productos de PCR usando los primers HSP60for/HSP60rev

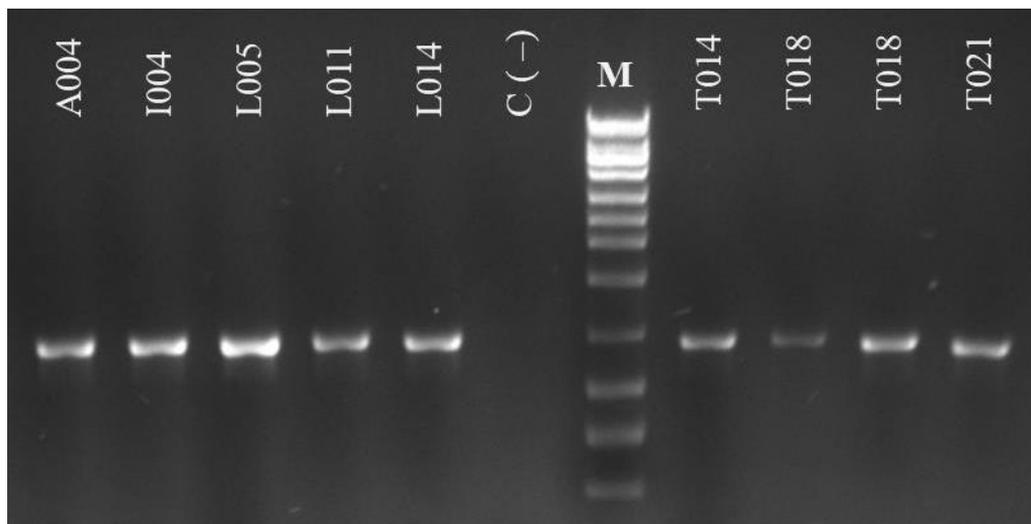


Figura 5: Productos de PCR usando los primers G3PDHfor/G3PDHrev

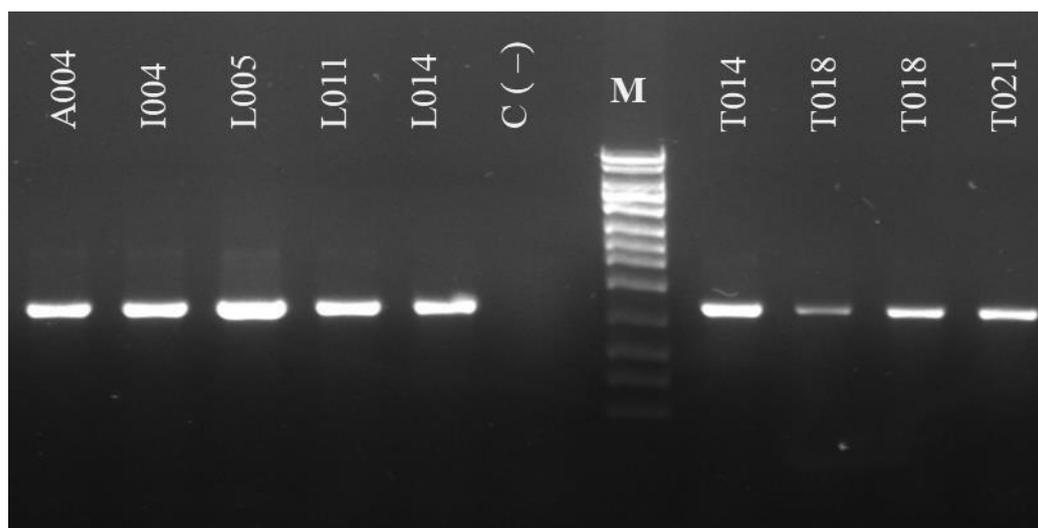


Figura 6: Productos de PCR usando los primers RPB2for/RPB2rev

El tamaño de las secuencias parciales obtenidas para los genes *G3PDH*, *HSP60* y *RPB2*, la composición de bases nitrogenadas, los sitios conservados y sitios variables se muestra en la tabla 8.

Tabla 7: Características de las secuencias parciales obtenidas para los genes (*G3PDH*, *HSP60* y *RPB2*)

Gen	Producto	% Promedio de bases				Sitios conservados	Sitios variables
		T(U)	C	A	G		
<i>g3pdh</i>	886	24,6	27,3	24,6	23,5	886/886	0/886
<i>hsp60</i>	976	25,5	23,3	27,9	23,4	976/976	0/976
<i>rpb2</i>	1087	26,6	20,7	28,8	23,9	1087/1087	0/1087

Las secuencias parciales de los genes *G3PDH* (886 pb), *HSP60* (976 pb) y *RPB2* (1087 pb) (Anexo 3) analizadas por Blast NCBI reportan un alto porcentaje de identidad de todos los aislados obtenidos con cepas y aislados de *Botrytis cinerea*. Por tal motivo en función a dichos resultados, el análisis filogenético se llevó a cabo con cepas pertenecientes a especies del género *Botrytis*.

Posteriormente y siguiendo la metodología se realizó el ensamblaje y alineamiento de cada una de las amplificaciones de DNA (Anexo 5). Asimismo, se muestra el concatenado de los genes *G3PDH*, *HSP60* y *RPB2* agrupándolo en 3134 caracteres (Anexo 5).

Para ratificar este resultado, se observó que tanto los análisis filogenéticos por cada gen (Figura 7, 8 y 9) como el concatenado (*G3PDH*, *HSP60* y *RPB2*) (Fig. 10) agrupa a todos los aislamientos en un solo clado y solo con las cepas que corresponden a *B. cinerea*. Los modelos de sustitución nucleotídicas y el equivalente para bayesianos se detallan en la tabla 8.

Tabla 8: Modelos obtenidos para los genes *G3PDH*, *HSP60* y *RPB2*

Árbol filogenético generado	Modelo de sustitución nucleotídicas	Modelo equivalente para bayesianos
<i>g3pdh</i>	TrNef+G	GTR+G
<i>hsp60</i>	TIM2+I	GTR+I
<i>rpb2</i>	GTR+G	GTR+G

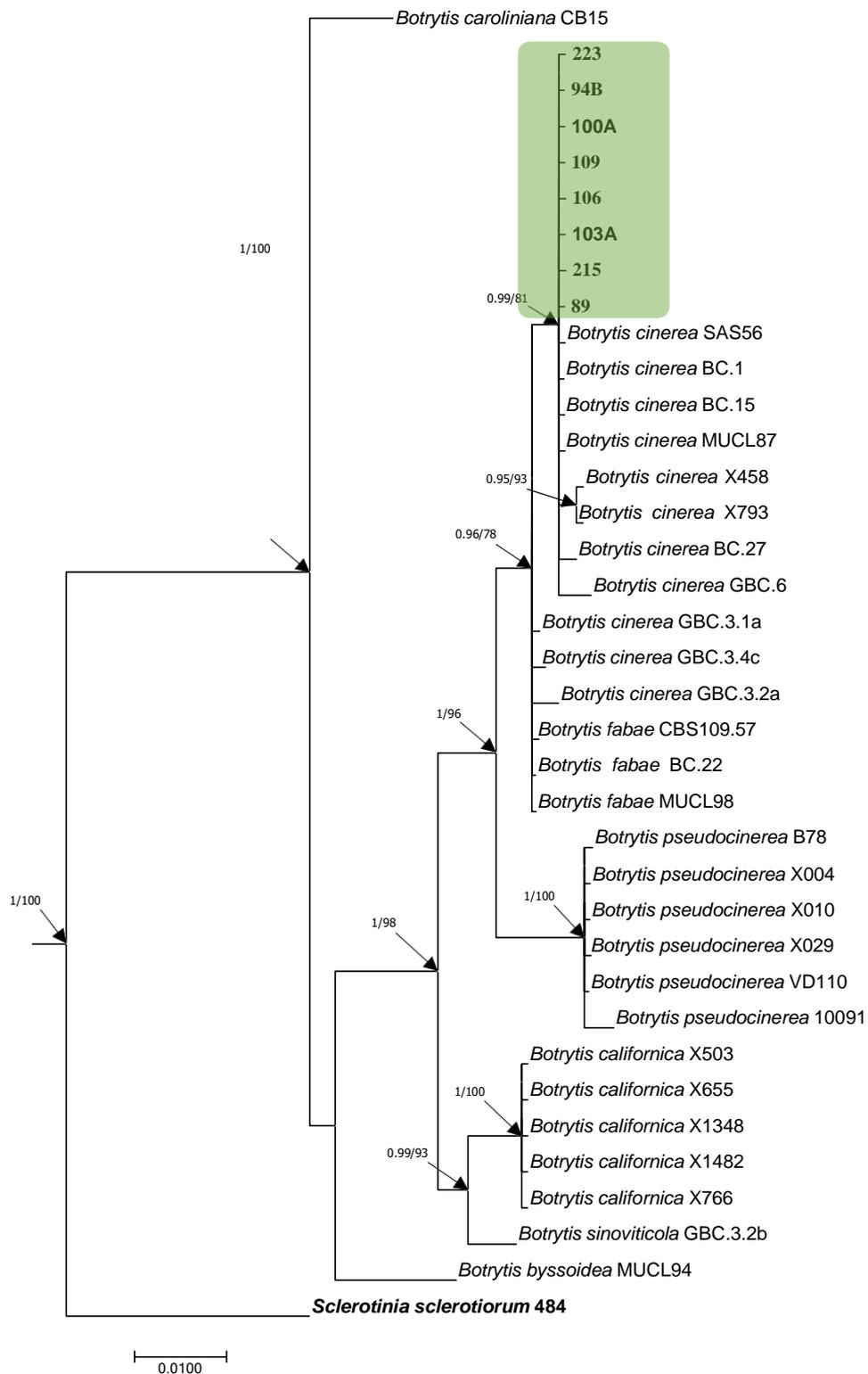


Figura 7: Árbol filogenético inferido por el modelo Bayesiano GTR+G, con el conjunto de datos que contiene las secuencias de DNA parciales del gen G3PDH.

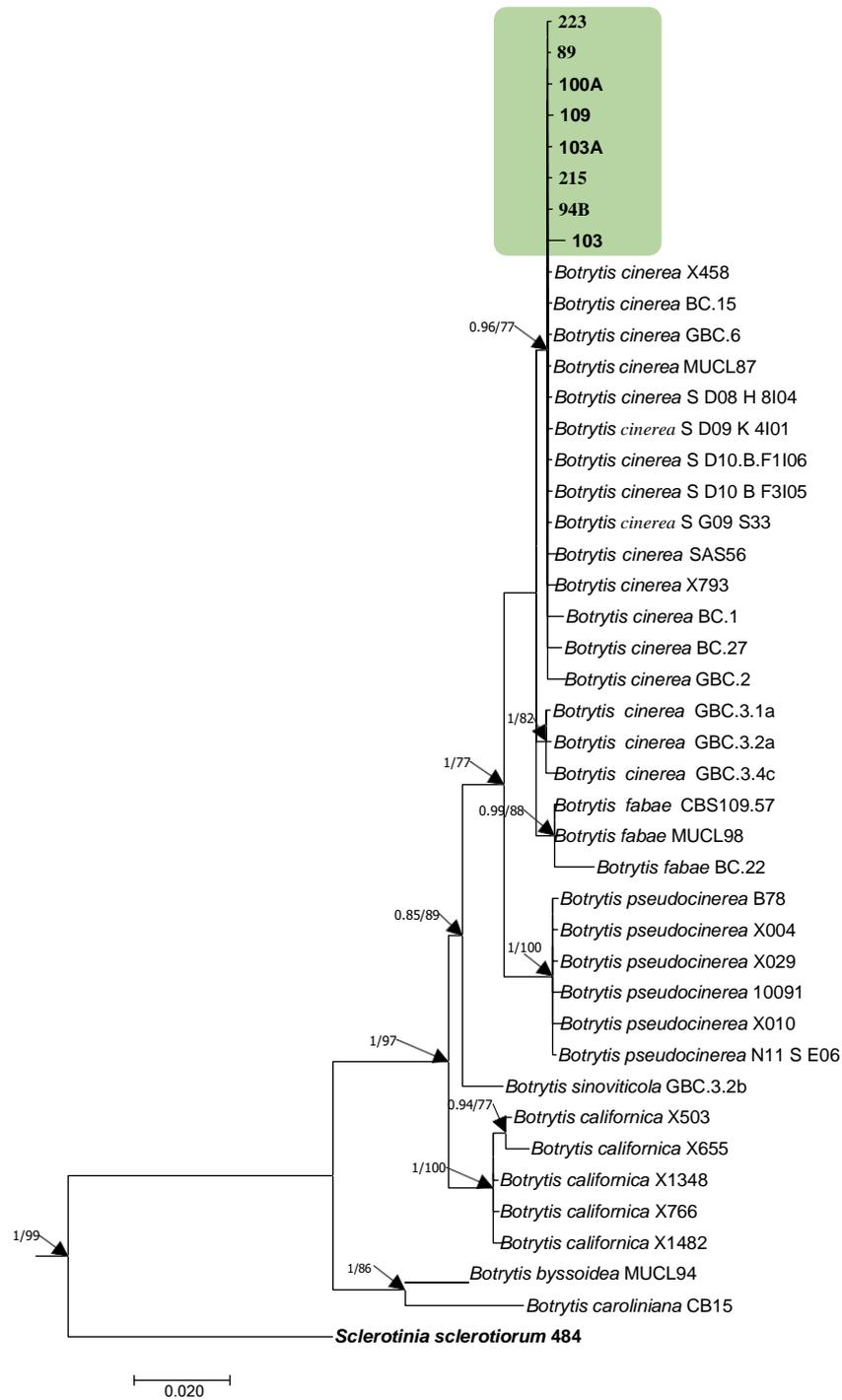


Figura 8: Árbol filogenético inferido por el modelo Bayesiano GTR+G, con el conjunto de datos que contiene las secuencias de DNA parciales del gen HSP60.

