

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE
AISLAMIENTOS DE *Botrytis cinerea* EN ARÁNDANOS”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

ELIAS TAUMA SALVADOR

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 Elias Imprimir .pdf (D143415430)
Submitted	8/31/2022 2:54:00 AM
Submitted by	Heidi
Submitter email	medalihuarrhua@lamolina.edu.pe
Similarity	6%
Analysis address	medalihuarrhua.unalm@analysis.urkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/50427/07790832.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y Fetched: 11/13/2021 5:43:01 AM	 12
W	URL: https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76899/52795282.2019.pdf?sequence=1 Fetched: 6/26/2022 4:48:04 AM	 4
W	URL: http://dspace.utalca.cl/bitstream/1950/11902/5/20190072.pdf Fetched: 9/10/2021 11:58:59 PM	 8
SA	Tesis Botrytis Angel Neira.docx Document Tesis Botrytis Angel Neira.docx (D29553159)	 4
W	URL: https://www.academia.edu/22684254/Genetic_characterization_of_grapevine_infecting_Botrytis_cinerea_isolates_from_Argentina Fetched: 5/18/2022 12:09:10 AM	 1

Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE AGRONOMÍA "CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE Botrytis cinerea EN ARÁNDANOS" TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO ELIAS TAUMA SALVADOR LIMA – PERÚ 2022 La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación (Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)

DEDICATORIA A mi abuelita, tíos, primos, padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS A la Universidad Agraria La Molina por brindarme los conocimientos necesarios para afrontar cualquier reto. A mi asesora la Ing. Mg. Sc. Heidi Huarhua por la oportunidad, las enseñanzas, su apoyo y sobre todo el tiempo entregado. Al FONDECYT por haber financiado la investigación. Al Dr. Alexis Dueñas por su valioso aporte brindado para el análisis de los datos del presente estudio. A la Blg. Cledy Ureta por sus críticas, comentarios y apreciaciones, valiosos en la investigación. A mi compañera Luz Ccoscco por el apoyo en las evaluaciones e instalación de los experimentos. Al Dr. Walter Apaza y la Ing. Mg. Sc. Liliána Aragón por los comentarios que aportaron mucho en la investigación.

1 INDICE GENERAL I. INTRODUCCIÓN	8 II. REVISIÓN DE LITERATURA
..... 3 2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ARÁNDANO	3 2.1.1. CLASIFICACIÓN
TAXONÓMICA	3 2.1.2. DESCRIPCIÓN DEL ARÁNDANO
..... 4 2.2.1. TAXONOMÍA	3 2.2. Botrytis cinerea
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	4 2.2.2.
CONDICIONES FAVORABLES PARA EL DESARROLLO DE Botrytis cinerea	4 2.2.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA
MATERIALES Y MÉTODOS	5 2.2.4.
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO	7 2.2.5. CICLO DE LA ENFERMEDAD DE Botrytis cinerea
3.2.1. UBICACIÓN	7 III.
3.2.2. AISLAMIENTO	8 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS
3.2.3. CULTIVO MONOSPÓRICO	8 3.1.1. UBICACIÓN
3.2.4. CONSERVACIÓN DE AISLAMIENTOS DE Botrytis cinerea	8 3.1.2. COLECTA DE MUESTRA
3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE CULTURAL	8 3.1.3. CULTIVO MONOSPÓRICO
3.3.2. TASAS DE CRECIMIENTO	8 3.1.4. CONSERVACIÓN DE AISLAMIENTOS DE Botrytis cinerea
3.3.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	9 3.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CULTURAL DE AISLAMIENTOS .. 10
3.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN	10 3.2.1. TASAS DE CRECIMIENTO
3.4.2. CUANTIFICACIÓN DE ADN	12 3.2.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA
3.4.3. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES DEL ESPACIO TRANSCRITO INTERNO (ITS)	12 3.2.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA
	13 3.2.4. CUANTIFICACIÓN DE ADN
	13 3.2.5. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES DEL ESPACIO TRANSCRITO INTERNO (ITS)
	14

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE
AISLAMIENTOS DE *Botrytis cinerea* EN ARÁNDANOS”**

ELIAS TAUMA SALVADOR

Tesis para optar el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Sustentada y Aprobada ante el siguiente jurado:

Ing. Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa
PRESIDENTE

Ing. Mg. Sc. Medali Heidi Huarhua Zaquinaula
ASESORA

Ph. D. Liliana María Aragón Caballero
MIEMBRO

Ph. D. Walter Eduardo Apaza Tapia
MIEMBRO

LIMA – PERÚ

2023

DEDICATORIA

A mi abuelita, tíos, primos, padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Agraria La Molina por brindarme los conocimientos necesarios para afrontar cualquier reto.

A mi asesora la Ing. Mg. Sc. Heidi Huarhua por la oportunidad, las enseñanzas, su apoyo y sobre todo el tiempo entregado.

Al FONDECYT por haber financiado la investigación.

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

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

A mi compañera Luz Ccoscco por el apoyo en las evaluaciones e instalación de los experimentos.

Al Dr. Walter Apaza y la Ing. Mg. Sc. Liliana Aragón por los comentarios que aportaron mucho en la investigación.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ARÁNDANO.....	4
2.1.1.	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	4
2.1.2.	DESCRIPCIÓN DEL ARÁNDANO.....	4
2.2.	<i>Botrytis cinerea</i>	5
2.2.1.	TAXONOMÍA	5
2.2.2.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	5
2.2.3.	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA.....	6
2.2.4.	CONDICIONES FAVORABLES PARA EL DESARROLLO DE <i>Botrytis cinerea</i>	7
2.2.5.	CICLO DE LA ENFERMEDAD DE <i>Botrytis cinerea</i>	8
III.	MATERIALES Y METÓDOS	9
3.1.	UBICACIÓN	9
3.2.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	9
3.2.1.	COLECTA DE MUESTRA	9
3.2.2.	AISLAMIENTO.....	9
3.2.3.	CULTIVO MONOSPÓRICO.....	10
3.2.4.	CONSERVACIÓN DE AISLAMIENTOS DE <i>Botrytis cinerea</i>	10
3.3.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CULTURAL DE AISLAMIENTOS.....	11
3.3.1.	CARACTERIZACIÓN DE CULTURAL.....	11
3.3.2.	TASAS DE CRECIMIENTO.....	13
3.3.3.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	13
3.3.4.	EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD.....	13
3.4.	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>B. cinerea</i>	14
3.4.1.	EXTRACCIÓN DE ADN.....	14
3.4.2.	CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	14
3.4.3.	AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES DEL ESPACIO TRANSCRITO INTERNO (ITS)	15
3.4.4.	DIFERENCIACIÓN DE <i>Botrytis</i> spp. Y GRUPOS DE <i>Botrytis cinerea</i> BASADOS EN PCR	16

3.4.5.	CORRESPONDENCIA GENOTÍPICA BASADO EN LA DETECCIÓN DE TRANSPOSONES	18
3.4.6.	DETERMINACIÓN DEL TIPO DE APAREAMIENTO	19
3.4.7.	SECUENCIACIÓN	20
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	21
4.1.	AISLAMIENTO.....	21
4.2.	CARACTERIZACIÓN CULTURA Y MORFOLÓGICA DE AISLAMIENTOS.....	23
4.2.1.	CARACTERIZACIÓN CULTURAL	23
4.2.2.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	29
4.2.3.	TASAS DE CRECIMIENTO.....	32
4.3.	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA.....	34
4.3.1.	EXTRACCIÓN DE ADN.....	34
4.3.2.	DIFERENCIACIÓN DE <i>Botrytis</i> spp. Y GRUPOS DE <i>Botrytis cinerea</i> BASADOS EN PCR.	36
4.3.3.	CORRESPONDENCIA GENOTÍPICA BASADO EN LA DETECCIÓN DE TRANSPOSONES	38
4.3.4.	DETERMINACIÓN DEL GRUPO DE APAREAMIENTO	40
4.3.5.	ANÁLISIS DE LAS REGIONES DEL ESPACIO TRANSCRITO INTERNO (ITS)...	41
4.3.6.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	41
4.4.	PRUEBA DE PATOGENICIDAD	43
V.	CONCLUSIONES.....	46
VI.	RECOMENDACIONES	47
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	48
VIII.	ANEXOS.....	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Escalas de evaluación de la caracterización cultural de los aislados de <i>B. cinerea</i>	12
Tabla 2: Programación del termociclador para la PCR con los primers ITS1 e ITS4	15
Tabla 3: Programación del termociclador para la PCR con los primers C279+/-	16
Tabla 4: Programación del termociclador para la PCR con los primers BcinN-in-F / BcinN-in-R, Mrr1 - spez-F / Mrr1-spez-R, y g2944_137_F / g2944_273_R.....	17
Tabla 5: Primers utilizados para la diferenciación de <i>B. cinerea</i> N, <i>B. cinerea</i> S y <i>B. pseudocinerea</i>	17
Tabla 6: Primers para la detección de los elementos transponibles Boty y Flipper.	18
Tabla 7: Programación del termociclador para la amplificación del transposón Boty	18
Tabla 8: Programación del termociclador para la amplificación del transposón Flipper	19
Tabla 9: Cebadores para la amplificación de regiones del gen MAT1	19
Tabla 10: Programación del termociclador para la amplificación del gen MAT1-1	20
Tabla 11: Programación del termociclador para la amplificación del gen MAT1-2	20
Tabla 12: Aislamientos del Complejo <i>Botrytis cinerea</i> obtenidos de flores y frutos de diferentes variedades de arándanos procedentes del Proyecto especial Chavimochic, La Libertad- Perú	22
Tabla 13: Caracterización Cultural de aislamientos provenientes de flores y frutos de arándanos ...	23
Tabla 14. Mediciones de las estructuras microscópicas de los veintinueve aislamientos identificados morfológicamente como <i>Botrytis cinerea</i>	31
Tabla 15. Análisis cuantitativo y cualitativo de extracción de ADN mediante espectrofotometría ...	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación espacial de las parcelas productoras de arándanos muestreados en la región Chavimochic-2019.	21
Figura 2. Frecuencia de aislamientos según su tipo morfológico	25
Figura 3. Frecuencia de veintinueve aislamientos recuperados de flores y frutos de arándano según el subtipo morfológico	26
Figura 4. Porcentaje de aislamientos de los aislamientos de <i>B.cinerea</i> recuperados de Chavimochic según el nivel de esporulación.....	27
Figura 5. Porcentaje de aislamientos de <i>B.cinerea</i> recuperados de flores y frutos de arándanos provenientes de la región Chavimochic según su capacidad formadora de esclerocios. (Cfe).....	28
Figura 6. Colonia de micelio gris propia de <i>Botrytis cinerea</i>	29
Figura 7. Características de las estructuras microscópicas de los aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i>	30
Figura 8. Características de las estructuras macroscópicas de los aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> . A: Esclerocio de superficie rugosa; B: Esclerocio de superficie lisa.	32
Figura 9. Crecimiento micelial promedio de los aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> a diferentes temperaturas.	33
Figura 10. Análisis cuantitativo y cualitativo de extracción de ADN mediante espectrofotometría.	34
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR amplificados con el primer C729+/- de aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> . (1 al 75: aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> , 700 pb, leader (M), control (C)).	36
Figura 12. Diferenciación basada en PCR de <i>B. pseudocinerea</i> y genotipos de <i>B. cinerea</i> . Los tamaños de los amplicones producidos por los primers propuestos por Plesken <i>et al.</i> , (2015) para todos los aislamientos correspondieron a <i>B. cinerea</i> (B) y a los genotipos S y N (A).	37
Figura 13. Porcentaje de aislamientos pertenecientes a las subpoblaciones N y S de <i>Botrytis cinerea</i> provenientes de flores y frutos de arándanos.	38
Figura 14. Porcentaje según la correspondencia genotípica basada en la presencia de elementos transponibles de aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> recuperados de flores y frutos de arándanos.	38
Figura 15. Porcentaje según el grupo de apareamiento sexual de aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> recuperados de flores y frutos de arándanos.	40