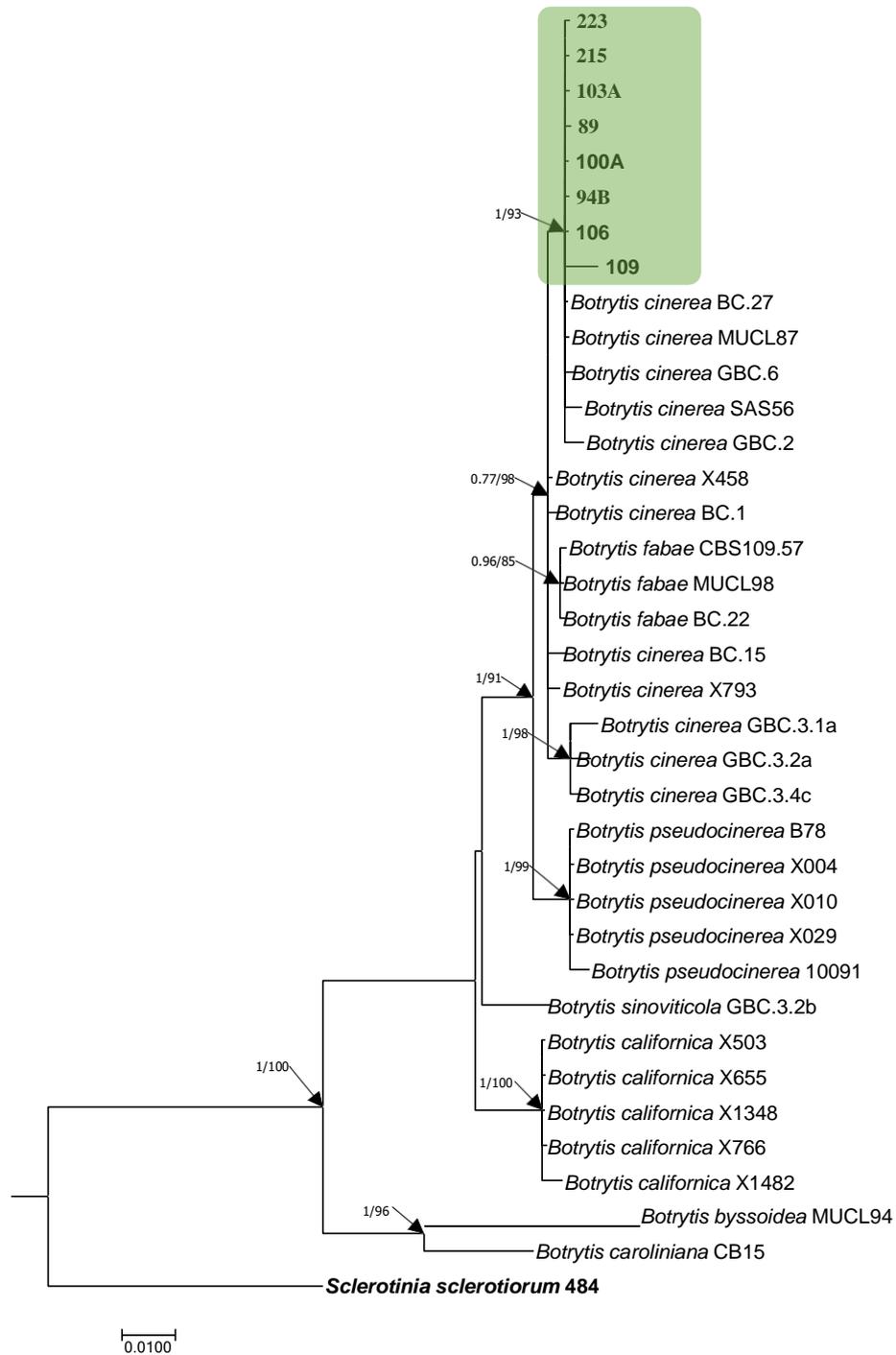


Figura 9: Árbol filogenético inferido por el modelo Bayesiano GTR+G, con el conjunto de datos que contiene las secuencias de DNA parciales del gen RPB2.

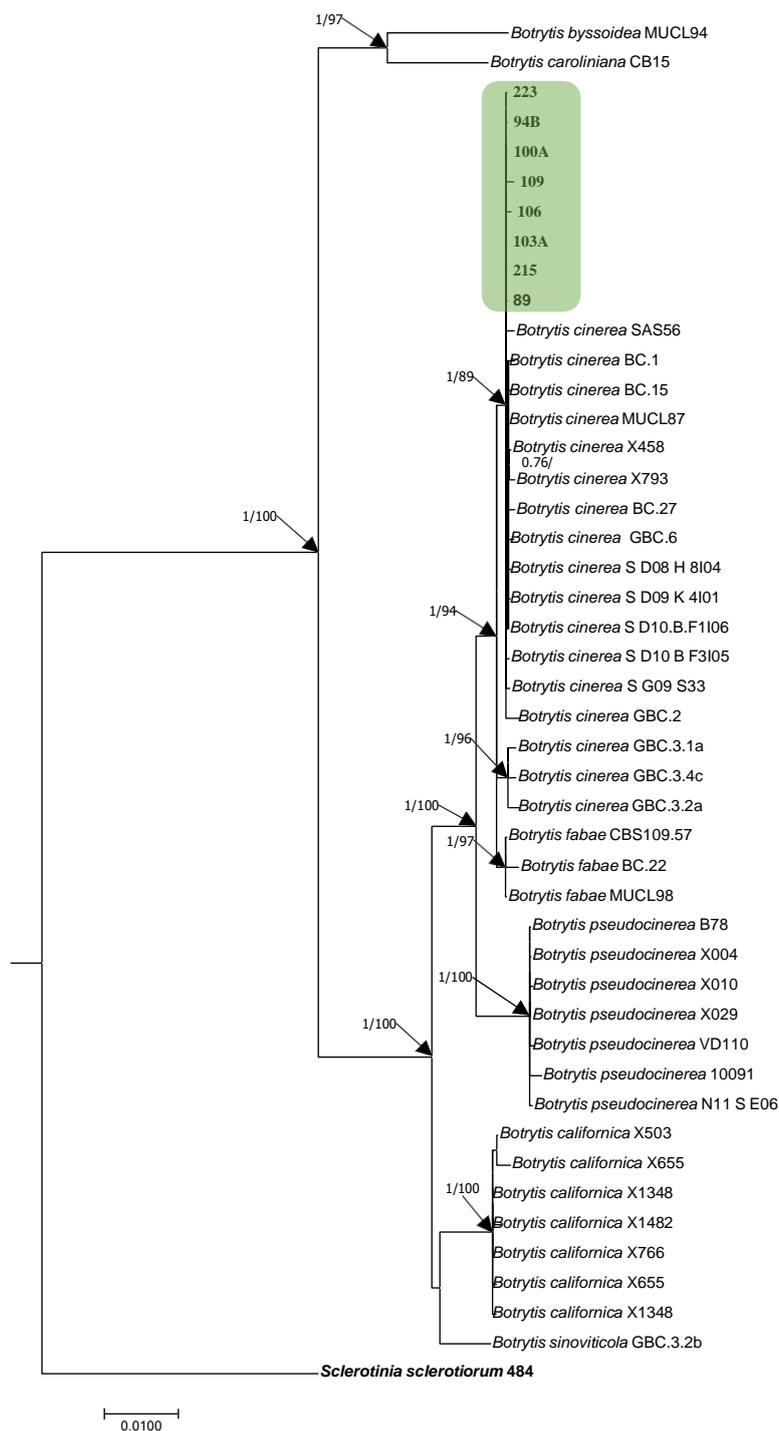


Figura 10: Árbol filogenético inferido por el modelo Bayesiano GTR+G, con el conjunto de datos que contiene las secuencias parciales del DNA concatenadas de los genes G3PDH +HSP60+RPB2.

Se llevó a cabo un análisis filogenético para los genes nucleares *G3PDH*, *HSP60* y *RPB2*, así como las secuencias combinadas, en aislados de *Botrytis* sp. Los resultados mostraron que los aislados se agruparon en el mismo cluster que *Botrytis cinerea*, con una alta consistencia de hasta el 93%. La combinación de estos genes permitió identificar y separar las especies de *Botrytis* (Li et al., 2012; Liu et al., 2016; Staats et al., 2005; Rupp et al., 2017).

Los genes nucleares *G3PDH*, *HSP60* y *RPB2* han permitido la identificación de nuevas especies de *Botrytis* (Zhang et al., 2010), por ello se determinó que empleando los genes nucleares *G3PDH*, *HSP60* y *RPB2* se identificó y se agrupó en clusters de *Botrytis cinerea* siendo el empleo de estos genes nucleares contundentes para la identificación molecular contundente (Rupp et al., 2017; Staats et al., 2005, 2007).

4. 4. Efecto de medios de cultivo

4. 4. 1. Efecto de sales

Incluir diferentes dosificaciones de acetato de sodio al ensayo con medio YBA, influye en el crecimiento de *Botrytis* spp. (Tabla 9). Se evaluó dos aislamientos, donde el tratamiento con mayor concentración de sales TS1 permitió un menor crecimiento de diámetro en los aislamientos seguido del TS5, TS2 y del TS3 mientras que al no tener una presencia de sales como en el tratamiento TS4 el crecimiento es mucho mayor en el medio YBA (Figura 11).

Tabla 9: Diámetro promedio del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* (mm) de todos los tratamientos en las cinco evaluaciones, DDI: Días después de inoculación.

Tratamiento	Aislamiento	1 DDI	2 DDI	3 DDI	4 DDI	5 DDI
TS1	57	0.0	1.1	3.3	8.9	16.2
TS2	57	2.2	7.0	14.0	22.5	30.5
TS3	57	2.2	7.4	17.1	30.6	40.3
TS4	57	2.3	8.8	23.4	39.5	54.7
TS5	57	1.3	4.2	7.0	9.7	11.3
TS1	89	1.7	4.5	9.2	12.9	16.4
TS2	89	2.0	6.9	13.6	19.4	24.8
TS3	89	3.1	7.2	15.2	24.8	31.3
TS4	89	3.3	9.2	18.2	29.5	44.4
TS5	89	0.0	3.4	7.0	9.7	11.5

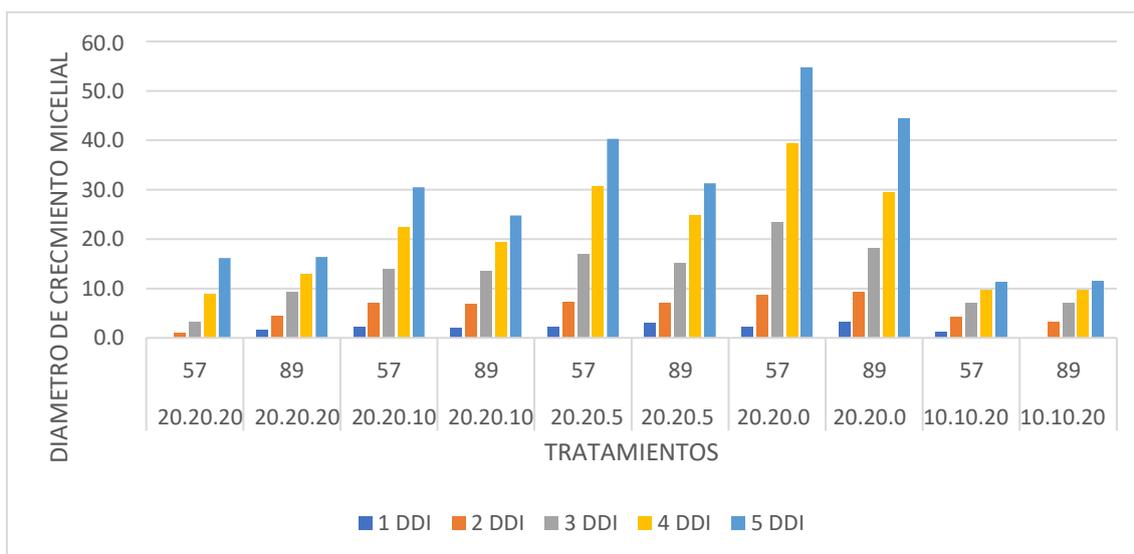


Figura 11: Comportamiento temporal del diámetro de crecimiento micelial (mm), durante los cinco días después de la inoculación de micelio de *Botrytis cinerea* para las diferentes concentraciones de sodio.

Las dosis empleadas para el uso del medio YBA se describieron por diferentes autores (Miyamoto et al., 2010; Stammler et al., 2007; Stammler y Speakman, 2006) en una doble concentración (20 g extracto de levadura, 20 g de bacto peptona, 40 g de acetato de sodio en 1 L de agua destilada esterilizada), pero Hu et al. (2011) emplea diferentes dosis de acetato de sodio. En este estudio, las diferentes dosis de acetato de sodio, influyeron en el crecimiento de *Botrytis cinerea* siendo significativa solo en el tratamiento TS5 (10 g extracto de levadura, 10 g de bacto peptona, 20 g de acetato de sodio en 1 L de agua destilada esterilizada) (Matsuzaki et al., 2021; Sun et al., 2020), especialmente para la detección de aislamientos de resistencia a una concentración discriminatoria.

4. 5. Comparación de medios de cultivo por cada fungicida

a. Fenhexamid

La respuesta de sensibilidad (R o S) de *B. cinerea* frente al i.a. a una dosis discriminatoria, no mostró diferencias significativas al evaluado de manera cualitativa según Cosseboom et al. (2019) al emplear medios envenenado preparados con medio MEA (método cosseboom) y medio preparado con PDA (método convencional), teniendo como resultado, 5 aislamientos (94B, 100A, 103A, 94B, 109 y 106) resistentes (R) y 3 aislamientos (215, 89 y 223) fueron sensibles (S), sin embargo, los valores observados del crecimiento del diámetro de los ocho aislamientos para cada día, permiten apreciar que existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos y aislamientos para la evaluación en cada uno de los medios envenenados (MEA y PDA) con el fungicida

fenhexamid, según la prueba de significancia de Tukey al 5% se establecieron rangos de significancia en las dos lecturas, para el medio PDA y MEA (Tabla 10).

Dentro de los rangos de lectura evaluados para el día 4, se encontraron que los aislamientos 5 aislamientos (215, 109, 106, 89 y 223) no se tiene diferencias significativas, quiere decir que puede crecer tanto en medio envenenado preparado con MEA como en medio envenenado preparado con PDA, pero en 3 aislamientos (94B, 103A y 100A) existen diferencias significativas al evaluar en cada uno de los medios envenenados para el 4to día de evaluación.

Tabla 10: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de *Botrytis cinerea* en medio envenenado con Fenhexamid.

Aislamiento	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5											
	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA										
94B	3.2 bcd	S	16.4 f	S	15.6 c	S	31.6 f	R	29.2 c	R	52e f	R	42.2 c	R	73.8 fg	R	56.4 c	R	96 e	R
215	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
103A	2ab	S	3bc	S	22.8 d	R	22.8 d	R	38.4 d	R	44.4 de	R	53 cd	R	69.8 efg	R	67.4 cd	R	90 de	R
100A	4.8 cde	S	3.6 bcd	S	24 d	R	30 ef	R	46d e	R	58.8 f	R	61.2 def	R	81.4 g	R	76 cde	R	90 de	R
109	6.6 e	S	6 de	S	26.6 def	R	25.2 de	R	44.4 de	R	40.2 d	R	64.2 def	R	56 de	R	81.6 de	R	76.2 cde	R
106	3.4 bcd	S	4.2 bcde	S	11.4 bc	S	8.8 b	S	19.2 b	S	14 b	S	24.8 b	R	21.4 b	R	24.8 b	R	30 b	R
89	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
223	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
Cv (%)	2.825216		3.365807		3.859155		4.910066		6.845877											

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor con 95% de confianza ($\alpha=0.05$)

Cv: coeficiente de varianza

*S: Sensibilidad

*R: Resistencia

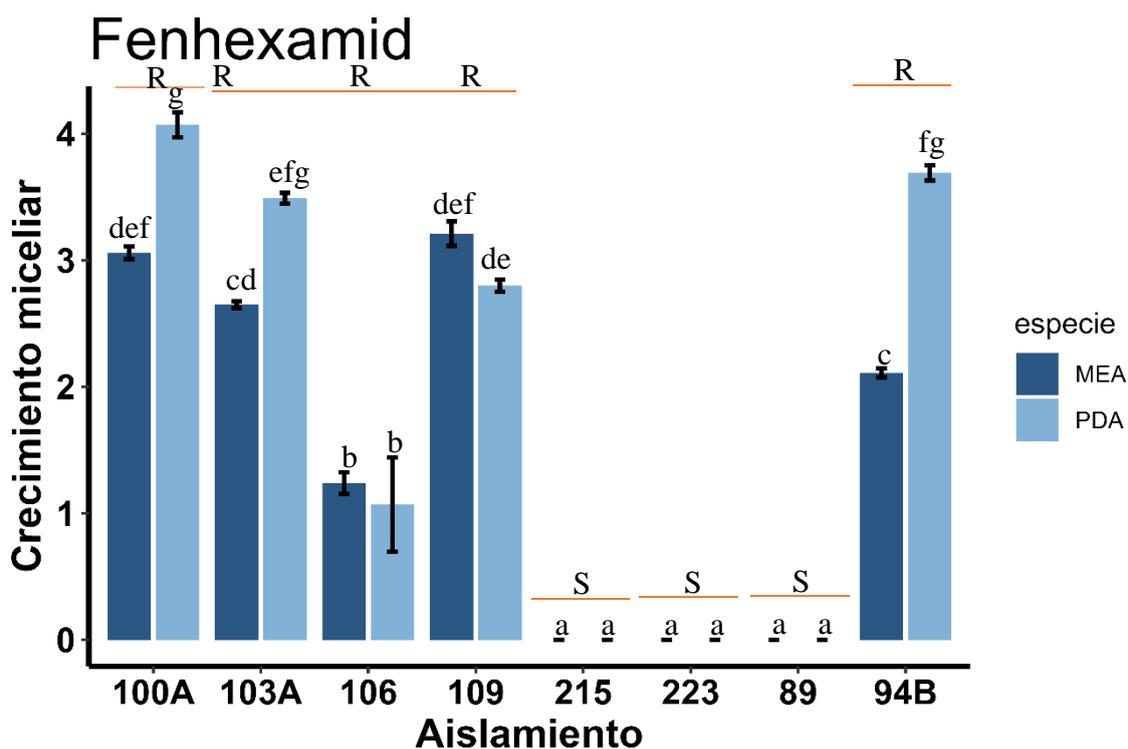


Figura 12: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Fenhexamid para los ocho aislamientos empleados al cuarto día

Al evaluar la sensibilidad en ambos medios envenenados, no se evidenció una respuesta diferencial de sensibilidad a nivel cualitativo (R o S). Sin embargo, en la actualidad se viene empleando el medio envenenado preparado con MEA para la evaluación de la sensibilidad (Alzohairy et al., 2021; Cosseboom et al., 2019; Saito et al., 2019) siendo empleado por primera vez por Weber (2011) para las evaluaciones de sensibilidad bajo el i.a. fenhexamid y dejando al medio PDA para las evaluaciones basadas en la sensibilidad de referencia, es decir, cuando no se tiene una base conocida de concentraciones empleadas bajo el i.a., se define un perfil de sensibilidad de individuos o poblaciones de un patógeno no expuesto previamente (Amiri y Peres, 2014; Saito et al., 2010) otros casos puntuales en el que se puede emplear el medio PDA, son para el almacenamiento y repique (Saito y Xiao, 2018; Testempasis et al., 2020). Esta resistencia se manifiesta por mutación del gen *erg27* que es codificado por la enzima 3-cetoreductasa pero no está asociado en función del medio PDA, sino a características fisiológicas como el crecimiento del micelio, la germinación de conidios y la germinación de esclerocios (Avenot et al., 2020).

Si bien no se tuvo diferencias de manera cualitativa en la sensibilidad, se evidenció diferencias al evaluarlo a nivel de crecimiento micelial, donde se encontró 3 aislamientos que mostraron diferencias significativas (100A, 103A y 94B) y 5 no significativos (106, 109, 215, 223 y 89) al evaluarlo en estos dos medios envenenados para el día 4 (tomando como día referencial según la literatura de Cosseboom (2019)), se muestra que la interacción lineal es significativa, por ello el efecto de un factor sobre la variable respuesta variará en función del nivel del otro factor, el hecho de que exista significancia entre medio de cultivo y aislamiento, demuestra que el efecto de los medios depende de los aislamientos (Dalgaard, 2008; Dean et al., 2017) que quiere decir que en base a la característica fisiológica del hongo influirá en su crecimiento dependiendo del medio de cultivo, por ello al evaluarlo en medio PDA o medio MEA se va a generar una uniformidad en base a la sensibilidad (Avenot et al., 2020).

b. Fludioxonil

La respuesta de sensibilidad (R o S) de *B. cinerea* frente al i.a. a una dosis discriminatoria, no mostró diferencias significativas al evaluado de manera cualitativa según Cosseboom et al. (2019) al emplear medios envenenado preparados con medio MEA (método cosseboom) y medio preparado con PDA (método convencional), teniendo como resultado los 8 aislamientos fueron sensibles (S), sin embargo, los valores observados del crecimiento del diámetro de los ocho aislamientos para cada día, permiten apreciar que existieron diferencias estadísticas significativas para el aislamiento 100A para la evaluación en cada uno de los medio envenenado (MEA y PDA) con el fungicida fludioxonil, según la prueba de significancia de Tukey al 5% se establecieron rangos de significancia en las dos lecturas, para el medio PDA y MEA (Tabla 11).

Dentro de los rangos de lectura evaluados para el día 4, se encontraron que para 7 aislamientos (94B, 215, 103A, 109, 106, 89 y 223) no se tiene diferencias significativas, quiere decir que puede crecer tanto en medio envenenado preparado con MEA como en medio envenenado preparado con PDA, pero en 2 aislamiento (100A) existen diferencias significativas al evaluar en cada uno de los medios envenenados para el 4to día de evaluación (Figura 13).

Tabla 11: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de *Botrytis cinerea* en medio envenenado con Fludioxonil.

Aislamiento	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5	
	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA
94B	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	2.6	S
									ab	11.4
215	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
103A	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
100A	1.8	S	0a	S	5.6	S	2.9	S	9.4	S
	8b				6c		2b		6c	
109	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
106	0.4	S	0.4	S	3b	S	2.4	S	5.2	S
	4a		4a		4b		2b		6b	
89	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
223	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
CV (%)	0.6935312		1.495668		2.695915		1.285247		6.680408	

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor con 95% de confianza ($\alpha=0.05$)

Cv: coeficiente de varianza

*S: Sensibilidad

*R: Resistencia

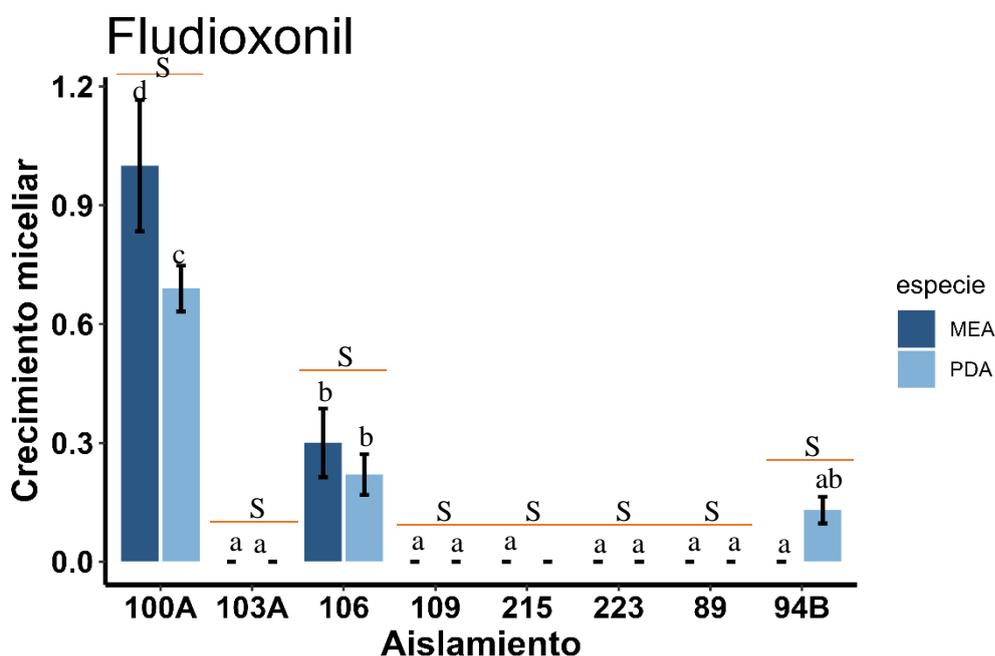


Figura 13: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Fludioxonil para los ocho aislamientos empleados al cuarto día.

Dentro de los medios estudiados no se observó diferencias alguna, estos resultados coinciden con lo obtenido por Dowling et al. (2021) donde refiere que fludioxonil inhibe la germinación de esporas y crecimiento micelial de *B. cinerea*, debido a que actúa a nivel

del Bos1- y la MAPK-vía que son unas vías dependiente de la osmoregulación que provoca la hiperosmolaridad seguido de la acumulación del glicerol (Sang et al., 2018; Shao et al., 2021). Liu et al. (2017) establece la sensibilidad de fludioxonil con un EC50 de 0.1 ppm y Sang et al. (2018) a 1, 5, 10 ppm estos valores estudiados superan en 0.02 veces al primero y 2, 10 y 20 respectivamente. Por otro lado, Cosseboom et al. (2019) establece una línea base de referencia a una concentración de 0.5ppm en donde discrimina aislamientos susceptibles y resistentes. Sin embargo, Dowling et al. (2021) reportó resistencia en aislamiento de *Botrytis cinerea* en flores de calibrachoa a concentración de 100 ppm , pese a que, esta concentración supera en 200 veces a lo utilizado por Cosseboom et al. (2019). Esto se puede deber a que los aislamientos de dowling provienen de flores de calibrachoa y las de cosseboom de fresa, la primera se trata de una especie ornamental en donde la aplicación química no es tan controlada y/o más exigente en comparación a los procesos de producción de fresa, en donde, se toma mucho en consideración los LMR y el tipo de molécula para aplicar. Adicional a esto Aldana (2021) menciona que la aplicación de agroquímicos en el cultivo de fresa se debe minimizar y optar estrategias mediante labores culturales, lo cual, se observaría una menor resistencia de los aislamientos.

El hecho de que exista significancia entre medio de cultivo y aislamiento (tabla 12), demuestra que el efecto de los medios depende de los aislamientos (Dalgaard, 2008; Dean et al., 2017) que quiere decir que en base a la característica fisiológica va a influir en el crecimiento del medio de cultivo, por ello, al evaluarlo en medio PDA o medio MEA se va a generar una uniformidad en base a la sensibilidad (Avenot et al., 2020b).

c. Iprodione

La respuesta de sensibilidad (R o S) de *B. cinerea* frente al i.a. a una dosis discriminatoria, no mostró diferencias significativas al evaluado de manera cualitativa según Cosseboom et al. (2019) al emplear medios envenenado preparados con medio MEA (método cosseboom) y medio preparado con PDA (método convencional) excepto por el aislamiento 223 se mostró que en medio MEA resulto (S) mientras que en medio PDA (R), sin embargo, los valores observados del crecimiento del diámetro de los ocho aislamientos para cada día, permiten apreciar que existieron diferencias estadísticas significativas para los aislamientos 106 y 223 para la evaluación en cada uno de los medio envenenado (MEA y PDA) con el fungicida iprodione, según la prueba de significancia

de Tukey al 5% se establecieron rangos de significancia en las dos lecturas, para el medio PDA y MEA (Tabla 12).

Dentro de los rangos de lectura evaluados para el día 4, se encontraron que para 6 aislamientos (94B, 215, 103A, 100A, 109 y 89) no se tiene diferencias significativas, quiere decir que puede crecer tanto en medio envenenado preparado con MEA como en medio envenenado preparado con PDA, pero en 2 aislamiento (106 y 223) existen diferencias significativas al evaluar en cada uno de los medios envenenados para el 4to día de evaluación (Figura 14).