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Colonias de aislamientos <i>B. cinerea</i> recuperados de flores y frutos de arándanos.....	54
Anexo 2: Anva del crecimiento del diámetro de aislamientos de <i>B. cinerea</i> a diferentes temperaturas (5, 15, 20, 25 y 28°C).....	59
Anexo 3: Prueba Tukey del Crecimiento del diámetro de aislamientos de <i>B. cinerea</i> procedentes de cultivos de arándanos de Chavimochic.	59
Anexo 4. Secuencias obtenidas del NCBI para la elaboración del árbol Filogenético y secuencias de las regiones interna transcrita (ITS) de los aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i>	61

RESUMEN

Botrytis cinerea es un patógeno de plantas necrotrófico que daña a diversos cultivos alrededor del mundo. En el Perú, el arándano es uno de los cultivos más afectados por este patógeno tanto en campo como en postcosecha. Veintinueve aislamientos monospóricos fueron recuperados de flores y frutos de arándanos de diferentes campos ubicados en Chavimochic. Todos los aislamientos fueron identificados como *Botrytis cinerea* en base a criterios morfológicos y moleculares. Las medidas del diámetro mayor de las conidias de los aislamientos fueron en promedio de $9.29 \pm 1.81 \mu\text{m}$ y del diámetro menor de $6.34 \pm 1.05 \mu\text{m}$. Los aislamientos después de tres semanas mantenidos a 20°C fueron agrupados en ocho distintos tipos morfológicos, cuatro miceliales y cuatro esclerociales. La mayoría de estos fueron del tipo esclerocial (79.3%) siendo el de mayor frecuencia el tipo S3 (58.6%), mientras que el menos frecuente fue el tipo micelial M3 (3.4%). El análisis de varianza demostró que existe diferencia en las tasas de crecimiento a distintas temperaturas (5, 15, 20, 25 y 28°C) siendo las temperaturas óptimas de crecimiento 20 y 25°C con 23.38 y 22.92 mm/día, respectivamente. El primer C729+/- específico para *B. cinerea* amplificó una banda de 700pb para en todos los aislamientos identificándolos como pertenecientes a la especie *B. cinerea*, corroborando así la identificación morfológica. Se reconocieron dos genotipos entre los aislamientos de *B. cinerea*, basados en la presencia de transposones Boty y Flipper, el tipo Transposa (72%) y el tipo Boty (28%). Todos los aislamientos fueron heterotálicos, el 52% de los aislamientos pertenecían al grupo MAT1-1 y el 48% restante a MAT1-2. Finalmente, se detectó la presencia de la subpoblación S de *B. cinerea*, que predominó en los campos de arándanos muestreados con un 62% de frecuencia, mientras que la subpoblación N se presentó en un 38%.

Palabras clave: Grupos de apareamiento, genotipo S, *boty*, *flipper*.

ABSTRACT

Botrytis cinerea is a necrotrophic plant pathogen that damages various crops around the world. In Peru, blueberries are one of the crops most affected by this pathogen both in the field and post-harvest. Twenty-nine monosporic isolates were recovered from blueberry flowers and fruits from different fields located in Chavimochic. All isolates were identified as *Botrytis cinerea* based on morphological and molecular criteria. The measurements of the largest diameter of the conidia of the isolates were on average $9.29 \pm 1.81 \mu\text{m}$ and of the smallest diameter $6.34 \pm 1.05 \mu\text{m}$. Isolates after three weeks kept at 20°C were grouped into eight different morphological types, four mycelial and four sclerotial. Most of these were of the sclerotial type (79.3%), being the most frequent type S3 (58.6%), while the least frequent was the mycelial type M3 (3.4%). The analysis of variance showed that there is a difference in growth rates at different temperatures (5, 15, 20, 25 and 28°C), with the optimum growth temperatures being 20 and 25°C with 23.38 and 22.92 mm/day, respectively. The first C729+/- specific for *B. cinerea* amplified a 700pb band for all isolates, identifying them as belonging to the species *B. cinerea*, thus corroborating the morphological identification. Two genotypes were recognized among *B. cinerea* isolates, based on the presence of Boty and Flipper transposons, Transposa-type (72%) and Boty-type (28%). All the isolates were heterothallic, 52% of the isolates belonged to the MAT1-1 group and the remaining 48% to MAT1-2. Finally, the presence of the S subpopulation of *B. cinerea* was detected, which predominated in the sampled blueberry fields with a 62% frequency, while the N subpopulation was present in 38%.

Keys word: Mating groups, genotype S, *boty*, *flipper*.

I. INTRODUCCIÓN

El arándano es un arbusto originario del hemisferio norte, de las zonas montañosas de los EEUU y Canadá. Comprende muchas especies del género *Vaccinium* siendo *Vaccinium corymbosum*, el de mayor importancia para la producción de fruta. Los principales países productores de este fruto son Sudáfrica, Perú, Chile, España y México (Medina y Sánchez, 2014; García *et al.*, 2018; Posada, 2019).

Actualmente, el Perú se coloca como el primer proveedor de arándanos a nivel internacional con exportaciones que alcanzaron los US\$ 810 millones para el año 2019, según Vega (2020), teniendo como principales regiones productoras a La Libertad, Lambayeque, Ica y Lima (Posada, 2019). Esto debido a la alta rentabilidad para los productores, que sumado a la gran cantidad de mano de obra que demanda promueve el desarrollo de las regiones productoras.

Por otro lado, diversos factores como el fitosanitario dificultan el manejo de este cultivo. Una de los principales problemas es ocasionado por *Botrytis cinerea* causante de la pudrición gris del arándano. Muchos cultivos de gran relevancia económica se han visto afectados por esta enfermedad que ocasiona grandes pérdidas tanto en campo como en post-cosecha (Weber y Hahn, 2011; Saito *et al.*, 2014; Rupp *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2019).

El agente causal de esta pudrición, *Botrytis cinerea*, se encuentra en la naturaleza como saprófago y/o patógeno de una amplia gama de plantas. Su gran variabilidad le ha permitido adaptarse a diversas condiciones ambientales. Esta variabilidad se manifiesta según Kumari *et al.* (2014) en su inestabilidad fenotípica, ploidía, morfología, patogenicidad y polimorfismo del ADN. *B. cinerea* es una especie heterotálica compuesta por dos grupos de apareamientos, y si bien la reproducción sexual como fuente de variabilidad es cuestionada por la rara presencia de cuerpos frutíferos en la naturaleza, estudios a nivel poblacional y la observación de frecuencias similares de los alelos MAT1-1 y MAT1-2 demuestran que la reproducción sexual ocurre con regularidad (Plesken *et al.*, 2015).

La presencia de los elementos transponibles Boty y Flipper en aislamientos de *B. cinerea*, han permitido diferenciar cuatro genotipos distintos (Transposa, Boty, Flipper y Vacuma) que según estudios están relacionados con la virulencia y el desarrollo fenológico del patógeno (Zhang *et al.*, 2018). Por otro lado, *B. cinerea* forma parte del Complejo *Botrytis cinerea* conformado por dos especies crípticas, *B. cinerea* y *B. pseudocinerea*, que se encuentran cohabitando y son incompatibles sexualmente (Walker *et al.*, 2011). Recientemente, sea identificado la existencia de grupos genotípicamente distintos dentro de *B. cinerea*, denominados subpoblación N y S, los cuales se enriquecen de resistencia a fungicidas de manera diferencial (Leroch *et al.*, 2012; Plesken *et al.*, 2015; Rupp *et al.*, 2017). Finalmente, existen pocos estudios relacionados al Complejo *Botrytis cinerea* que se encuentran afectando a los cultivos de arándanos en el Perú. Por tal motivo, esta investigación tiene los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar morfológica y genéticamente aislamientos de *Botrytis cinerea* obtenidos de flores y frutos de arándanos provenientes de la región La Libertad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente los aislamientos de *Botrytis cinerea*.
- Caracterizar genotípicamente los aislamientos de *Botrytis cinerea*.
- Evaluar la patogenicidad de *Botrytis cinerea* según los postulados de Koch.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ARÁNDANO

2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Cronquist (1981) clasifica al arándano de la siguiente manera:

- Reino: Plantae
- División: Pterophytas
- Clase: Dicotiledónea
- Orden: Ericales
- Familia: Ericaceae
- Género: *Vaccinium*
- Especie: *Vaccinium corymbosum* L.

Por otro lado, García *et al.* (2018) señalan que el arándano comprende muchas especies del género *Vaccinium*, siendo *Vaccinium corymbosum* L. la de mayor interés comercial para la producción de frutas.

2.1.2. DESCRIPCIÓN DEL ARÁNDANO

El arándano es un arbusto erecto o rastrero, cuya altura varía dependiendo la especie (0.3 a 7.0 m). Posee un sistema radicular superficial, de raíces finas y fibrosas, sin pelos absorbentes. Las hojas son simples, dispuestas de forma alternada, de forma elíptico-lanceolada y ligeramente dentada. Las inflorescencias son tipo racimos, terminales o axilares, con flores de sépalos persistentes y corola acampanada formada por 4 a 5 pétalos fusionados. Las flores poseen de 8 a 10 estambres y un pistilo simple de ovario ínfero de 4 a 10 lóculos. El fruto es una falsa baya que adquiere un color de tono azul al finalizar la maduración, presentando secreciones cerosas en su superficie (García *et al.*, 2018).