Tabla 12: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de *Botrytis cinerea* en medio envenenado con iprodione

Aislamiento	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5											
	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA										
94B	1.8 ab	S	5c	S	15.8 f	S	16.2 f	S	28.4 def	R	29.2 ef	R	37.4 bcd	R	37.8 bc	R	41.4 efg	R	45.8 fg	R
215	0a	S	0a	S	7.6c d	S	4.4b c	S	16.6 bc	S	13.6 b	S	23.8 bcd	R	21.2 bc	R	31.2 cde	R	27.8 cd	R
103A	0a	S	0a	S	0.8a b	S	0a	S	3.2a	S	0a	S	6.6a	S	3a	S	9.2b	S	6.6a b	S
100A	8.2 d	S	5.2 c	S	31.2 h	R	24.6 g	R	50g	R	44.4 g	R	68g	R	62.4 g	R	84h	R	74.8 h	R
109	3 bc	S	3.2 bc	S	16.2 f	S	12.2 def	S	23c def	R	25.4 def	R	31de	R	36.8 ef	R	40.4 efg	R	45.6 fg	R
106	5c	S	4.6 c	S	13.6 ef	S	17f	S	21.4 cd	R	30.4 f	R	29.4 cde	R	43f	R	34.8 def	R	53.2 g	R
89	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
223	0a	S	1.8 ab	S	3.8a bc	S	10.2 de	S	12.2 b	S	22.4 cde	R	17.8 b	S	31d e	R	21c	R	36.6 def	R
CV (%)	2.229397		3.671053		3.866363		4.580812		5.131875											

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor con 95% de confianza ($\alpha=0.05$)

Cv: coeficiente de varianza

*S: Sensibilidad

*R: Resistencia

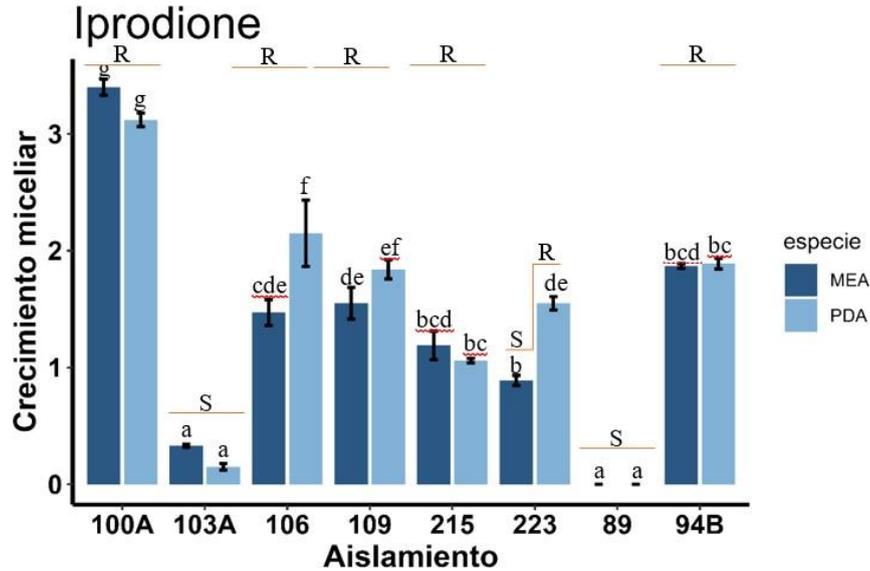


Figura 14: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Iprodione para los ocho aislamientos empleados al cuarto día

En la evaluación de ambos medios para iprodione, no se evidencia una respuesta diferencial en función a la sensibilidad (R o S). Se tiene reportes que Dowling et al., (2021) empleando los dos medios de cultivos no ha encontrado diferencias significativas, ya que, al igual que fludioxonil, iprodione tiene una inhibición del crecimiento micelial y germinación de esporas de *B. cinerea*, puesto que. Dowling et al., (2021) emplea 100ppm de iprodione en ambos medios, que es una concentración 10 veces mayor que la empleada por Cosseboom et al., (2019) donde en ambos se reporta presencia de aislamientos resistentes, esto quiere decir que, empleando la dosificación de Cosseboom et al., (2019) puedo discriminar con con bajas cantidades del IA, ya que, esta resistencia está asociado a las mutaciones en el gen de la histidina cinasa Bos-1, que está asociado a la acumulación del glicerol Weber & Hahn, (2019) debido a que, fungicidas dicarboximidas (DC) se han utilizado como control de *B. cinerea* desde los 70's y la resistencia ha emergido en diferentes cultivos (Avenot et al., 2018; Saito et al., 2019; Saito, Michailides, et al., 2016a; Saito & Xiao, 2018). Los reportes de sensibilidad y evaluaciones basadas en la sensibilidad de referencia se trabajan en medio PDA para iprodione según (Avenot et al., 2018; Baggio et al., 2018) pero según Weber & Hahn, (2011) se reporta una línea base de sensibilidad de referencia en base al crecimiento micelial y la germinación de conidios, donde a bajas concentración igual se reportó resistencia.

d. Metil tiofanato

La respuesta de sensibilidad (R o S) de *B. cinerea* frente al i.a. a una dosis discriminatoria, no mostró diferencias significativas al evaluado de manera cualitativa según Cosseboom et al. (2019) al emplear medios envenenado preparados con medio MEA (método cosseboom) y medio preparado con PDA (método convencional) excepto por el aislamiento 106 se mostró que en medio PDA resulto (S) mientras que en medio MEA (R), sin embargo, los valores observados del crecimiento del diámetro de los ocho aislamientos para cada día, permiten apreciar que existieron diferencias estadísticas significativas para los aislamientos 94B, 215, 103A, 100A, 106 y 89 para la evaluación en cada uno de los medio envenenado (MEA y PDA) con el fungicida tiofanato-methyl, según la prueba de significancia de Tukey al 5% se establecieron rangos de significancia en las dos lecturas, para el medio PDA y MEA (Tabla 13).

Dentro de los rangos de lectura evaluados para el día 4, se encontraron que para 6 aislamientos (94B, 103A, 100A, 109, 89 y 223) no se tiene diferencias significativas, quiere decir que puede crecer tanto en medio envenenado preparado con MEA como en medio envenenado preparado con PDA, pero en 2 aislamiento (2015 y 106) existen diferencias significativas al evaluar en cada uno de los medios envenenados para el 4to día de evaluación (Figura 15).

Tabla 13: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de *Botrytis cinerea* en medio envenenado con Methyl-Thiophanato.

Aislamiento	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5	
	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA
94B	16.8gh S	21.8ij R	56.6efgh R	65hi R	90d R	90d R	90d R	90d R	90c R	90c R
215	3.6a S	10.2cde S	33.4c R	54.2defg R	57.4c R	90d R	76.2c R	90d R	90c R	90c R
103A	7.8bcd S	16g S	50.4de R	61.4fghi R	82.2d R	90d R	90d R	90d R	90c R	90c R
100A	11.4def S	6.4abc S	53.2def R	47.6d R	83d R	85.4d R	90d R	90d R	90c R	90c R
109	17.4ghi S	13.8efg S	63.4hi R	62.2ghi R	90d R	90d R	90d R	90d R	90c R	90c R
106	6ab S	5.46ab S	18.2b S	12.4a S	22.6b S	12.6a S	23.4b R	12.8a S	23.4b R	12.8a S
89	14.6fg S	25.8j R	56.6efgh R	66.6i R	86.8d R	90d R	90d R	90d R	90c R	90c R
223	21.6ij R	20.8hi R	62.6ghi R	63.8hi R	90d R	90d R	90d R	90d R	90c R	90c R
CV (%)	2.864919		1.6158		1.809618		1.901149		1.822811	

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor con 95% de confianza ($\alpha=0.05$)

Cv: coeficiente de varianza

*S: Sensibilidad

*R: Resistencia

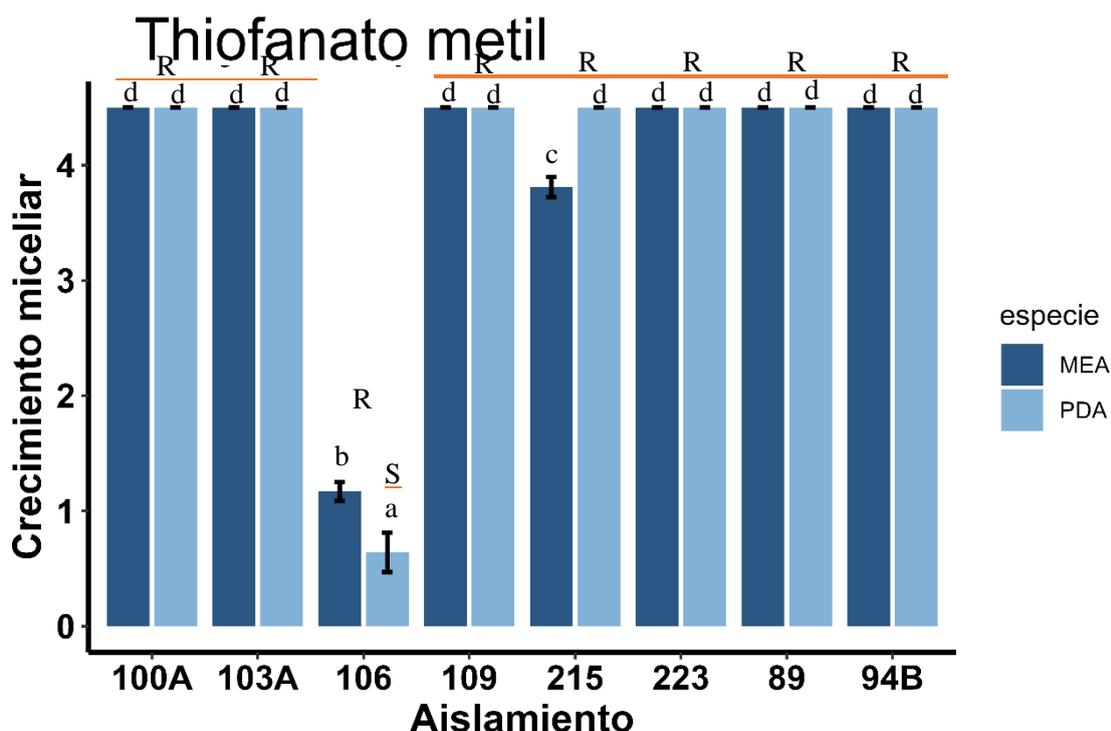


Figura 15: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Methyl-Thiofanato para los ocho aislamientos empleados al cuarto día

Metil-thiofanate es una molécula perteneciente a la familia de los Methyl Benzimidazol Carbamato (MBC) que su modo de acción es adherirse a la β -tubulina y bloquean el ensamblaje de los microtúbulos, esto perjudica la división celular y en consecuencia inhibe el tubo germinal y el crecimiento micelial (Weber y Hahn, 2011). Avenot et al. (2020) y Weber (2010) reportan que crecimientos de *B.cinerea* a dosis iguales o superiores a 100 ppm indican la resistencia del aislamiento a MT. Mientras que, Cosseboom et al., (2019) establece que con 100 ppm del ingrediente activo puede discriminar entre 89 y 72% de resistencia en campos convencionales y orgánicos.

Weber fundamenta la dosis empleada en base a lo realizado en el 2010, logrando solo reportar aislamientos resistentes en el país de Alemania en la campaña 2010 a comparación de Cosseboom et al., (2019) donde a 100 ppm puede diferenciar

aislamientos sensibles y resistentes en el país de Estados Unidos. Esta diferencia en la continuidad del trabajo de Weber y el trabajo de Cosseboom, se puede deber a la fuente de colecta, debido a que, el primero proviene de campos con sistema de producción convencional y el segundo proviene de sistema convencional y sistema orgánico, este último sistemas de producción se podría deber a que se ejerce una presión de selección en aislamientos orgánicos, siendo corroborado por Baggio et al., (2018) donde las dosis discriminatoria empleada para el sistema orgánicos se encuentra en el rango de 0.4-7.5 ppm ,por el contrario, del sistema convencional que se encuentra entre el rango de 3.6-688 ppm.

e. Pyraclostrobin

La respuesta de sensibilidad (R o S) de *B. cinerea* frente al i.a. a una dosis discriminatoria, no mostró diferencias significativas al evaluado de manera cualitativa según Cosseboom et al. (2019) al emplear medios envenenado preparados con medio MEA (método cosseboom) y medio preparado con PDA (método convencional) sin embargo, los valores observados del crecimiento del diámetro de los ocho aislamientos para cada día, permiten apreciar que existieron diferencias estadísticas significativas para los 8 aislamientos para la evaluación en cada uno de los medio envenenado (MEA y PDA) con el fungicida pyraclostrobin, según la prueba de significancia de Tukey al 5% se establecieron rangos de significancia en las dos lecturas, para el medio PDA y MEA (Tabla 14).

Dentro de los rangos de lectura evaluados para el día 4, se encontraron que para 4 aislamientos (215, 103A, 106 y 89) no se tiene diferencias significativas, quiere decir que puede crecer tanto en medio envenenado preparado con MEA como en medio envenenado preparado con PDA, pero en 4 aislamiento (94B, 100A, 109 y 89) existen diferencias significativas al evaluar en cada uno de los medios envenenados para el 4to día de evaluación (Figura 16).

Tabla 14: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de *Botrytis cinerea* en medio envenenado con Pyraclostrobin.