2.2. *Botrytis cinerea*

El género *Botrytis* comprende alrededor de 35 especies, todas menos *B. deweyae* de comportamiento necrotrófico (Valero-Jiménez *et al.*, 2019). La gran mayoría posee un limitado rango de hospedantes, afectando plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Son alrededor de 1400 especies de plantas que se ven afectadas por diversas especies de este género, generando grandes pérdidas económicas en varios cultivos hortícolas y florales, siendo *B. cinerea*, el de mayor importancia (Dewey y Grant-Downton, 2015; Valero-Jiménez *et al.*, 2019).

Botrytis cinerea o moho gris es un cosmopolita de amplio rango de hospedantes. Se estima que esta especie de *Botrytis* ataca alrededor de 1000 especies de plantas conocidas (Rupp *et al.*, 2017). Es considerado uno de los hongos más perjudiciales a nivel mundial por los daños que produce en diversos órganos como flores, hojas, tallos, frutas y otras partes de cultivos de gran importancia económica como la vid, el arándano, tomate y fresa (Ellis, 1971, Saito *et al.*, 2014; Rupp *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2019)

2.2.1. TAXONOMÍA

Según Espinosa (2006), *Botrytis cinerea* es el estado conidial de la forma sexual denominada *Botrytinia fuckeliana* (telomorfo). Jarvis (1977) menciona que en la taxonomía de Discomycetos, Botrytinia se encuentra dentro del orden Helotiales y la familia Sclerotiaceae, mientras que *Botrytis* es colocado en la familia Botrytidaceae de los Hyphomycetes.

2.2.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Según Hennebert (1973) y Jarvis (1977, 1980), las especies de *Botrytis* se han delimitado principalmente en base a características morfológicas y culturales, junto con la especificidad del hospedante. Ellis (1971) basándose en características macroscópica señala que las colonias de *Botrytis cinerea* poseen colores que van desde gris a marrón grisáceo. Y que la producción de esclerocios en sustrato natural y cultivo son de formas y tamaños variable, reportando cepas con abundante producción de esclerocios y otras con ausencia de estos. Estas diferencias culturales existentes entre cepas de *Botrytis cinerea* fueron evaluadas por Martínez *et al.* (2003) utilizando los siguientes criterios: aspecto micelial, esporulación, y

capacidad formadora de esclerocios, observando dos clases de *Botrytis cinerea*, el tipo micelial y el tipo esclerocial, definidas en base al predominio de alguna de estas estructuras.

Microscópicamente, Ellis (1971) caracteriza a *B. cinerea* por tener conidióforos de 2 mm o más largo, 16-30u de grosor, ramificado. Conidias elipsoidales u obovoides, a menudo con un hilio ligeramente protuberante, incoloro a marrón pálido, liso, 6-18 x 4-11 μ (principalmente de 8-14 x 6-9) [relación l / b 1.35-1.5]. Beever y Weeds (2004) mencionan que las características del tamaño de los esclerocios, la forma y método de unión de las conidias a los conidióforos también son útiles para delimitar algunas especies de *Botrytis*.

2.2.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

Staats *et al.* (2004) establecieron que el género *Botrytis* comprende dos clados, basados en el estudio filogenético de tres genes nucleares (G3PDH, RPB2 y HSP6) de proteínas relacionadas con el metabolismo celular básico y con bajas tasas evolutivas. El clado I es conformado por especies de *Botrytis* que afectan principalmente a dicotiledóneas (*B. cinerea*, *B. fabae*, *B. pseudocinerea*, *B. californica*, entre otras especies); mientras que en el clado II se encuentran especies que atacan principalmente a plantas monocotiledóneas, pudiendo algunas de estas afectar a dicotiledóneas (Staats *et al.*, 2004; Dewey y Grant-Downton, 2016; Garfinkel *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2019).

Fournier *et al.* (2002) con el uso de técnicas de PCR-RFLP para caracterizar el gen Bc-Hch, reconocieron una nueva estructura poblacional dentro de *Botrytis cinerea* compuesta por el Grupo I y Grupo II, los cuales no tendrían posibilidad de intercambio genético entre ambos. Walker *et al.* (2011) plantearon que el Grupo I correspondería a una nueva especie, denominada *B. pseudocinerea*, y que el Grupo II a *Botrytis cinerea*. Así mismo, Rigotti *et al.* (2002), a partir de la región IGS desarrollaron un par de primers específicos para *B. cinerea* que permitió detectar molecularmente este patógeno con mucha facilidad.

En los últimos años se han ido describiendo nuevas especies ubicándose muchas de ellas en Grupo I como es el caso de *Botrytis calthae* (Plesken *et al.*, 2015), *B. sinoviticola* (Zhou *et al.*, 2014), *B. californica* (Saito *et al.*, 2016) y *B. medusae* (Harper *et al.*, 2019).

Según Plesken *et al.* (2015), *B. cinerea* presenta una amplia variabilidad fenotípica en cuanto crecimiento micelial, conidación y formación de esclerocio. Esta alta variabilidad también

se observa a nivel genético; Giraud *et al.* (1997) así lo demuestran, al diferenciar grupos genéticamente diferentes basándose en la presencia o ausencia de elementos transponibles Boty y Flipper (Boty es un retrotransposón de repetición terminal larga (LTR); mientras que Flipper es un transposón identificado en una región que codifica el gen para el nitrato reductasa con características perfectas de repeticiones terminales invertidas (Aguirre, 2015)). Aquellos aislamientos de *Botrytis cinerea* que presentan ambos elementos se denominaron Genotipo Transposa, y aquellos que no poseían ninguno, Genotipo Vacuma. Posteriormente, se detectó la presencia de aislamientos del *Botrytis cinerea* que sólo portaban uno de estos elementos denominándose Genotipo Boty y Genotipo Flipper, en referencia al elemento transponible presente (Muñoz *et al.*, 2002; Giraud *et al.*, 1999). Según estudios, los elementos transponibles están relacionados con la virulencia y la fenología del patógeno (Zhang *et al.*, 2018). Por otro lado, existencia de grupos de apareamiento en *Botrytis cinerea* fue demostrados por Hennebert y Groves (1963), según Faretra *et al.* (1988). La presencia de uno de los dos genes de apareamiento, MAT1-1 y MAT1-2, determina el grupo de apareamiento; teniendo la capacidad de recombinarse sexualmente aquellos aislamientos con distintos genes de apareamiento. Faretra *et al.* (1998) encontraron que alrededor del 6% de la progenie de ascosporas y el 16% de aislamientos de campo eran homotálicos, es decir poseían ambos genes tanto MAT1-1 como MAT1-2, mientras que el resto eran heterotálicos (MAT1-1 o MAT1-2).

La ausencia de fungicidas de acción multisitios y la utilización de fungicidas de un solo sitio de acción sin conocimiento de las poblaciones de *Botrytis* y de la gran variabilidad que poseen debido a su capacidad para poder recombinar su material genético, han generado variantes resistentes. En Alemania se ha reportado mediante técnicas moleculares de una variante de *Botrytis cinerea*, denominada *B. cinerea* - S, cuyas cepas mostraron una mayor frecuencia de resistencia a una amplia gama de fungicidas con diferentes ingredientes activos que el genotipo normal de *B. cinerea* (*B. cinerea* - N) (Leroch *et al.* 2012, Rupp *et al.* 2017).

2.2.4. CONDICIONES FAVORABLES PARA EL DESARROLLO DE *Botrytis cinerea*

Según Elad *et al.* (2007), la rápida tasa de germinación de sus conidias, crecimiento micelial y conidación, bajo una amplia gama de condiciones microclimáticas generan problemas de

manejo para esta enfermedad. La alta humedad del medio es el factor de mayor importancia para el éxito de la infección; debido a que promueve la germinación de las conidias en la superficie del tejido vegetal susceptible, independientemente de la presencia de una película de agua. Por otro lado, Harper *et al.* (2019) observaron que el micelio de *B. cinerea* se encuentra activo a temperaturas que van desde 0 a 30°C, siendo el óptimo de crecimiento entre 20-25°.

2.2.5. CICLO DE LA ENFERMEDAD DE *Botrytis cinerea*

Los esclerocios son la principal estructura de conservación del moho gris que le permiten sobrevivir a condiciones desfavorables para su desarrollo (Elad *et al.*, 2007). Pueden formar micelio o conidióforos; estos últimos producen conidias que son diseminadas principalmente por el viento (Gómez, 2013). Las conidias que caen en partes de plantas susceptibles se hidratan y adhieren a la superficie del tejido (Dewey y Grant-Downton, 2016); éstos germinan dependiendo de condiciones favorables de humedad y temperatura, la presencia de exudados en la cutícula, y la edad del tejido. Una vez realizada la germinación de la conidia se produce la penetración, ingresando por aberturas naturales o directamente mediante la secreción de enzimas. Invade el tejido subepidermal, inter e intracelularmente produciendo la infección, colonización y maceración de los tejidos circundantes. Finalmente, se produce la esporulación en la superficie del tejido afectado diseminándose e iniciando nuevos ciclos de infección (Gómez, 2013).

III. MATERIALES Y METÓDOS

3.1. UBICACIÓN

El estudio se realizó en el laboratorio de Cultivo de tejidos del departamento de Fitopatología y de la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología de la UNALM.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. COLECTA DE MUESTRA

Flores y frutos de arándanos con síntomas y signos característicos del patógeno fueron colectados de campos productores de arándanos ubicados en la irrigación Chavimochic perteneciente al departamento de La Libertad (Proyecto Especial Chavimochic).

3.2.2. AISLAMIENTO

Las muestras colectadas se trasladaron en recipientes de polipropileno a la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología de la UNALM, y fueron colocadas dentro de cámaras húmedas para favorecer la esporulación de *Botrytis* sp. sobre el tejido infectado. Luego, mediante el uso de estiletes se extrajeron conidias y/o fragmentos de micelio de *Botrytis* spp. que fueron sembrados en placas de Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) más tetraciclina e incubados a 25°C de temperatura. Los cultivos fueron evaluados diariamente de manera macroscópica para detectar la presencia de colonias de micelio gris propias de *Botrytis cinerea* (Gómez, 2013). Posteriormente, estas colonias fueron repicadas en placas nuevas de PDA sin tetraciclina para obtener aislamientos puros.

3.2.3. CULTIVO MONOSPÓRICO

Los aislamientos puros fueron repicados sobre medio PDA e incubados a 25°C en oscuridad por 3 días; luego de los cuales, fueron puestos a condiciones ambientales de temperatura y luz para promover la esporulación. Posteriormente, una porción de 0.5 cm² de tejido en esporulación de cada aislamiento se introdujeron de manera individual en tubos con 10 ml agua destilada estéril; y que con la ayuda de un vortex se les agito por 1 minuto. Las suspensiones de conidias obtenidas fueron llevadas a concentraciones, tales que, por campo visual de 10X se encontraran de 10 a 20 conidios. Luego, 15 µl de suspensión de conidias de cada aislamiento se vertieron sobre medio agar agua al 3% (3g agar / L) y con una espátula de Drigalski se esparció sobre toda la superficie, tal como lo descrito por French y Hebert (1980). Después de 24 horas, las conidias germinadas fueron repicadas en medio PDA con la ayuda de un estereoscopio obteniendo cultivos provenientes de una sola conidia.

3.2.4. CONSERVACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Botrytis cinerea*

La metodología empleada fue la propuesta por Castellani (1963) para mantener diferentes tipos de hongos y bacterias por al menos dos años. Para ello, fue necesario cultivos monospóricos de los aislamientos colectados con tres a cuatro días de crecimiento en medio PDA; a partir de los cuales se obtuvieron con la ayuda de un sacabocado tres discos de micelio de 0.5 mm de diámetro, los mismos que fueron introducidos con la ayuda de una espátula dentro de tubos criogénicos de tapa rosca con 1.5 ml de agua destilada estéril. Finalmente, los tubos criogénicos fueron sellados con parafilm para evitar contaminación con organismos externos y puestos en conservación a 5 °C.

3.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CULTURAL DE AISLAMIENTOS

Se realizó a partir de colonias cultivadas sobre medio PDA obtenidos por repique de discos de micelio de 4 mm diámetros cortados con sacabocado estéril de márgenes de colonias de dos días, mantenidos en medio PDA a 25°C (Harper *et al.*, 2019).

3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE CULTURAL

Se realizó en colonias cultivadas sobre medio PDA mantenidas a oscuridad continua y 20°C. Se emplearon tres repeticiones por aislamiento correspondiendo cada una de éstas a una placa de Petri (Copier, 2003). Las evaluaciones se llevaron al cabo de 21 días empleando los criterios de aspecto micelial, esporulación y capacidad formadora de esclerocios, propuestos por Martínez *et al.* (2003) y Esterio (2005) (Tabla 1).

De acuerdo a su aspecto micelial y capacidad formadora de esclerocios, los aislamientos fueron clasificados en clases morfológicas, micelial y esclerocial respectivamente. La esporulación se estimó de manera visual estableciendo cuatro niveles de 0 a 3, donde 0 indicó ausencia de esporulación y 3 una abundante esporulación, según lo propuesto por Martínez *et al.* (2003).

Tabla 1: Escalas de evaluación de la caracterización cultural de los aislados de *B. cinerea*

Parámetros analizados	Escalas de Evaluación (Niveles)				
1° Clasificación morfológica	Micelial	M-I Micelio corto	M-II Micelio suelto	M-III Crecimiento en masa	M-IV Micelio grueso y lanudo
	Esclerocial	S-1 Esclerocios formados en borde de placa de Petri	S-II Esclerocios grandes dispuestos radialmente en placa de Petri	S-III Esclerocios grandes distribuidos irregularmente en placa de Petri	S-IV Esclerocios numerosos y pequeños desuniformemente distribuidos
2° Nivel de esporulación (E)		E-0 Ausencia de esporulación (0% E)	E-2 Esporulación escasa (1-10% E)	E-3 Esporulación débil (10% < E < 50%)	E-4 Esporulación profusa abundantes (E > 50%)
		Cfe-0 Ausencia de esclerocios	Cfe-1 Escasa producción de esclerocios (1 a 15 / placa de Petri)	Cfe-2 Moderada producción de esclerocios (> 15 a 30 / placa de Petri)	Cfe-3 Alta producción de esclerocios (> 30 / placa de Petri)

Nota. Adaptado de “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” por Copier (2013), Tesis para optar al título profesional de Ingeniera agrónoma y al grado de Magíster en ciencias agropecuarias con mención sanidad vegetal. Universidad de Chile.

3.3.2. TASAS DE CRECIMIENTO

Las tasas de crecimiento de los aislados se realizaron en medio PDA a 5, 15, 20, 25 y 28 ° C, empleando tres repeticiones de cada aislamiento por tratamiento de temperatura. Las tasas de crecimiento se calcularon dividiendo la medida promedio de los diámetros horizontal y vertical máximos alcanzados sobre el tiempo en días transcurrido desde la fecha de siembra, siguiendo lo descrito por French y Hebert (1980). Para comparar las tasas de crecimiento micelar entre los aislamientos y los tratamientos de temperatura se aplicó un análisis de variancia de dos factores (temperatura y aislamientos) con cuatro repeticiones.

3.3.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Características como el tamaño de los esclerocios y de conidios de los aislamientos fueron medidos con la ayuda de un microscopio Leica y un estereoscopio. Los datos morfológicos fueron corroborados con la clave de Ellis (1971), las revisiones realizadas por Jarvis (1977), Beever y Weeds (2004) y otras investigaciones.

3.3.4. EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD

Se evaluó la patogenicidad de seis aislamientos en fruto de arándano siguiendo la una metodología descrita por Saito *et al.* (2014) con ciertas modificaciones. Para ello, frutos de arándanos fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante dos minutos y enjuagados en agua destilada estéril. La inoculación de los aislamientos se realizó colocando 10 µl de suspensión conidial ($1,0 \times 10^5$ esporas / ml) en la zona proximal de los frutos; mientras que para el control solo se aplicó 10 µl de agua destilada estéril. Se inocularon siete frutos por aislamientos; los cuales fueron puestos sobre placas de Petri colocadas a su vez dentro de cámaras húmedas (táperes con papel toallas humedecidas con agua estéril). Las evaluaciones se realizaron diariamente registrando el número de bayas con presencia de síntomas y signos del patógeno. Finalmente, una vez terminado el ensayo se procedió a corroborar la presencia del patógeno observando la presencia de sus estructuras de propagación y diseccionar los frutos para observar el daño producido.

3.4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLAMIENTOS DE *B. cinerea*

3.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de aislamientos monospóricos reactivados en medio PDA y con tres días de incubación a 25°C. Se empleó la metodología basada en la propuesta de Saitoh *et al.* (2006) modificada por la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología de la UNALM, y cuyo protocolo se describe a continuación:

A partir de cultivos monospóricos de cada aislamiento, se tomaron porciones de micelio de crecimiento activo (0.5 cm²) que fueron depositados en tubos de 1.5 ml, a los cuales se les añadió 500ml de buffer de extracción y con el uso de un pistilo se procedió a triturar por un periodo de 10 minutos; luego se le añadió 300 µl de fenol: cloroformo: isoamil alcohol (25: 24: 1= v: v: v) y se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm; se extrajo el sobrenadante y se depositó en otro tubo de limpio al que se le añadió 400 µl de 2- propanol; el siguiente paso fue refrigerar la mezcla a -20°C por 15 minutos y después centrifugarla por 10 minutos a 12000 rpm; paso seguido se retiró el sobrenadante quedando en la base el pellet de ADN, al cual se le realizó un lavado con 1 ml de alcohol etanol al 70% y se centrifugó por 5 minutos a 12000rpm; culminado el tiempo se eliminó el etanol y se dejó secar al vacío. Finalmente, el ADN fue diluido en 30 µl de agua ultrapura y preservado a -30°C.

3.4.2. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se realizó mediante espectrofotometría usando un nanodrop para medir la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 260 nm. Una vez estimada la concentración de ADN, esta fue ajustada a 50 ng/µl con agua ultrapura para su posterior uso.

3.4.3. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES DEL ESPACIO TRANSCRITO INTERNO (ITS)

Se emplearon los primers, ITS1 (5'TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC3') (White *et al.*, 1990) e ITS4 (5'GAA-GGT-GAA-GTC-GTA-ACA-AGG3') (Cooke y Duncan, 1997), para amplificar las regiones ITS de los aislamientos de *B. cinerea* (Aktaruzzaman *et al.*, 2017; Terrones-Salgado *et al.*, 2019). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron de acuerdo al protocolo de Aime (2006) con algunas modificaciones. El master mix se preparó en volúmenes de reacción de 25 µl con 5 µl de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 2 µl de 25mM Magnesium Chloride Solution (Promega), 0.5 µl de dinucleótidos trifosfatos 2,5mM, 0.5 µl de cada uno de los cebadores a 20 µM (Forward y Reverse), 0.125 µl de Mix GoTaq®Flexi DNA Polymerase (Promega) y 1 µl de ADN en concentración de 85-105 ng/ µl. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Thermo Scientific) con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial de 94 ° C durante 2 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 98 ° C durante 1 min, hibridación a 58 ° C durante 1 min (Aktaruzzaman *et al.*, 2017) durante 1 min, y extensión a 72 ° C durante 1.5 min; y una extensión final a 72 ° C durante 5 min.

Tabla 2: Programación del termociclador para la PCR con los primers ITS1 e ITS4

Inicial	35 Ciclos			Final
	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
94 °C	98 °C	58 °C	72 °C	72 °C
2 minutos	10 segundos	1 minuto	1 minuto	5 minutos
1X		35X		1X

3.4.4. DIFERENCIACIÓN DE *Botrytis* spp. Y GRUPOS DE *Botrytis cinerea* BASADOS EN PCR

Se realizó siguiendo la metodología propuesta por Plesken *et al.* (2015).

Para diferenciar *Botrytis cinerea* y *Botrytis pseudocinerea* de *B. fabae* y otras especies de *Botrytis* del clado 1, se utilizaron los cebadores específicos desarrollados por Rigotti *et al.* (2002) para amplificar una región del ADN detectando una delección específica de 122-bp en *B. fabae* y la no amplificación para otras especies de *Botrytis* (Tabla 3).

Para la diferenciación entre los aislamientos de *B. cinerea* N, *B. cinerea* S y *B. pseudocinerea*, se amplificó el ADN con los cebadores BcinN-in-F / BcinN-in-R que detecta un indel de 18 pb en *B. cinerea* S y *B. pseudocinerea*, Mrr1 -spez-F / Mrr1-spez-R que detecta un indel de 21 pb en *B. cinerea* S, y g2944_137_F / g2944_273_R que detectara una delección específica de 24 pb en *B. pseudocinerea*. (Tabla 5).