Aislamiento	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5											
	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA										
94B	8.4 efg	S	10.2g	S	35.2f	R	29.4de	R	56.2de	R	45bc	R	75.4cd	R	59.8b	R	90a	R	75.4b	R
215	0.8a	S	8defg	S	22.8c	R	30.2def	R	49.8cd	R	52.2cd	R	65.6cd	R	69.6de	R	90a	R	83a	R
103A	2.4ab	S	6.6cdef	S	26.6cd	R	32.2ef	R	52cde	R	55.2de	R	70.8def	R	72.6defg	R	90a	R	87.6a	R
100A	6.2cde	S	6.6cdef	S	33.8ef	R	30.2def	R	59e	R	50.4cd	R	81fg	R	69de	R	90a	R	86.2a	R
109	9.2fg	S	5.4cd	S	31.2def	R	22.6c	R	56.4de	R	40.8b	R	79.4efg	R	58.4bc	R	90a	R	74.6b	R
106	2.4ab	S	4.2bc	S	11a	S	17b	S	20.8a	R	26.4a	R	30.8a	R	32.4a	R	39.2a	R	33.8a	R
89	9.4g	S	13.6h	S	34ef	R	34.6ef	R	55.6de	R	53.8de	R	75.4defg	R	71.6defg	R	90a	R	90a	R
223	7.8defg	S	10.4g	S	32ef	R	32.2ef	R	59.8e	R	51cd	R	82.4g	R	66.2cd	R	90a	R	79.2b	R
CV (%)	2.198965		2.445323		2.466239		2.752625		3.275029											

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor con 95% de confianza ($\alpha=0.05$)

Cv: coeficiente de varianza

*S: Sensibilidad

*R: Resistencia

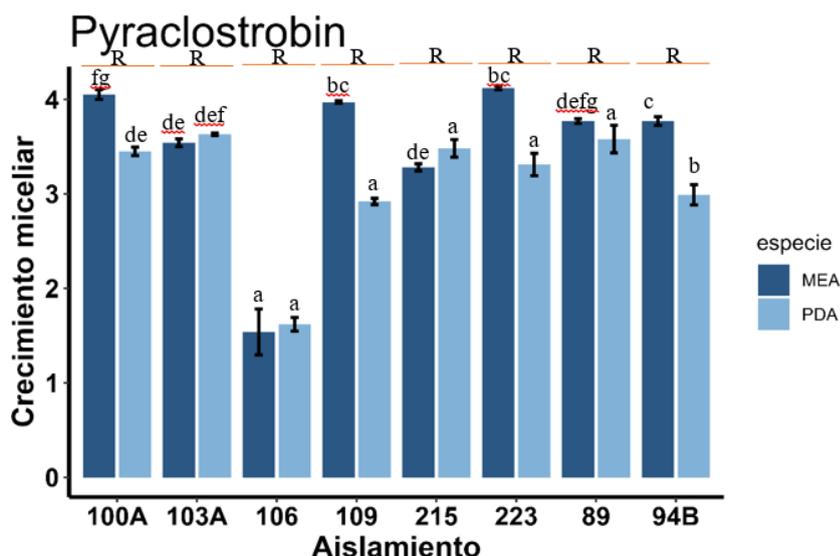


Figura 16: Comparación de medio PDA y MEA en medio envenenado con Pyraclostrobin para los ocho aislamientos empleados al cuarto día.

Pyraclostrobin está dentro de la clase de fungicidas que son inhibidores de la quinona externa (QoI), que inhibe la respiración mitocondrial en los hongos, siendo eficaz para inhibir la germinación de esporas, el crecimiento de micelio y la esporulación (Kim & Xiao, 2011). El primer reporte de sensibilidad de pyraclostrobin en *B. cinerea* lo describió Myresiotis et al. (2008) en medio PDA que lo trabajó con el SHAM. La oxidasa alternativa (AOX) proporciona una vía alternativa para la respiración que usualmente se activa después de que los QoIs inhiben la respiración mitocondrial en los hongos uniéndose al sitio Qo del complejo citocromo bc1 y bloqueando la transferencia de electrones, es por ello que el SHAM es un inhibidor del AOX que se añade usualmente a medios de cultivo, para suprimir esta respiración alternativa, pero no se tuvo una respuesta diferencial en el EC50 al momento de emplear el pyraclostrobin + 100 ppm de SHAM (Feng et al., 2020), por lo tanto es necesario detectar el efecto del SHAM en el crecimiento micelial de *B. cinerea* para después corroborar los fenotipos de resistencia de pyraclostrobin. Este efecto lo estudio (H. Liang et al., 2019; Mondal et al., 2005) justificando la adición de SHAM en medio artificial no es válida corroborando los estudios de Seyran et al., (2010) sobre la toxicidad in vitro de SHAM para *F. effusum* ya que no se demostró que se tenga un efecto de la peroxidasa a nivel in-vitro.

A nivel micelial se encontró diferencias significativas, teniendo una respuesta de correlación alta entre aislamiento y medio de cultivo, se corrobora que, el efecto de los medios depende de los aislamientos (Dalgaard, 2008), por ello, se reporta que se tiene

influencia de azúcares en el crecimiento de *B. cinerea* cuando se emplea el medio MEA (Stammler et al., 2007; Weber & Hahn, 2011).

f. Boscalid

La respuesta de sensibilidad (R o S) de *B. cinerea* frente al i.a. a una dosis discriminatoria, mostró diferencias significativas al evaluado de manera cualitativa según Cosseboom et al. (2019) al emplear medios envenenado preparados con medio YBA (método cosseboom) y medio preparado con PDA (método convencional) sin embargo, los valores observados del crecimiento del diámetro de los ocho aislamientos para cada día, permiten apreciar que existieron diferencias estadísticas significativas para los 8 aislamientos para la evaluación en cada uno de los medio envenenado (YBA y PDA) con el fungicida boscalid, según la prueba de significancia de Tukey al 5% se establecieron rangos de significancia en las dos lecturas, para el medio PDA y YBA (Tabla 15).

Dentro de los rangos de lectura evaluados para el día 4, se encontró que para los 8 aislamientos se tiene diferencias significativas al evaluar, quiere decir que no puede crecer tanto en medio envenenado preparado con PDA como en medio envenenado preparado con YBA (Figura 17).

Tabla 15: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de *Botrytis cinerea* en medio envenenado con Boscalid.

Aislami ento	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5	
	YBA	PDA	YBA	PDA	YBA	PDA	YBA	PDA	YBA	PDA
94B	8b S	18.8 d S	13.8c S	50g R	21.8d R	75.4h R	28e R	90h R	34.4e R	90g R
215	0a S	2.8a S	0a S	20.6d R	0a S	37.4f R	0a S	55g R	0a S	69.8f R
103A	0a S	8.4b S	0a S	36.2e R	0a S	66.8g R	3.2b S	90h R	6.8bc S	90g R
100A	1.8a S	11.4bc S	5.2b S	45f R	10.4c S	75.6h R	14.6d S	90h R	18.8d S	90g R
109	0a S	10b c S	0a S	43.8fg R	0a S	74.8h R	0a S	90h R	0a S	90g R
106	0a S	11.6bc S	0a S	23.8d R	0a S	31.4e R	1ab S	35f R	4.8b S	38e R
89	0a S	17.4d S	0a S	40e f R	5.4b S	64.4g R	8c S	86.4h R	9.8c S	90g R
223	0.8a S	14.6cd S	4.2ab S	46.4fg R	9c S	76h R	12.8d S	90h R	16.2d S	90g R
CV (%)	3.685214		3.415458		2.127776		1.942994		2.218276	

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor con 95% de confianza ($\alpha=0.05$)

Cv: coeficiente de varianza

*S: Sensibilidad

*R: Resistencia

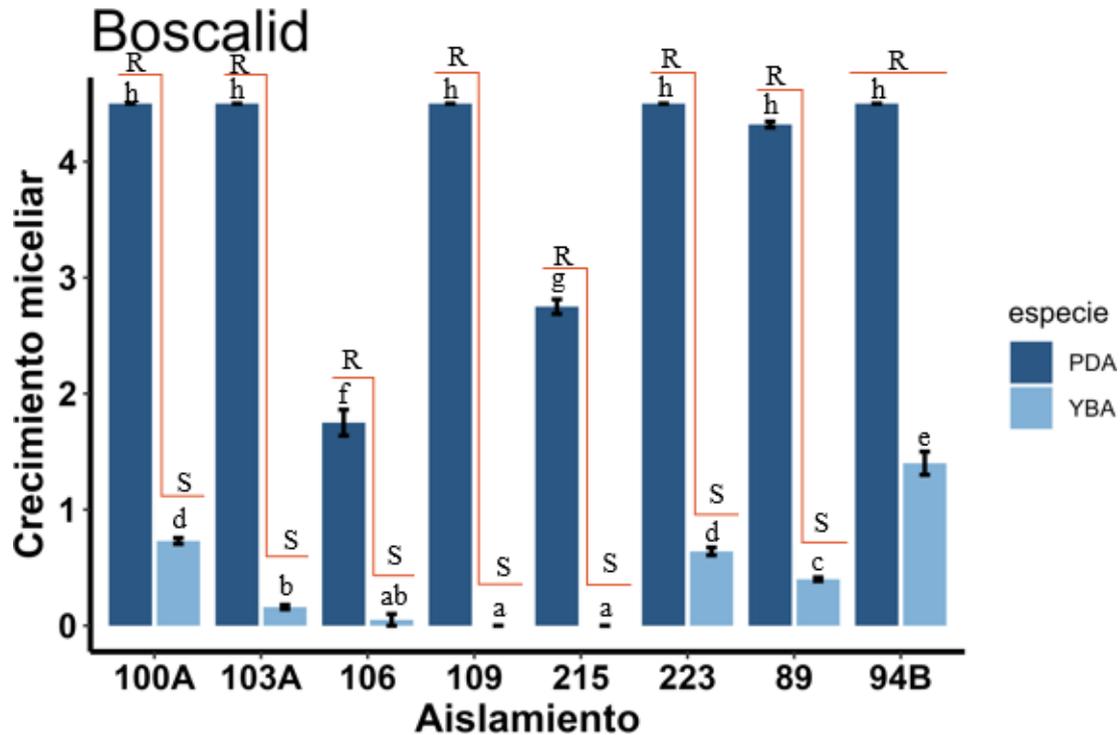


Figura 17: Comparación de medio PDA y YBA en medio envenenado con Boscalid para los ocho aislamientos empleados al cuarto día

Dentro del grupo químico de los SDHs se encuentra Boscalid y su modo de acción es impedir la respiración mitocondrial mediante la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) y en consecuencia impide la germinación y el desarrollo del tubo germinativo de la spora. Se ha documentado que *Botrytis cinerea* presenta resistencia a boscalid, debido a que, presenta mutaciones en subunidades del Sdh específicamente en SdhB, SdhC y SdhD (Shao et al., 2021). Así mismo, Amiri et al., (2014) indica que se dan mutaciones puntuales en codones del SdhB mediante la sustitución en H272R y H272Y.

La Figura 17, indica que para el PDA se observó que todos los aislamientos son resistentes y para YBA todo lo contrario, esta discrepancia en el resultado se puede deber a la composición de nutrientes de ambos medios y metabolitos secundarios (Osman et al., 2020). Según Stammler & Speakman, (2006) refiere que el crecimiento micelial se detiene en medio YBA y se puede discriminar los fenotipos de resistencia, pero, en medio PDA a medida que pasaba el tiempo el grado de resistencia se iba incrementando, es por ello, que se tiene que trabajar con una dosis más elevada, para poder determinar el grado de resistencia que está presente en este medio (Myresiotis et al., 2008). Según Fernández-Ortuño et al., (2017) la evolución de la resistencia a boscalid ha decrecido de 73 a 41%

por la aplicación de otros ingredientes activos como fenhexamid o ciprodinil + fludioxonil (switch).

g. Fluopyram

La respuesta de sensibilidad (R o S) de *B. cinerea* frente al i.a. a una dosis discriminatoria, mostró diferencias significativas al evaluado de manera cualitativa según Cosseboom et al. (2019) al emplear medios envenenado preparados con medio YBA (método cosseboom) y medio preparado con PDA (método convencional) sin embargo, los valores observados del crecimiento del diámetro de los ocho aislamientos para cada día, permiten apreciar que existieron diferencias estadísticas significativas para los 8 aislamientos para la evaluación en cada uno de los medio envenenado (YBA y PDA) con el fungicida fluopyram, según la prueba de significancia de Tukey al 5% se establecieron rangos de significancia en las dos lecturas, para el medio PDA y YBA (Tabla 16).

Dentro de los rangos de lectura evaluados para el día 4, se encontró que para los 8 aislamientos se tiene diferencias significativas al evaluar, quiere decir que no puede crecer tanto en medio envenenado preparado con PDA como en medio envenenado preparado con YBA (Figura 18).

Tabla 16: Evaluación diaria de la sensibilidad después de la inoculación de *Botrytis cinerea* en medio envenenado con Fluopyram.