Por otro lado, la master mix para la amplificación de los genes correspondientes a la Tabla 5 se preparó en volúmenes de reacción de 25 µl con 5 µl de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 µl de 25mM Magnesium Chloride Solution (Promega), 0.5 µl de dinucleótidos trifosfatos 2,5mM, 0.5 µl de cada uno de los primers a 20 µM (Forward y Reverse), 0.2 µl de Mix GoTaq®Flexi DNA Polymerase (Promega) y 1 µl de ADN en concentración de 50 ng/ µl.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Thermo Scientific) con los parámetros mencionados en la Tabla 3 y 4

Tabla 3: Programación del termociclador para la PCR con los primers C279+/-

Inicial	35 ciclos			Final
	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
95 °C	94 °C	54 °C	72 °C	72 °C
3 minutos	20 segundos	20 segundos	30 segundos	5 minutos
1X		35X		1X

Tabla 4: Programación del termociclador para la PCR con los primers BcinN-in-F / BcinN-in-R, Mrr1 -spez-F / Mrr1-spez-R, y g2944_137_F / g2944_273_R

Inicial	40 Ciclos			Final
	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
3 minutos	30 segundos	30 segundos	20 segundos	5 minutos
1X		40X		1X

Tabla 5: Primers utilizados para la diferenciación de *B. cinerea* N, *B. cinerea* S y *B. pseudocinerea*

Gen	Primer	Secuencias (5'->3')	tamaño de producto	Referencias
mrr1	BcinN-in-F	GCGACCTCATCGTTCTTTCAC	182 -200 bp	Plesken <i>et al.</i> (2015)
	BcinN-in-R	CGCTCTCGATGAGCTGTTTC		
mrr1	Mrr1-spez-F	TATCGGTCTTGAGTCCGC	144 - 165 bp	Leroch <i>et al.</i> (2012)
	Mrr1-spez-R	TTCCGTACCCCGATCTTCGGAA		
Bc1G_07159	g2944_137_F	GCAGATGAGGCGGATGATAG	112 - 136 bp	Plesken <i>et al.</i> (2015)
	g2944_273_R	TCCACCCAAAGCATCATCTTC		
Bc1G_06014	C729+	AGCTCGAGAGAGATCTCTGA	700 bp	Rigotti <i>et al.</i> (2002)
	C729-	CTGCAATGTTCTGCGTGGAA		

3.4.5. CORRESPONDENCIA GENOTÍPICA BASADO EN LA DETECCIÓN DE TRANSPOSONES

Se detectaron los elementos transponibles Boty y Flipper en genomas de aislamientos obtenidos, mediante el uso de los pares de cebadores F300/ F1550 (Levis *et al.*, 1997) y Boty-F / R (Muñoz *et al.*, 2010) respectivamente (Cuadro 4), siguiendo lo descrito por Zhang *et al.* (2018) (Anexo 6). La master mix para la amplificación de los genes correspondientes a Tabla 6 se preparó en volúmenes de reacción de 25 µl con 5 µl de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 µl de 25mM Magnesium Chloride Solution (Promega), 0.5 µl de dinucleótidos trifosfatos 2,5mM, 0.5 µl de cada uno de los primers a 20 µM (Forward y Reverse), 0.2 µl de Mix GoTaq®Flexi DNA Polymerase (Promega) y 1 µl de ADN en concentración de 50 ng/ µl. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Thermo Scientific) con los parámetros de la Tabla 7 y 8.

Los aislamientos fueron diferenciados en cuatro genotipos (Vacuma, Transposa, Flipper o Boty) en función a la presencia o ausencia de los elementos transponibles Boty y Flipper, según lo descrito por Giraud *et al.* (1997).

Tabla 6: Primers para la detección de los elementos transponibles Boty y Flipper.

Gen	Primer	Secuencias (5'->3')	Tamaño de producto	Referencias
Flipper	F300	GCACAAAACCTACAGAAG A	1250bp	Levis <i>et al.</i> (1997)
	F1550	ATTCGTTTCTTGACTGTA		
Boty	Boty-F	TAACCTTGTCTTTGCTCATC	620bp	Muñoz <i>et al.</i> (2010)
	Boty-R	CCCAATTTATTCAATGTCAG		

Tabla 7: Programación del termociclador para la amplificación del transposón Boty

Inicial	Desnaturalización	40Ciclos		Final
		Hibridación	Extensión	
95 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C
3 minutos	40 segundos	40 segundos	1 minutos	10 minutos
1X		40X		1X

Tabla 8: Programación del termociclador para la amplificación del transposón Flipper

Inicial	40Ciclos			Final
	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
94 °C	95 °C	48 °C	72 °C	72 °C
5 minutos	30 segundos	30 segundos	1 minutos	15 minutos
1X		40X		1X

3.4.6. DETERMINACIÓN DEL TIPO DE APAREAMIENTO

Se utilizaron los primers desarrollados por van Kan *et al.* (2010) para determinar la presencia del gen MAT1-1 y MAT1-2 en cada uno de los aislamientos (Cuadro 5) (Anexo 7). Los aislamientos tipo MAT1-1 o tipo MAT1-2 (ambos heterotáticos) presentan solo uno de estos genes; mientras que los del tipo MAT1-1/2 (homotáticos) presentan ambos (Zhang *et al.* 2017). La master mix para la amplificación del gen correspondiente a los grupos de apareamientos disponibles en la Tabla 9 se preparó en volúmenes de reacción de 25 µl con 5 µl de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 µl de 25mM Magnesium Chloride Solution (Promega), 0.5 µl de dinucleótidos trifosfatos 2,5mM, 0.5 µl de cada uno de los primers a 20 µM (Forward y Reverse), 0.2 µl de Mix GoTaq®Flexi DNA Polymerase (Promega) y 1 µl de ADN en concentración de 50 ng/ µl. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Thermo Scientific) con los parámetros de las Tablas 10 y 11.

Tabla 9: Cebadores para la amplificación de regiones del gen MAT1

Gen	Primer	Secuencias (5'→3')	Tamaño de producto	Referencias
MAT1-1	MAT alpha5	ATGACGGCTCCCTTCAAAACC	1050 bp	van Kan <i>et al.</i> 2010
	MAT alpha3	GGTGGTGAAGGGACATCTTC		
MAT1-2	HMG5	ATGTCTCTCTCCTCTCTCCG	1100 bp	van Kan <i>et al.</i> 2010
	HMG3	GGAAAAGAATGTGTAGAGATCCT G		

Tabla 10: Programación del termociclador para la amplificación del gen MAT1-1

Inicial	32 Ciclos			Final
	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
94 °C	94 °C	58 °C	72 °C	72 °C
1 minutos	40 segundos	1 min 30 seg	1 minutos	10 minutos
1X		32X		1X

Tabla 11: Programación del termociclador para la amplificación del gen MAT1-2

Inicial	32 Ciclos			Final
	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
94 °C	94 °C	57 °C	72 °C	72 °C
1 minutos	40 segundos	1 min 30 seg	1 minutos	10 minutos
1X		32X		1X

3.4.7. SECUENCIACIÓN

Los productos de PCR obtenidos de la región ITS de cuatro aislamientos con diferentes perfiles genéticos fueron enviados y secuenciados al laboratorio Corea. Mediante el uso del programa MEGA versión 7 se analizó y editó la secuencia de las hebras forward y reverse con respecto al electroferograma correspondiente, para construir secuencias consenso. Las secuencias de ADN se compararon en el GenBank, entrando a la página del NCBI (National Center for Biotechnology Information), y seleccionando la opción BLAST. Finalmente, se utilizó nuevamente MEGA para la elaboración del árbol filogenético para la región ITS.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. AISLAMIENTO

Se recuperaron 29 aislamientos monospóricos pertenecientes al Complejo *Botrytis cinerea*, a partir de flores y frutos de diferentes variedades de arándanos cultivados en campos ubicados en el Proyecto especial Chavimochic (La Libertad); de los cuales, nueve aislamientos fueron recuperados de arándanos de la variedad Biloxi, seis de Roció, cuatro de Jewell, cuatro de BBP1, tres de Ventura, dos de BBP3 y uno de BBP2.

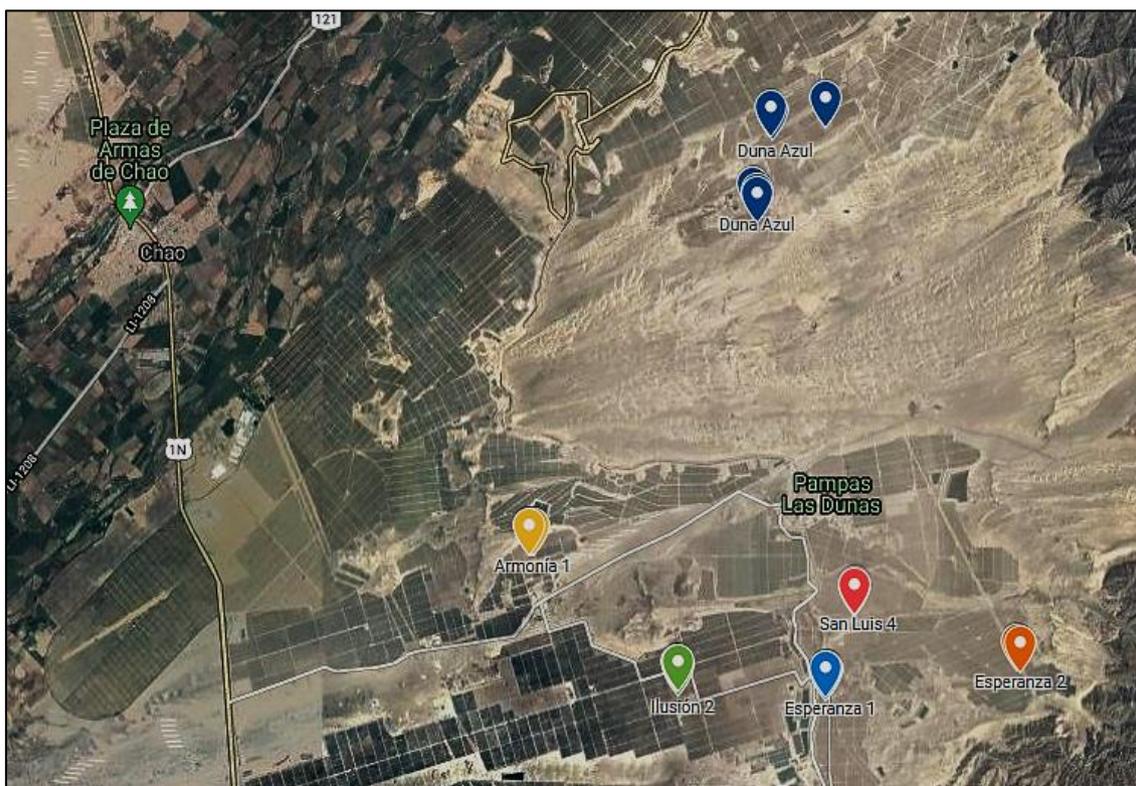


Figura 1. Ubicación espacial de las parcelas productoras de arándanos muestreados en la región Chavimochic-2019.

Tabla 12: Aislamientos del Complejo *Botrytis cinerea* obtenidos de flores y frutos de diferentes variedades de arándanos procedentes del Proyecto especial Chavimochic, La Libertad- Perú

Aislamiento	Parcela	Variedad	Coordenadas geográficas		
			Altura (msnm)	Longitud	Latitud
41	Esperanza 2	Rocío	429	-78.57913	-8.58664
42	Esperanza 2	Rocío	436	-78.57887	-8.58686
45	Esperanza 1	Rocío	265	-78.60063	-8.58950
47	Esperanza 1	Rocío	267	-78.60064	-8.58966
51	Esperanza 1	Rocío	265	-78.60079	-8.58980
52	Esperanza 1	Rocío	263	-78.60079	-8.58957
55	San Luis 4	Ventura	262	-78.59752	-8.58036
57	San Luis 4	Ventura	263	-78.59753	-8.58066
59	San Luis 4	Ventura	262	-78.59749	-8.58050
61	Ilusión 2	Jewell	190	-78.61746	-8.58932
64	Ilusión 2	Jewell	191	-78.61762	-8.58882
66	Ilusión 2	Jewell	190	-78.61756	-8.58875
69	Armonía 1	Biloxi	189	-78.63423	-8.57412
71	Armonía 1	Biloxi	165	-78.63405	-8.57406
72	Armonía 1	Biloxi	164	-78.63402	-8.57407
74	Armonía 1	Biloxi	163	-78.63378	-8.57405
75	Armonía 1	Biloxi	161	-78.63378	-8.57413
76	Armonía 1	Biloxi	159	-78.63422	-8.57403
77	Duna Azul	BBP1	157	-78.60684	-8.52901
84	Duna Azul	BBP1	414	-78.60697	-8.52873
86	Duna Azul	BBP1	479	-78.60091	-8.52764
89	Duna Azul	BBP2	479	-78.60901	-8.53700
91	Duna Azul	BBP3	478	-78.60863	-8.53782
92	Duna Azul	BBP3	488	-78.60854	-8.53805
#4	Duna Azul	Biloxis	488	-78.609	-8.53700
#3	Duna Azul	Biloxis	478	-78.609	-8.53700
#1	Duna Azul	Biloxis	479	-78.609	-8.53700
BI	Duna Azul	Biloxis	479	-78.609	-8.53700
BII	Duna Azul	Biloxis	479	-78.609	-8.53700

4.2. CARACTERIZACIÓN CULTURA Y MORFOLÓGICA DE AISLAMIENTOS

4.2.1. CARACTERIZACIÓN CULTURAL

Las colonias de los aislamientos desarrolladas en medio PDA a 20°C por 21 días a oscuridad continua mostraron diferentes características culturales. Se observó una gran variabilidad en cuanto al aspecto del micelio, el nivel de esporulación y, la distribución y producción de esclerocios (Tabla 13). Este hallazgo coincide con los resultados obtenidos en otras investigaciones con diferentes hospedadoras (Martínez *et al.*, 2003; Mirzaei *et al.*, 2008; Gaber *et al.*, 2019; Gül y Karakaya, 2020).

Tabla 13: Caracterización Cultural de aislamientos provenientes de flores y frutos de arándanos

Aislamiento	Tipo morfológico	Clasificación morfológica	Nivel de esporulación	Capacidad formadora de esclerocios
#1	Esclerocial	S3	E0	Cfe1
#3	Micelial	M2	E3	Cfe0
#4	Esclerocial	S3	E0	Cfe3
41	Esclerocial	S3	E0	Cfe1
42	Esclerocial	S3	E0	Cfe3
45	Esclerocial	S3	E0	Cfe1
47	Micelial	M4	E0	Cfe0
51	Esclerocial	S4	E0	Cfe3
52	Esclerocial	S3	E0	Cfe3
55	Esclerocial	S3	E0	Cfe1
57	Esclerocial	S3	E0	Cfe3
59	Micelial	M3	E0	Cfe0
61	Esclerocial	S4	E2	Cfe3
64	Esclerocial	S3	E0	Cfe1
67	Esclerocial	S4	E0	Cfe3
69	Esclerocial	S3	E2	Cfe2
71	Esclerocial	S3	E3	Cfe1
72	Micelial	M4	E0	Cfe0
74	Esclerocial	S3	E0	Cfe3
75	Esclerocial	S3	E2	Cfe1
76	Esclerocial	S3	E0	Cfe2
77	Esclerocial	S3	E0	Cfe2
84	Esclerocial	S4	E0	Cfe2
86	Micelial	M1	E3	Cfe0
89	Esclerocial	S1	E3	Cfe3
91	Esclerocial	S2	E0	Cfe2
92	Esclerocial	S3	E0	Cfe3
BI	Micelial	M2	E0	Cfe0
BII	Esclerocial	S3	E0	Cfe2

a) Tipo Morfológico

Las colonias del *Botrytis cinerea* en PDA se clasificaron en ocho tipos morfológicos, que pudieron agruparse, al igual que por Martínez *et al.* (2003), en dos tipos principales, micelial y esclerocial.

El 79.3% del total de aislamientos se clasificaron como del tipo esclerocial (S), es decir, produjeron esclerocios; mientras que, el 20.7% restante como del tipo micelial (M) por la ausencia de formación de esclerocios (Figura 2). Los tipos esclerociales de mayor frecuencia fueron aquellos que formaron esclerocios grandes y pequeños con distribución irregular en placa, denominados S3 y S4 con 58.6% y 13.8%, respectivamente. Mientras que, los tipos esclerociales de menor frecuencia fueron aquellos que formaron esclerocios en el borde de la placa (S1) y los que formaron esclerocios grandes dispuestos de forma radial (S2), en ambos con un porcentaje iguales del 3.4%. Del mismo modo, los tipos miceliales de mayor frecuencia fueron aquellos de micelio suelto y micelio grueso y lanudo, denominados M2 y M4 respectivamente, con 6.9% para ambos casos. Mientras que, los de menor frecuencia fueron los de micelio en masa (M3) y micelio corto (M1), que se presentaron en la misma frecuencia con un 3.4% del total de aislamientos estudiados (Anexo 1). La presencia de una alta frecuencia del subtipo morfológico S3 y una baja frecuencia del subtipo M3 en poblaciones de *B. cinerea* se evidencia en numerosas investigaciones realizadas en cultivos como la frambuesa, vid, mora, tomate bajo por diversos (Martínez *et al.*, 2003; Mirzaei *et al.*, 2007; Tanović *et al.* 2014; Isaza *et al.* 2019; Gaber *et al.*, 2019; Gül y Karakaya, 2020). Sin embargo, la frecuencia de tipos morfológicos puede diferir con otros trabajos en los cuales las condiciones de tiempo y oscuridad no fueron las mismas (Kumari *et al.* 2014; Aguirre 2015). Jarvis (1977) menciona que la luz promueve la esporulación e inhibe la formación de esclerocios en *Botrytis cinerea* siendo posiblemente esta la razón por la cual Kumari *et al.* (2014) y Aguirre (2015) encontraron que la frecuencia de aislamientos formadores de esclerotes fue igual o menor a los aislamientos miceliales.

Se observó también que aislamientos con mayor capacidad formadora de esclerocios presentaban una escasa presencia de micelio y que, por el contrario, aislamientos que presentaron una baja formación de esclerocios poseían un mayor desarrollo de masa micelar. Con excepción del aislamiento 89, que poseía una abundante formación de esclerocios en el borde de la placa y un considerable desarrollo micelial y de conidias. Jarvis (1977) sostiene

que, al momento de la formación de esclerocios, las hifas se fusionan formando estructuras hialinas que con el tiempo van tornándose marrón o negro debido a la deposición de pigmentos melánicos, por lo tanto, es razonable observar poca presencia de micelio en cultivos con gran capacidad de formación de esclerocios.