Aislamiento	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5											
	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA										
94B	0 a	S	20e	S	0a	S	41.6 g	R	0a	S	63.6e	R	0a	S	84.2 h	R	0a	S	92.8f	R
215	0 a	S	3.6 bc	S	0a	S	18.4 b	S	0a	S	38.2c	R	0a	S	57.4 ef	R	0a	S	73.4c de	R
103A	0 a	S	2.6 b	S	0a	S	20bc	S	0a	S	39.6c	R	0a	S	60.6 fg	R	0a	S	78.6e	R
100A	0 a	S	8.8 d	S	0a	S	31.6 f	R	1ab	S	49.4d	R	1.4 ab	S	66.4 g	R	2.2 a	S	76.2d e	R
109	0 a	S	6c	S	1.4 a	S	21.8 cd	R	2.6 ab	S	37c	R	4.4 bc	S	52.2 de	R	8b	S	68.2c d	R
106	0 a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S	0a	S
89	0 a	S	8.6 d	S	0a	S	27.2 e	R	0a	S	46.8d	R	0a	S	66g	R	0a	S	80e	R
223	0 a	S	10.2d	S	1.8 a	S	23.4 d	R	4b	S	35.2c	R	6.8 c	S	49.6 d	R	8.8 b	S	67.6c	R
CV (%)	2.210495		2.078289		2.340022		2.829511		2.69376											

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor con 95% de confianza ($\alpha=0.05$)

Cv: coeficiente de varianza

*S: Sensibilidad

*R: Resistencia

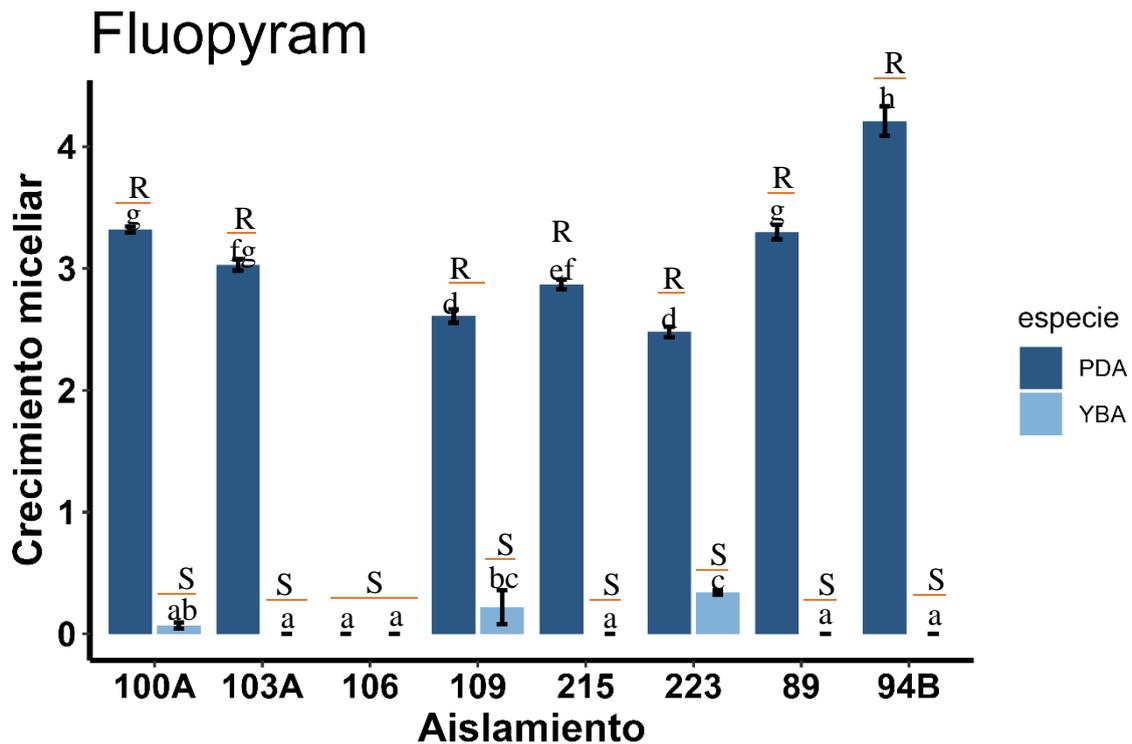


Figura 18: Comparación de medio PDA y YBA en medio envenenado con Fluopyram para los ocho aislamientos empleados al cuarto día

Los resultados obtenidos para fluopyram demuestran que los aislamientos en medio PDA son resistentes, pero todo lo contrario para el caso de YBA. Avenot y Michailides (2010) refiere que para el caso de PDA no se ha logrado obtener una línea base de resistencia a pesar de emplear una dosis de 10 ppm por lo que el uso del medio PDA se emplea para casos puntuales como repiques, almacenamiento y conservación de hongos (Testempasis et al., 2020), es por ello que se emplea mejor el medio YBA, puesto que, este medio impide que se obtenga energía a través de la fermentación anaeróbica y así se pueda tener el efecto del fluopyram sobre el hongo (Stammler & Speakman, 2006) y también tiene un residuo activo diferente al boscalid que se une a residuos de dos subunidades en el complejo mitocondrial II, por eso, se comienza a emplear el medio YBA, ya que, se tiene un alteración de aminoácidos en ambas subunidades que es necesaria para obtener categorías de resistencia (Cosseboom et al., 2019; Weber & Hahn, 2011) dado que, al tener estas categorías se puede estimar el riesgo de resistencia al grupo químico de los SDHIs como es el fluopyram.

V. CONCLUSIONES

Bajo condiciones en las que se condujo el experimento, se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

- Los aislamientos pertenecientes a la colección del proyecto Fondecyt 360-2019 corresponden culturalmente y morfológicamente al género *Botrytis*, lo que se confirmó con el análisis molecular de las secuencias de la región ITS.
- El análisis molecular y filogenético de los genes nucleares (*G3PDH*, *HSP60* y *RPB2*) permitió confirmar que los aislamientos de *Botrytis* spp. representativos para el estudio de los 8 aislamientos (100A, 103A, 106, 109, 215, 223, 89 y 94B), aislados del cultivo del arándano corresponden únicamente a la especie de *Botrytis cinerea* y los estudios concatenado determinó que los 8 aislados de las diferentes zonas en Perú es *B. cinerea*.
- Se tiene una diferencia al emplear el medio PDA, MEA o YBA para los diferentes ingredientes activos, por ello, el medio Mea se tiene que emplear para los ingredientes activos como fenhexamid, iprodione, methyl-thiophanato, fludioxonil y Pyraclostrobin, mientras que el medio YBA se emplea para los ingredientes activos de boscalid y fluopyram, mientras que, el medio PDA se emplea para casos puntuales como es el repique, conservación y almacenamiento.

VI. RECOMENDACIONES

- Se sugiere aumentar el número de aislamientos y utilizar dosificaciones que sean representativas de la cantidad de producto que se utilizaría por hectárea, con el fin de mejorar la evaluación in vitro. De esta manera, se podrían obtener resultados más precisos y confiables sobre la efectividad de los productos evaluados en el control de la enfermedad en cuestión.
- Es recomendable llevar a cabo una evaluación de la sensibilidad de *Botrytis* spp. a los ingredientes activos utilizados en los fungicidas, y obtener el EC50 (concentración efectiva del 50%) para cada uno de ellos. Además, esta evaluación debe realizarse en diferentes zonas de Perú, a fin de tener en cuenta el riesgo potencial de desarrollo de resistencia a los fungicidas que se utilizan regularmente para controlar *Botrytis* spp. De esta manera, se podrían implementar medidas preventivas y/o alternativas en caso de que se observe resistencia a alguno de los fungicidas utilizados.
- A nivel morfológico, varias especies de *Botrytis* son muy similares entre sí, lo que dificulta su identificación precisa. Por lo tanto, se recomienda utilizar análisis filogenéticos para complementar la identificación de estas especies. En estos análisis, se pueden incluir una amplia variedad de marcadores genéticos, tales como los genes NEP 1 y NEP2. Estos marcadores genéticos permitirán una identificación más precisa y confiable de las especies de *Botrytis*, lo que a su vez, ayudará a mejorar la eficacia de las estrategias de control y prevención de esta enfermedad en los cultivos afectados.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alzohairy, S. A., Gillett, J., Saito, S., Naegele, R. N., Xiao, C. L., & Miles, T. D. (2021). Fungicide Resistance Profiles of *Botrytis cinerea* Isolates From Michigan Vineyards and Development of a TaqMan Assay for Detection of Fenhexamid Resistance. *Plant Disease*, *105*(2), 285–294. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1087-RE>
- Amiri, A., Heath, S. M., & Peres, N. A. (2013). Phenotypic Characterization of Multifungicide Resistance in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry Fields in Florida. *Plant Disease*, *97*(3), 393–401. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-12-0748-RE>
- Amiri, A., Heath, S. M., & Peres, N. A. (2014). Resistance to Fluopyram, Fluxapyroxad, and Penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from Strawberry. *Plant Disease*, *98*(4), 532–539. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0753-RE>
- Amiri, A., & Peres, N. A. (2014). Diversity in the *erg27* Gene of *Botrytis cinerea* Field Isolates from Strawberry Defines Different Levels of Resistance to the Hydroxyanilide Fenhexamid. *Plant Disease*, *98*(8), 1131–1137. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1171-RE>
- Avenot, H. F., & Michailides, T. J. (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, *29*(7), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.019>
- Avenot, H. F., Morgan, D. P., Quattrini, J., & Michailides, T. J. (2020). Phenotypic and molecular characterization of fenhexamid resistance in *Botrytis cinerea* isolates collected from pistachio orchards and grape vineyards in California. *Crop Protection*, *133*, 105133. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105133>
- Avenot, H. F., Quattrini, J., Puckett, R., & Michailides, T. J. (2018). Different levels of resistance to cyprodinil and iprodione and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates collected from pistachio, grape, and pomegranate fields in California. *Crop Protection*, *112*, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.06.005>

- Baggio, J. S., Peres, N. A., & Amorim, L. (2018). Sensitivity of *Botrytis cinerea* Isolates from Conventional and Organic Strawberry Fields in Brazil to Azoxystrobin, Iprodione, Pyrimethanil, and Thiophanate-Methyl. *Plant Disease*, 102(9), 1803–1810. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1221-RE>
- Bakthisaran, R., Tangirala, R., & Rao, Ch. M. (2015). Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(4), 291–319. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>
- Barnes, S. E., & Shaw, M. W. (2002). Factors affecting symptom production by latent *Botrytis cinerea* in *Primula* × *polyantha*: Grey mould of *polyanthus*. *Plant Pathology*, 51(6), 746–754. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00761.x>
- Beever, R. E., & Weeds, P. L. (2007). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 29–59). Springer.
- Brandhorst, T. T., & Klein, B. S. (2019). Uncertainty surrounding the mechanism and safety of the post-harvest fungicide fludioxonil. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 561–565. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.037>
- Cappello, F., Marino Gammazza, A., Palumbo Piccionello, A., Campanella, C., Pace, A., Conway de Macario, E., & Macario, A. J. (2014). Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: Targets and agents. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(2), 185–208. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.856417>
- Caruso Bavisotto, C., Alberti, G., Vitale, A. M., Paladino, L., Campanella, C., Rappa, F., Gorska, M., Conway de Macario, E., Cappello, F., Macario, A. J. L., & Marino Gammazza, A. (2020). Hsp60 Post-translational Modifications: Functional and Pathological Consequences. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(1–11), 95. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00095>
- Chacón, K. (2014). *Aislamiento de mohos presentes en frutos de Vaccinium corymbosum var. Biloxi “arándano” almacenados bajo Atmósferas Controladas*. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional de Trujillo.
- Collantes, R., & Altamirano, J. (2020). Fincas productoras de arándano azul en Cañete, Lima, Perú. *Aporte Santiaguino*. <https://doi.org/10.32911/as.2020.v13.n1.677>
- Copier, C. (2013). *Caracterización genética y fenotípica de aislados chilenos de Botrytis cinerea Pers. Provenientes de Vitis vinifera L CV. Thompson seedless con distinto nivel de sensibilidad a estrobilurinas*. Universidad de Chile.

- Cosseboom, S. D., Ivors, K. L., Schnabel, G., Bryson, P. K., & Holmes, G. J. (2019). Within-Season Shift in Fungicide Resistance Profiles of *Botrytis cinerea* in California Strawberry Fields. *Plant Disease*, *103*(1), 59–64. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0406-RE>
- Cosseboom, S. D., Schnabel, G., & Hu, M. (2020). Competitive ability of multi-fungicide resistant *Botrytis cinerea* in a blackberry planting over three years. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *163*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.008>
- Cui, K., He, L., Li, T., Mu, W., & Liu, F. (2021). Development of Boscalid Resistance in *Botrytis cinerea* and an Efficient Strategy for Resistance Management. *Plant Disease*, *105*(4), 1042–1047. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1009-RE>
- Dalgaard, P. (2008). *Introductory Statistics with R*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-79054-1>
- Dean, A., Voss, D., & Draguljić, D. (2017). *Design and Analysis of Experiments*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-52250-0>
- Díaz, J. (2016). *Caracterización molecular y análisis filogenético de hongos microscópicos asociados a manchas foliares en hojas de uvilla (<i>Physalis peruviana</i> L.) en varias localidades del cantón Quito, Pichincha* [Tesis de pregrado]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Dowling, M., Gelain, J., May De Mio, L. L., & Schnabel, G. (2021). Characterization of High Fludioxonil Resistance in *Botrytis cinerea* Isolates from Calibrachoa Flowers. *Phytopathology*, *111*(3), 478–484. <https://doi.org/10.1094/PHTO-07-20-0268-R>
- Edler, D., Klein, J., Antonelli, A., & Silvestro, D. (2021). raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution*, *12*(2), 373–377. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13512>
- Feng, H., Wang, S., Liu, Z., Miao, J., Zhou, M., & Huang, L. (2020). Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Valsa mali* to pyraclostrobin. *Phytopathology Research*, *2*(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s42483-020-00072-9>
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Peres, N. A., & Schnabel, G. (2014). Fungicide Resistance Profiles in *Botrytis cinerea* from Strawberry Fields of Seven Southern U.S. States. *Plant Disease*, *98*(6), 825–833. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0970-RE>
- Fernández-Ortuño, D., Pérez-García, A., Chamorro, M., de la Peña, E., de Vicente, A., & Torés, J. A. (2017). Resistance to the SDHI Fungicides Boscalid, Fluopyram,

- Fluxapyroxad, and Penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from Commercial Strawberry Fields in Spain. *Plant Disease*, 101(7), 1306–1313. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0067-RE>
- Fillinger, S., & Elad, Y. (Eds.). (2016). *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Fillinger, S., & Walker, A.-S. (2016). Chemical Control and Resistance Management of Botrytis Diseases. En S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 189–216). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_10
- Georgopoulos, S. G., & Zaracovitis, C. (1967). Tolerance of Fungi to Organic Fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, 5(1), 109–130. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.05.090167.000545>
- Gómez, T. (2013). *Caracterización de aislamientos de Botrytis cinerea de rosa en la Sabana de Bogotá* [Tesis de posgrado]. Universidad Nacional de Colombia.
- Grabke, A., Fernández-Ortuño, D., & Schnabel, G. (2013). Fenhexamid Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry Fields in the Carolinas Is Associated with Four Target Gene Mutations. *Plant Disease*, 97(2), 271–276. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-12-0587-RE>
- Grabke, A., & Stammler, G. (2015). A *Botrytis cinerea* Population from a Single Strawberry Field in Germany has a Complex Fungicide Resistance Pattern. *Plant Disease*, 99(8), 1078–1086. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0710-RE>
- Grimmer, M. K., van den Bosch, F., Powers, S. J., & Paveley, N. D. (2015). Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution: Fungicide resistance risk assessment. *Pest Management Science*, 71(2), 207–215. <https://doi.org/10.1002/ps.3781>
- Groves, J. W., & Loveland, C. A. (1953). The Connection Between Botryotinia Fuckeliana and Botrytis Cinerea. *Mycologia*, 45(3), 415–425. <https://doi.org/10.1080/00275514.1953.12024279>
- Hauschildt, M., Steinkellner, S., & Weber, R. W. S. (2020). Grey mould populations in northern German sweet cherry and plum orchards: Selection of fungicide-resistant *Botrytis cinerea* strains over sensitive *B. pseudocinerea* by fungicide treatments. *European Journal of Plant Pathology*, 157(3), 615–623. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02026-5>