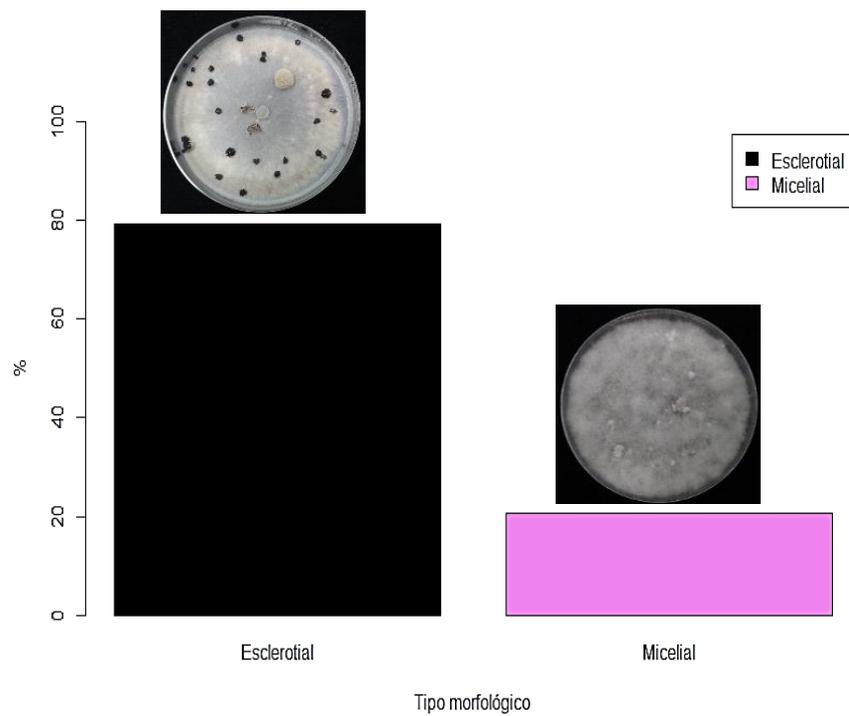


Figura 2. Frecuencia de aislamientos según su tipo morfológico

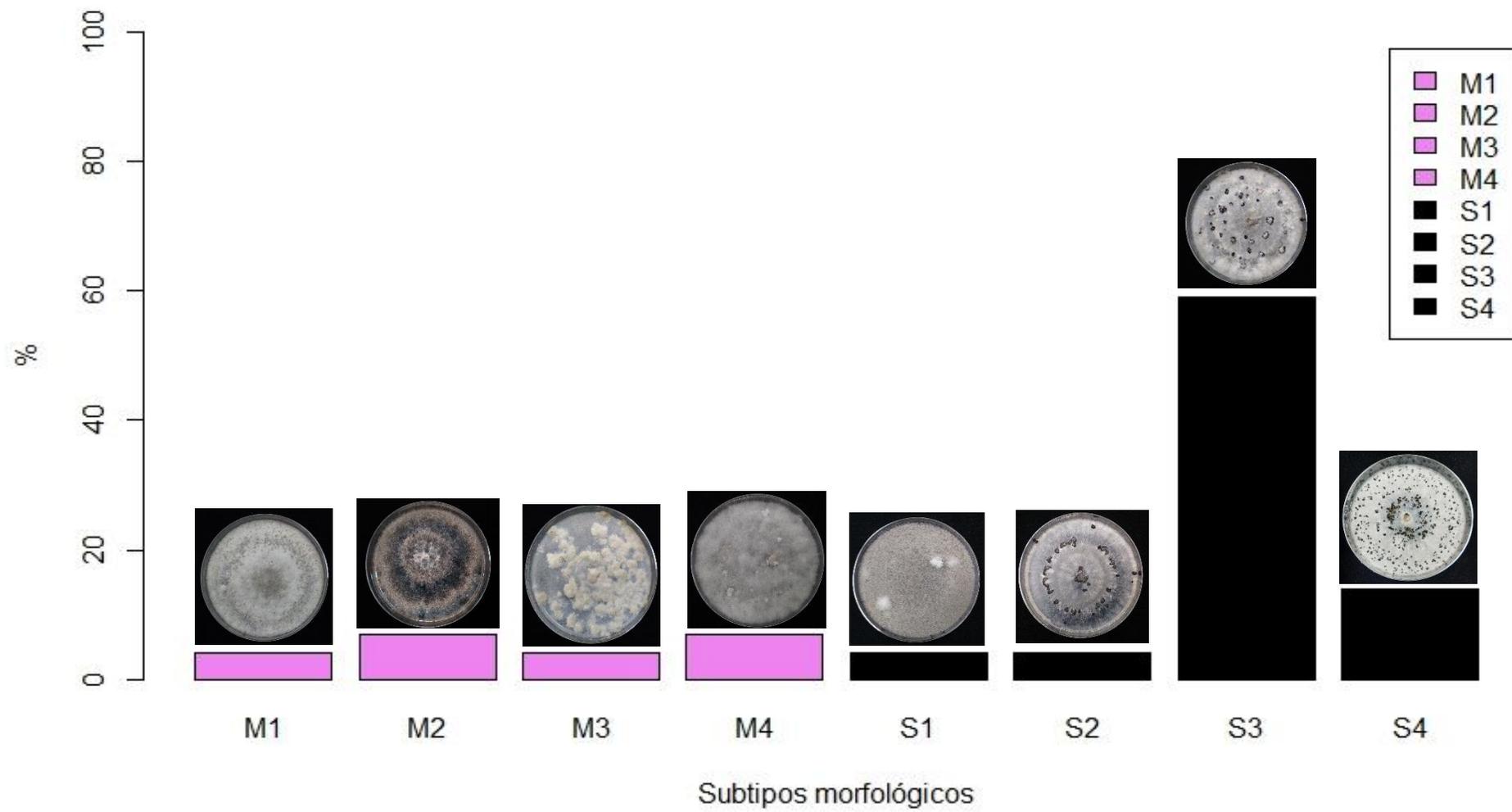


Figura 3. Frecuencia de veintinueve aislamientos recuperados de flores y frutos de arándano según el subtipo morfológico

b) Nivel de Esporulación

La mayoría de los aislamientos no formaron conidias en las condiciones de oscuridad y temperatura proporcionadas. Solo el 24.1% del total de aislamientos formaron conidias; de estos, el 10.3% fue clasificado en el nivel E2 por su escasa esporulación y el 13.8% como E3 por su abundante esporulación. El 75.9% restante se clasificó como E0 por la no formaron conidias. Por otro lado, si se compara la capacidad de esporulación entre tipos morfológicos, el tipo micelial presento una ligera pero mayor frecuencia de aislamientos formadores de conidias (33.3%) que el tipo esclerocial (21.7%).

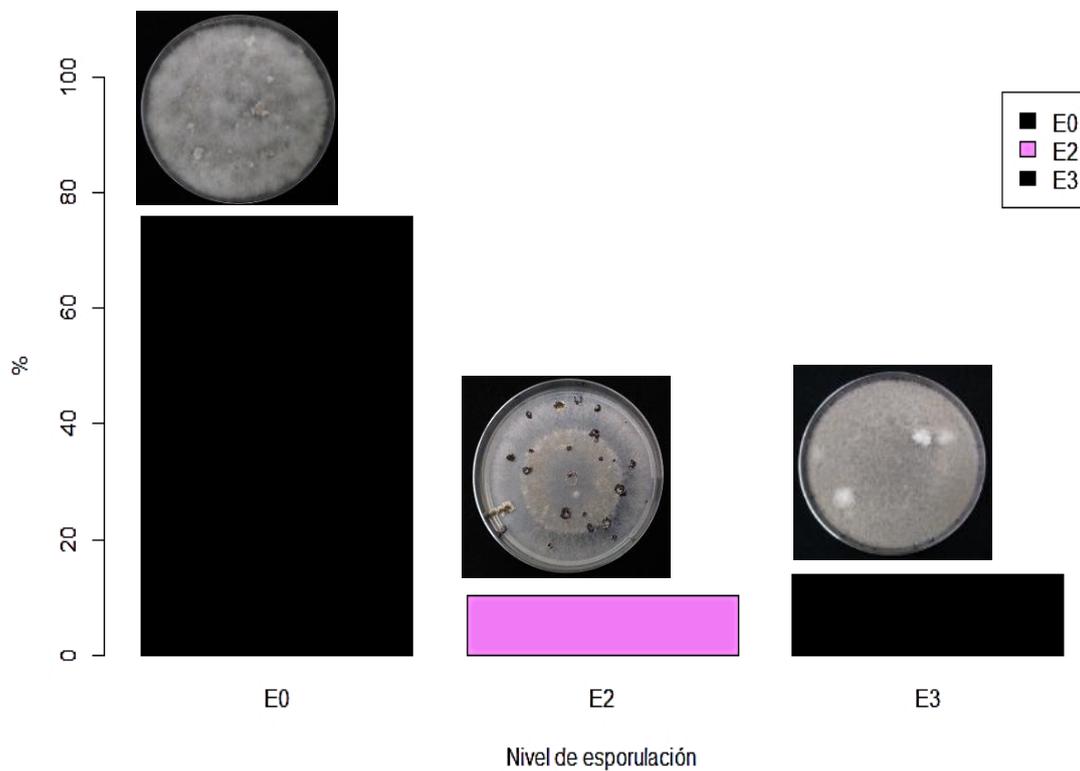


Figura 4. Porcentaje de aislamientos de los aislamientos de *B.cinerea* recuperados de Chavimochic según el nivel de esporulación.

c) Capacidad Formadora de Esclerocios

El 20.7% de los aislamientos de *Botrytis cinerea* no formaron esclerocios, clasificándoseles dentro del nivel Cfe 0. Mientras que del 79.3% que formaron esclerocio; 24% se clasificaron dentro de nivel Cfe 1 (menos de 15 esclerocios por placa), 20.7% en el nivel Cfe 2 (entre 15 y 30 esclerocios por placa) y 34.5% en el nivel Cfe 3 (más de 30 esclerocios por placa).

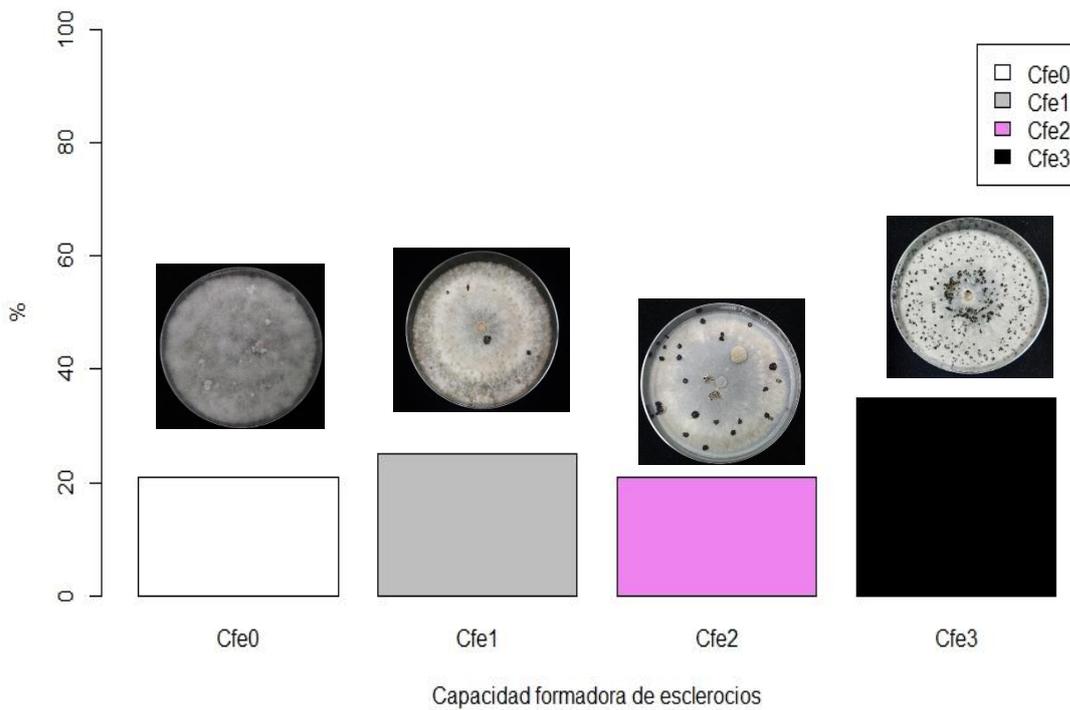


Figura 5. Porcentaje de aislamientos de *B.cinerea* recuperados de flores y frutos de arándanos provenientes de la región Chavimochic según su capacidad formadora de esclerocios. (Cfe)

4.2.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Los veintinueve aislamientos recuperados de flores y frutos de arándanos provenientes de Chavimochic fueron identificados como pertenecientes al Complejo *Botrytis cinerea* de acuerdo al aspecto de la colonia crecidas en medio PDA (Figura 6), a las características de sus estructuras microscópicas y macroscópicas (Figura 7), y al hospedero del cual proviene. Los aislamientos desarrollaron colonias de color gris, con micelio septado, conidióforos largos y de color marrón en la base, conidias elipsoidales u ovoides, y esclerotes negros; tal como lo descrito por Ellis (1971) y Barnett y Hunter (1998).