- Hoist-Jensen, A., Vaage, M., & Schumacher, T. (1998). An approximation to the phylogeny of *Sclerotinia* and related genera. *Nordic Journal of Botany*, *18*(6), 705–719. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1998.tb01553.x>
- Hu, M.-J., Luo, C.-X., Grabke, A., & Schnabel, G. (2011). Selection of a Suitable Medium to Determine Sensitivity of *Monilinia fructicola* Mycelium to SDHI Fungicides: SDHIs Sensitivity Assay with *Monilinia fructicola* Mycelium. *Journal of Phytopathology*, *159*(9), 616–620. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01815.x>
- Huarhua, M. H. (2018). *Razas de Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici aisladas de tomate (Solanum lycopersicum) proveniente de costa central del Perú* [Tesis de posgrado]. UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, *17*(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., & Bollback, J. P. (2001). Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science*, *294*(5550), 2310–2314. <https://doi.org/10.1126/science.1065889>
- Ishii, H., Miyamoto, T., Ushio, S., & Kakishima, M. (2011). Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podospaera xanthii*: Activity of fluopyram against boscalid-resistant *C. cassiicola* and *P. xanthii*. *Pest Management Science*, *67*(4), 474–482. <https://doi.org/10.1002/ps.2092>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kim, Y. K., & Xiao, C. L. (2011). Stability and Fitness of Pyraclostrobin- and Boscalid-Resistant Phenotypes in Field Isolates of *Botrytis cinerea* from Apple. *Phytopathology*, *101*(11), 1385–1391. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0123>
- Kubicek, C. P., Zehentgruber, O., El-Kalak, H., & Rohr, M. (1980). Regulation of citric acid production by oxygen: Effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *9*(2), 101–115. <https://doi.org/10.1007/BF00503505>

- Lahlali, R., Serrhini, M. N., Friel, D., & Jijakli, M. H. (2007). Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. *International Journal of Food Microbiology*, *114*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.004>
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, R. W. S., Kauff, F., Scalliet, G., & Hahn, M. (2013a). 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*(1), 159–167. <https://doi.org/10.1128/AEM.02655-12>
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, R. W. S., Kauff, F., Scalliet, G., & Hahn, M. (2013b). 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*(1), 159–167. <https://doi.org/10.1128/AEM.02655-12>
- Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., & Schnabel, G. (2012). *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia*, *104*(3), 650–658. <https://doi.org/10.3852/11-218>
- Liang, H., Li, J., Luo, C., Li, J., & Zhu, F.-X. (2019). Effects of SHAM on the Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* to QoI Fungicides. *Plant Disease*, *103*(8), 1884–1888. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2142-RE>
- Liang, H.-J., Di, Y.-L., Li, J.-L., You, H., & Zhu, F.-X. (2015). Baseline Sensitivity of Pyraclostrobin and Toxicity of SHAM to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, *99*(2), 267–273. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0633-RE>
- Lima, J. O., Pereira, J. F., Rincones, J., Barau, J. G., Araújo, E. F., Pereira, G. A. G., & Queiroz, M. V. (2009). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Genetics and Molecular Biology*, *32*(2), 362–366. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009000200024>
- Liu, Q., Li, G., Li, J., & Chen, S. (2016). *Botrytis eucalypti*, a novel species isolated from diseased Eucalyptus seedlings in South China. *Mycological Progress*, *15*(10–11), 1057–1079. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1229-1>
- Liu, S., Hai, F., & Jiang, J. (2017). Sensitivity to Fludioxonil of *Botrytis cinerea* Isolates from Tomato in Henan Province of China and Characterizations of Fludioxonil-

- resistant Mutants. *Journal of Phytopathology*, 165(2), 98–104.
<https://doi.org/10.1111/jph.12542>
- Malkus, A., Linda Chang, P.-F., Zuzga, S. M., Chung, K., Shao, J., Cunfer, B. M., Arseniuk, E., & Ueng, P. P. (2006). RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycological Research*, 110(10), 1152–1164. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.015>
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., & Fermaud, M. (2003). *Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of Botrytis cinerea*. 109(5), 10. <https://doi.org/10.1023/a:1024222206991>
- Matsuzaki, Y., Uda, Y., Kurahashi, M., & Iwahashi, F. (2021). Microtiter plate test using liquid medium is an alternative method for monitoring metyltetraprole sensitivity in *Cercospora beticola*. *Pest Management Science*, 77(3), 1226–1234. <https://doi.org/10.1002/ps.6133>
- Meléndez-Hevia, E., Raposo, R. R., Meléndez, R., & Cabezas, Y. H. (1997). Revisión de los métodos filogenéticos de secuencias: Una crítica a la teoría de Kimura sobre el neutralismo de la evolución moleculañar. *Revista de la academia Canaria de Ciencias*, 9(65–86), 18.
- Mercier, J., Kong, M., & Cook, F. (2010). Fungicide Resistance Among *Botrytis cinerea* Isolates from California Strawberry Fields. *Plant Health Progress*, 11(1), 12. <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-0806-01-RS>
- Mirzaei, S., Goltapeh, E. M., Shams-Bakhsh, M., & Safaie, N. (2008). Identification of *Botrytis* spp. On Plants Grown in Iran. *Journal of Phytopathology*, 156(1), 071009191350001-??? <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01317.x>
- Miyamoto, T., Ishii, H., Seko, T., Kobori, S., & Tomita, Y. (2009). Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology*, 58(6), 1144–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x>
- Miyamoto, T., Ishii, H., Stammler, G., Koch, A., Ogawara, T., Tomita, Y., Fountaine, J. M., Ushio, S., Seko, T., & Kobori, S. (2010). Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid: Boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola*. *Plant Pathology*, 59(5), 873–881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02321.x>
- Mondal, S. N., Bhatia, A., Shilts, T., & Timmer, L. W. (2005). Baseline Sensitivities of Fungal Pathogens of Fruit and Foliage of Citrus to Azoxystrobin, Pyraclostrobin, and

- Fenbuconazole. *Plant Disease*, 89(11), 1186–1194. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1186>
- 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(10), 1427–1431. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-10-1427>
- Osman, M., Stigloher, C., Mueller, M. J., & Waller, F. (2020). An improved growth medium for enhanced inoculum production of the plant growth-promoting fungus *Serendipita indica*. *Plant Methods*, 16(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00584-7>
- Peerzada, S. H., Viswanath, H. S., & Bhat, K. A. (2020). Effect of Chemical Inducers of Systemic Acquired Resistance (SAR) for the Management of Late Blight Disease of Potato. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, 26–41. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2020/v21i1530250>
- Petit, A.-N., Vaillant-Gaveau, N., Walker, A.-S., Leroux, P., Baillieul, F., Panon, M.-L., Clément, C., & Fontaine, F. (2010). Determinants of fenhexamid effectiveness against grey mould on grapevine: Respective role of spray timing, fungicide resistance and plant defences. *Crop Protection*, 29(10), 1162–1167. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.04.007>
- Plesken, C., Weber, R. W. S., Rupp, S., Leroch, M., & Hahn, M. (2015). *Botrytis pseudocinerea* Is a Significant Pathogen of Several Crop Plants but Susceptible to Displacement by Fungicide-Resistant *B. cinerea* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7048–7056. <https://doi.org/10.1128/AEM.01719-15>
- Plesken, C., Westrich, L.-D., & Hahn, M. (2015). Genetic and phenotypic characterization of *Botrytis calthae*. *Plant Pathology*, 64(1), 128–136. <https://doi.org/10.1111/ppa.12240>
- Posada, D. (2009). Selection of Models of DNA Evolution with jModelTest. En D. Posada (Ed.), *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis* (Vol. 537, pp. 93–112). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_5
- Ren, W., Shao, W., Han, X., Zhou, M., & Chen, C. (2016). Molecular and Biochemical Characterization of Laboratory and Field Mutants of *Botrytis cinerea* Resistant to Fludioxonil. *Plant Disease*, 100(7), 1414–1423. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1290-RE>
- 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(2), 169–174. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11127.x>
- Rodriguez, A., & Arbelaez, G. (s/f). "EFECTO DE UN PLÁSTICO FOTOS ELECTIVO y DE UNA PANTALLA CLIMÁTICA EN LA ENFERMEDAD CAUSADA POR EL HONGO *Botrytis cinerea* Pers. Y EN EL NEGREAMIENTO DE LOS PÉTALOS EN UN CULTIVO DE ROSAS (*Rosa hybrida*)". 7(127–133), 7.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rupp, S., Weber, R. W. S., Rieger, D., Detzel, P., & Hahn, M. (2017). Spread of *Botrytis cinerea* Strains with Multiple Fungicide Resistance in German Horticulture. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02075>
- Saito, S., Furuya, S., Takayanagi, T., & Suzuki, S. (2010). Phenotypic Analyses of Fenhexamid Resistant *Botrytis cinerea* Mutants. En O. Carisse (Ed.), *Fungicides*. InTech. <https://doi.org/10.5772/13044>
- Saito, S., Margosan, D., Michailides, T. J., & Xiao, C. L. (2016). *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. *Mycologia*, 108(2), 330–343. <https://doi.org/10.3852/15-165>
- Saito, S., Michailides, T. J., & Xiao, C. L. (2016a). Fungicide Resistance Profiling in *Botrytis cinerea* Populations from Blueberry in California and Washington and Their Impact on Control of Gray Mold. *Plant Disease*, 100(10), 2087–2093. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0229-RE>
- Saito, S., Michailides, T. J., & Xiao, C. L. (2019). Fungicide-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* populations and their impact on control of gray mold on stored table grapes in California. *European Journal of Plant Pathology*, 154(2), 203–213. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01649-z>
- Saito, S., Michailides, T., & Xiao, C. (2016b). Fungicide Resistance Profiling in *Botrytis cinerea* Populations from Blueberry in California and Washington and Their Impact on Control of Gray Mold. *Plant Disease*, 100(10), 2087–2093. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0229-RE>

- Saito, S., & Xiao, C. L. (2018). Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* Populations in California and its Influence on Control of Gray Mold on Stored Mandarin Fruit. *Plant Disease*, *102*(12), 2545–2549. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0766-RE>
- Saitoh, K., Togashi, K., Arie, T., & Teraoka, T. (2006). A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology*, *72*(6), 348–350. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0300-1>
- Sang, C., Ren, W., Wang, J., Xu, H., Zhang, Z., Zhou, M., Chen, C., & Wang, K. (2018). Detection and fitness comparison of target-based highly fludioxonil-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from strawberry and cucumber in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *147*, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.01.012>
- Seyran, M., Brenneman, T. B., & Stevenson, K. L. (2010). In vitro toxicity of alternative oxidase inhibitors salicylhydroxamic acid and propyl gallate on *Fusicladium effusum*. *Journal of Pest Science*, *83*(4), 421–427. <https://doi.org/10.1007/s10340-010-0312-7>
- Shao, W., Zhao, Y., & Ma, Z. (2021). Advances in Understanding Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* in China. *Phytopathology*®, *111*(3), 455–463. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA>
- Sharma, E., & Kapoor, R. (2017). Insights into the molecular interplay of virulence factors in *Botrytis cinerea*. *Australasian Plant Pathology*, *46*(6), 551–561. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0519-7>
- Staats, M., van Baarlen, P., Schouten, A., van Kan, J. A. L., & Bakker, F. T. (2007). Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. *Fungal Genetics and Biology*, *44*(1), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.07.003>
- Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan. (2005). Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution*, *22*(2), 333–346. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>
- Stammler, G., Benzinger, G., & Speakman, J. (2007). A Rapid and Reliable Method for Monitoring the Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to Boscalid. *Journal of Phytopathology*, *155*(11–12), 746–748. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01294.x>
- Stammler, G., & Speakman, J. (2006). Microtiter Method to Test the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Boscalid. *Journal of Phytopathology*, *154*(7–8), 508–510. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01139.x>

- Sun, H., Cui, J., Tian, B., Cao, S., Zhang, X., & Chen, H. (2020). Resistance risk assessment for *Fusarium graminearum* to pydiflumetofen, a new succinate dehydrogenase inhibitor. *Pest Management Science*, 76(4), 1549–1559. <https://doi.org/10.1002/ps.5675>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tauma, E. (2021). *Caracterización morfológica y genética de aislamientos de Botrytis cinerea en arándanos* [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Terrones-Salgado, J., Nieto-Angel, D., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortiz, D., García-Velasco, R., Vallejo-Pérez, M. R., & Sánchez-García, P. (2019). Botrytis cinerea causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1906-1>
- Testempasis, S., Puckett, R. D., Michailides, T. J., & Karaoglanidis, G. S. (2020). Genetic structure and fungicide resistance profile of Botrytis spp. Populations causing postharvest gray mold of pomegranate fruit in Greece and California. *Postharvest Biology and Technology*, 170, 111319. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111319>
- Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T., & Baldrian, P. (2016). The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular Ecology Resources*, 16(2), 388–401. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12456>
- Wang, W., Fang, Y., Imran, M., Hu, Z., Zhang, S., Huang, Z., & Liu, X. (2021). Characterization of the Field Fludioxonil Resistance and Its Molecular Basis in Botrytis cinerea from Shanghai Province in China. *Microorganisms*, 9(2), 266. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020266>
- Weber, R. W. S. (2010). Schnelle und einfache Methode zum Nachweis der Fenhexamid-Resistenz bei Botrytis. *Erwerbs-Obstbau*, 52(1), 27–32. <https://doi.org/10.1007/s10341-010-0099-y>
- Weber, R. W. S., & Hahn, M. (2011). A rapid and simple method for determining fungicide resistance in Botrytis. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 118(1), 17–25. <https://doi.org/10.1007/BF03356376>

- Weber, R. W. S., & Hahn, M. (2019). Grey mould disease of strawberry in northern Germany: Causal agents, fungicide resistance and management strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(4), 1589–1597. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09590-1>
- Weeds, P. L., Beever, R. E., Sharrock, K. R., & Long, P. G. (1999). A major gene controlling pathogenicity in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *54*(1–2), 13–35. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0187>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yin, W. X., Adnan, M., Shang, Y., Lin, Y., & Luo, C. X. (2018). Sensitivity of *Botrytis cinerea* From Nectarine/Cherry in China to Six Fungicides and Characterization of Resistant Isolates. *Plant Disease*, *102*(12), 2578–2585. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0244-RE>
- Zhang, J., Wu, M.-D., Li, G.-Q., Yang, L., Yu, L., Jiang, D.-H., Huang, H.-C., & Zhuang, W.-Y. (2010). *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. *Mycologia*, *102*(5), 1114–1126. <https://doi.org/10.3852/09-217>
- Zhou, Y. J., Zhang, J., Wang, X. D., Yang, L., Jiang, D. H., Li, G. Q., Hsiang, T., & Zhuang, W. Y. (2014). Morphological and phylogenetic identification of *Botrytis sinoviticola*, a novel cryptic species causing gray mold disease of table grapes (*Vitis vinifera*) in China. *Mycologia*, *106*(1), 43–56. <https://doi.org/10.3852/13-032>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Medios de cultivo

1. Papa-Dextrosa-Agar (PDA)

Es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados de leche y productos cosméticos. Los hongos crecen en este medio para desarrollar una morfología típica, siendo la base del medio es altamente nutritiva que permite la esporulación y la producción de pigmentos. (DIFCO, 2022).

Los carbohidratos y la infusión de papa promueven el crecimiento de mohos y levaduras, y el agar es adicionado como agente solidificante. (DIFCO, 2022).

Composición (39 g de medio en un litro de agua destilada)

Infusión de papa	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar Bacteriológico	15.0 g

2. Extracto de Malta Agar (MEA)

Es un medio ácido, el extracto de malta, es rico en glúcidos, es capaz de aportar todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de mohos y levaduras. Por su carácter ácido del medio, se inhibe el crecimiento de la mayor parte de los gérmenes contaminantes (MERCK, 2022).

Composición (23 g de medio en un litro de agua destilada)

Extracto de Malta	30.0 g
Bacto Peptona	3.0 g
Agar Bacteriológico	15.0 g

3. Extracto de Levadura (YBA)

El contenido de peptona, extracto de levadura proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos, mientras que el acetato de sodio inhibe el crecimiento de contaminantes (DIFCO, 2022).

Composición (55 g de medio en un litro de agua destilada)

Extracto de Levadura	10.0 g
Bacto peptona	10.0 g
Acetato de Sodio	20.0 g
Agar Bacteriológico	15.0 g

Anexo 2: Números de accesoión de las obtenidas del GenBank.

Especies	Cultivo	Origen geográfico	N° de accesoión en el GenBank			Referencias
			G3PDH	HSP60	RPB2	
<i>S. sclerotiorum</i> *	484	-	AJ745716	AJ716048	AJ705044	Staats et al., 2005
<i>B. byssoidea</i>	MUCL94 ^T	Estados Unidos	AJ745670	AJ716059	AJ704998	Staats et al., 2005
<i>B. californica</i>	X503	Estados Unidos	KJ937048	KJ937058	KJ937068	Saito et al., 2016
<i>B. californica</i>	X655 ^T	Estados Unidos	KJ937049	KJ937059	KJ937069	Saito et al., 2016
<i>B. californica</i>	X1348	Estados Unidos	KJ937051	KJ937061	KJ937071	Saito et al., 2016
<i>B. californica</i>	X1482	Estados Unidos	KJ937052	KJ937062	KJ937072	Saito et al., 2016
<i>B. californica</i>	X766	Estados Unidos	KJ937050	KJ937060	KJ937070	Saito et al., 2016
<i>B. caroliniana</i>	CB15 ^T	Estados Unidos	JF811590	JF811587	JF811584	Li et al., 2012
<i>B. cinerea</i>	SAS56	Italia	AJ745677	AJ716067	AJ705006	Staats et al., 2005
<i>B. cinerea</i>	X458	Estados Unidos	KJ937054	KJ937064	KJ937074	Saito et al., 2016
<i>B. cinerea</i>	X793	Estados Unidos	KJ937057	KJ937067	KJ937077	Saito et al., 2016
<i>B. cinerea</i>	BC-1	China	EU563113	EU563096	EU563103	Zhang et al., 2010
<i>B. cinerea</i>	BC-15	China	EU563114	EU563099	EU563108	Zhang et al., 2010

<i>B.cinerea</i>	BC-27	China	EU563118	EU563101	EU563107	Zhang et al., 2010
<i>B.cinerea</i>	GBC-2	China	JN692418	JN692390	JN692402	Zhou et al., 2014
<i>B.cinerea</i>	GBC-3-1a	China	JN692423	JN692395	JN692409	Zhou et al., 2014
<i>B.cinerea</i>	GBC-3-2a	China	JN692415	JN692387	JN692401	Zhou et al., 2014
<i>B.cinerea</i>	GBC-3-4c	China	JN692416	JN692388	JN692402	Zhou et al., 2014
<i>B.cinerea</i>	GBC-6	China	JN692419	JN692391	JN692405	Zhou et al., 2014
<i>B. cinérea</i>	MUCL87 ^T	Paises Bajos	AJ745676	AJ716065	AJ705004	Staats et al., 2005
<i>B.fabae</i>	CBS 109.57	Países Bajos	AJ745685	AJ716074	AJ705013	Staats et al., 2005
<i>B. fabae</i>	MUCL98 ^T	España	AJ745686	AJ716075	AJ705014	Staats et al., 2005
<i>B.fabae</i>	BC-22	China	EU563111	EU563102	EU563105	Zhang et al., 2010
<i>Botrytis</i> Group S	D08_H_8-04	Alemania	ND	JX266715	ND	Leroch et al., 2013
<i>Botrytis</i> Group S	D09_K_4-01	Alemania	ND	JX266716	ND	Leroch et al., 2013
<i>Botrytis</i> Group S	D10_B_F1-06	Alemania	ND	JX266717	ND	Leroch et al., 2013
<i>Botrytis</i> Group S	D10_B_F3-05	Alemania	ND	JX266718	ND	Leroch et al., 2013
<i>Botrytis</i> Group S	G09_S33	Grecia	ND	JX266719	ND	Leroch et al., 2013

<i>B. pseudocinerea</i>	B78	Brasil	MN561176	MN561120	MN547209	Azevedo et al., 2020
<i>B. pseudocinerea</i>	10091	Francia	JN692428	JN692400	JN692414	Zhou et al., 2014
<i>B. pseudocinerea</i>	X004	Estados Unidos	KJ796647	KJ796655	KJ796651	Saito et al., 2016
<i>B. pseudocinerea</i>	X010	Estados Unidos	KJ796648	KJ796656	KJ796652	Saito et al., 2016
<i>B. pseudocinerea</i>	X029	Estados Unidos	KJ796649	KJ796657	KJ796653	Saito et al., 2016
<i>B. pseudocinerea</i>	VD110 ^T	Francia	ND	ND	KR030052	Walker et al., 2011
<i>B. pseudocinerea</i>	N11_S_E06	Noruega	ND	JX266723	ND	Leroch et al., 2013
<i>B. sinoviticola</i>	GBC-3-2b ^T	China	JN692425	JN692397	JN692411	Zhou et al., 2014

^TCultivoex-tipo

Anexo 3: Secuencia consenso de los genes nucleares empleados

>G3DP (886 pb)

TAAGTTTCCGCTATCGGAGCTCCCGCAGATATCAAGGACCCGAGCTAATTTAT
GTTTTGCACAGGCATACATGTTGAAGTATGATTCCACCCACGGTCAATTCAAG
GGTGACATCAAGGTCCTTGCCGATGGATTGGAGGTCAATGGCAAGAAGGTCAA
GTTCTACACCGAGAGAGACCCAGCCAACATCCCATGGGCTGAGTCTGAGGCAT
ACTACGTCGTCGAGTCCACCGGTGTTTTCCACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCA
CATTTGAAGGGTGGTGCCAAGAAGGTTGTTATCTCTGCTCCTTCTGCCGATGCC
CCAATGTACGTTATGGGTGTCAACAACGAGACCTACACTGGTGATGTTGATGT
TATCTCCAACGCCTCTTGCACAACCAACTGCTTGGCTCCTCTCGCCAAGGTCAT
CAACGATGAGTTCACCATCATTGAAGGTTTGATGACCACCATCCACTCCTACAC
CGCTACCCAAAAGACCGTTGATGGTCCATCCGCTAAGGATTGGCGTGGAGGAC
GTACCGCTGCTCAAACATCATCCCATCGAGCACCGGTGCTGCCAAGGCTGTC
GGAAAGGTCATCCAGTCTTAACGGCAAACCTCACCGGAATGTCCATGCGTGT
TCCAACCTGCCAACGTCTCAGTTGTTGACTTGACTGTCCGCATTGAGAAGGGTGC
TTCTTACGATGAGATCAAGGCCGTCATCAAGAAGGCTGCTGATGGTCCTCTCA
AGGGTAAGTTACTCCATTACTCTTTCTTCGGCTCTAATTTGCTAATCGTAACAC
AGGCATATTGGCTTACACTGAGGACGATGTTGTCTCCACTGACATGAACGGTG
ACAACCACTCCTCCATCTTCGATGCCAAGGCTG

>HSP60 (976 pb)

ATTGTAAACTGATCATGTTTTTAATTTAGGAGCTCAAATTCGGTGTGAGGGCA
GAGCAGCTCTTCTTGCTGGTGTGAGACTTTGGCAAAAAGCTGTTGCTACAACCT
TGGGTCCCAAAGGCCGAAATGTTCTTATTGAGTCAGCATATGGCTCCCCAAAG
ATCACTAAAGGTTTGCAAACTCCCGGCTACCTAGTTTCAAGATTCTAATTATT
GGTGAATAGATGGTGTAAACCGTTGCCAGAGCTATTTCCCTCAAGGACAAATTC
GAGAACCTCGGTGCTAGACTTATCCAAGATGTTGCCTCGAAAACCAACGAGAC
CGCTGGTGATGGAACCACAACCGCTACTGTCCTTGCTAAATCTATTTTCTCCGA
GACCGTAAAGAACGTCGCCGCAGGATGCAACCCAATGGACTTGCGCAGAGGT
ACCCAAGCTGCCGTGGAGGCCGTTGTTGAGTTTTTGCAAAAAGAACAAGCGTGA
TATCACAACAAGCGAGGAAATCGCACAAGTTGCGACTATCAGTGCAAACGGTG
ATACCCACATCGGAAAATTGATTGCCAACGCTATGGAAAAGGTTGGAAAGGA

AGGTGTTATCACAGTTAAGGAAGGAAAGACCATGGAGGACGAACTCGATATT
ACCGAGGGAATGAGATTTGACCGCGGTTATGTTTCCCATACTTCATCACCGAT
ACCAAGTCGCAAAGGTGGAATTCGAGAAGCCATTGATTCTCCTTTCTGAGAA
GAAGATTTCAAACGTCCAAGATATTATCCAGCACTTGAGGCGTCTACTCAAC
TTCGTCGTCCTTTGGTCATCATTGCTGAAGATATCGATGGAGAAGCTCTCGCAG
TATGCATTCTTAACAAGCTCCGTGGTCAACTCCAAGTTGCCGCTGTCAAGGCC
CCGGTTTCGGTGATAACCGAAAGTCCATCCTCGGCGATCTCGGTATCTTGACCA
ATGCTACCGTCTTCACT

>RPB2 (1087 pb)

CTGTTCCGCAGATTGACAACAGACGTGTACAGATACTTGCAACGTTGCGTGGA
AAACAACCGAGAGTTTAATTTGACTTTGGGTGTGAAATCAACAACAATCACCA
ACGGTCTGAAATATTCTTTGGCCACAGGTAAGTGGGGTGACCAGAAGAAGGCA
GCAAGTTCTACCGCCGGAGTGTCTCAAGTGTTGAACAGATATACCTTTGCATCC
ACACTTTCTCATTTGCGCCGAACCAATACACCCATTGGACGTGATGGAAAGAT
CGCCAAACCTAGACAGCTGCATAATACCCATTGGGGCTTGGTCTGTCCGGCAG
AGACGCCCCGAAGGACAAGCTTGTGGTTTGGTTAAGAATTTGGCTCTGATGTGT
TACGTTACAGTCGGTACGCCAAGTGATCCAATCGTTGAGTTCATGATTCAACG
AAATATGGAAGTATTGGAGGAGTATGAACCACTCCGAGCCCCCAATGCAACAA
AGGTTTTTCGTCAATGGTGTTTGGGTTGGTATTCATCGAGATCCTGCTCATTGG
TCAAATGTGTCCAAGATCTTCGTAGATCACACTTGATCTCTCATGAAGTTTCAC
TTATTCGAGAAATTCGTGATAGAGAATTCAAGATTTTCACAGATGCAGGACGA
GTGTGCAGACCTCTATTGGTTATTGACAATGATCCTGACAGCGCAAACAAAGG
TAACTTGGTGTGTAACAAGGATCACATTCGCCGTCTGGAGGATGATCAGTTGC
TACCAGCAAACATGGATAAGGATGAGAAAGTAAGAAACGGATACTATGGATT
CCAAGGTTTGATTAATGACGGTGTGGTTGAGTACCTGGATGCCGAGGAAGAAG
AGACTGTCATGATTACAATGACACCTGAAGATCTGGACATCTCCCGACAGCTT
CAGGCTGGTTACCAAATTCGTCCTGACGAAAGTGGTGATTTGAACAAGCGTGT
TAAGGCACCTATCAATCCAAGTCTCATGTCTGGACTCATTGTGAAATTCATCC
AAGTATGATCTTGGGTATCTGCGCAAGCATTATTCCCTTCCCGGATCACAATCA
GGTAAGCTTTAAGTTCAATGAAT