Todos los aislamientos formaron conidios durante el periodo de evaluación. Las medidas del largo y ancho de las conidias oscilaron entre 16.75-5.00 x 11.58-3.21 μm , con un promedio del diámetro mayor de $9.29 \pm 1.81 \mu\text{m}$ y un diámetro menor promedio de $6.34 \pm 1.05 \mu\text{m}$. Adicionalmente se obtuvo una relación entre diámetro mayor y menor de 1.49 ± 0.32 . Por otro lado, solo el 76% de los aislamientos formaron esclerocios, las dimensiones de estos esclerotes oscilaron entre 3.28-1.48 x 2.70-1.23 mm, con un diámetro promedio de $3.03 \pm 1.33 \text{ mm}$. El tamaño de los diámetros es similar a lo reportado por Aguirre (2015) en aislamientos de *Botrytis cinerea* procedentes de campos de arándano en Chile. Sin embargo, difiere mucho en cuanto al tamaño de esclerotes en donde reporta un diámetro promedio de 0.7 mm, mientras que para nuestro aislamiento se estima en una media de diámetro de 2.99 mm.

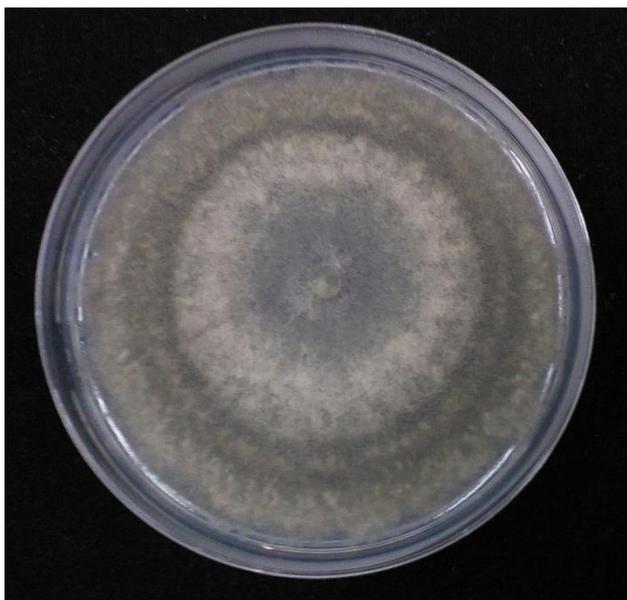


Figura 6. Colonia de micelio gris propia de *Botrytis cinerea*

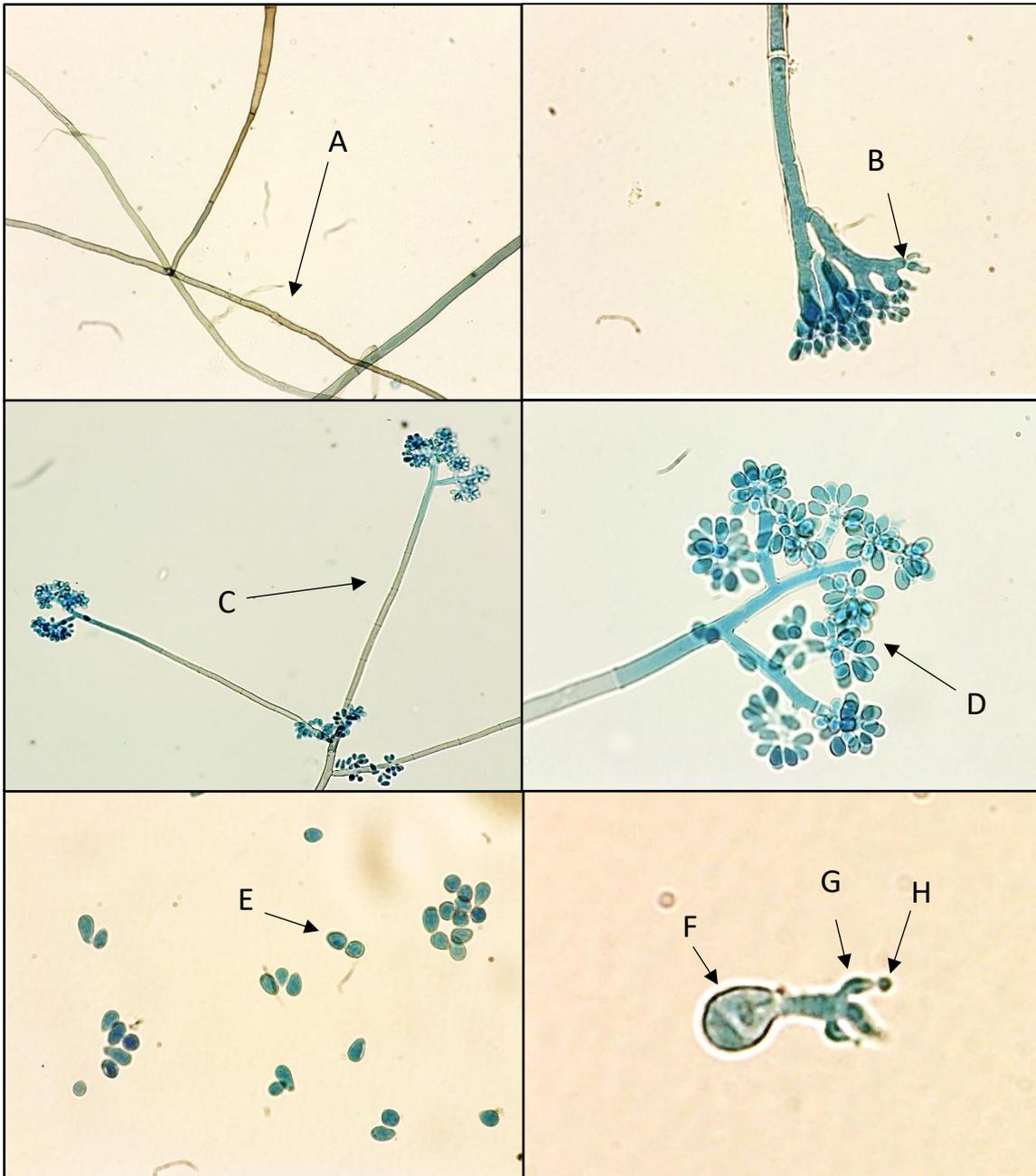


Figura 7. Características de las estructuras microscópicas de los aislamientos de *Botrytis cinerea*

A: Micelio; B: Célula conidiógena (formación de conidias); C: Conidióforos; D: Ramificación terminal del conidióforo; E-F: Conidia o Macroconidia; G: Fiálide; H: Microconidia.

Tabla 14. Mediciones de las estructuras microscópicas de los veintinueve aislamientos identificados morfológicamente como *Botrytis cinerea*.

Aislamiento	Dimensión de conidias (μm)						Dimensión de esclerocios (mm)					
	Largo		Ancho		L / A		Largo		Ancho			
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD		
41	10.98	± 1.58	7.40	± 0.72	1.50	± 0.27	3.17	± 1.50	2.67	± 1.41		
42	8.87	± 1.58	5.96	± 0.78	1.51	± 0.30	4.16	± 1.12	3.38	± 0.94		
46	8.48	± 1.53	6.21	± 0.81	1.38	± 0.27	3.36	± 1.38	2.81	± 1.10		
47	9.41	± 1.99	6.36	± 1.10	1.51	± 0.37	*	± *	*	± *		
51	11.08	± 1.91	7.38	± 1.08	1.54	± 0.36	1.40	± 0.27	1.19	± 0.24		
52	8.91	± 1.47	6.52	± 0.80	1.39	± 0.27	3.98	± 1.38	3.23	± 1.16		
55	8.42	± 1.54	5.10	± 0.58	1.67	± 0.34	3.73	± 1.62	3.18	± 1.48		
57	9.44	± 1.60	6.32	± 0.98	1.52	± 0.32	3.06	± 1.03	2.50	± 0.70		
59	9.51	± 1.41	7.09	± 0.90	1.37	± 0.28	*	± *	*	± *		
61	9.69	± 1.35	6.89	± 0.91	1.42	± 0.25	2.22	± 0.77	1.81	± 0.59		
64	10.39	± 1.66	6.99	± 0.81	1.51	± 0.31	3.37	± 1.42	2.71	± 1.24		
67	10.64	± 2.35	6.26	± 0.90	1.75	± 0.52	1.68	± 0.30	1.44	± 0.26		
69	8.10	± 0.98	5.94	± 0.65	1.38	± 0.24	3.69	± 1.15	3.19	± 1.10		
71	8.80	± 1.47	6.53	± 0.64	1.36	± 0.24	4.18	± 1.15	3.50	± 1.07		
72	8.81	± 0.95	6.78	± 0.56	1.31	± 0.18	*	± *	*	± *		
74	8.72	± 1.61	5.61	± 0.71	1.56	± 0.28	4.29	± 1.41	3.73	± 1.06		
75	8.57	± 1.22	5.82	± 0.67	1.49	± 0.27	3.42	± 1.15	2.85	± 0.92		
76	10.15	± 1.81	6.61	± 0.82	1.57	± 0.40	3.66	± 1.48	3.10	± 1.19		
77	7.86	± 1.57	5.23	± 0.88	1.54	± 0.38	3.81	± 1.37	3.25	± 1.12		
84	8.19	± 0.95	5.95	± 0.76	1.40	± 0.23	2.22	± 0.39	1.80	± 0.36		
86	9.25	± 1.65	5.80	± 0.69	1.62	± 0.37	*	± *	*	± *		
89	8.43	± 1.14	5.75	± 0.58	1.48	± 0.26	1.76	± 0.48	1.46	± 0.44		
91	9.16	± 1.33	5.53	± 0.69	1.69	± 0.35	3.40	± 1.00	2.69	± 0.78		
92	9.85	± 1.62	6.90	± 0.83	1.45	± 0.28	3.87	± 1.35	2.81	± 0.80		
#1	9.69	± 1.86	7.86	± 1.27	1.26	± 0.32	2.18	± 1.23	1.75	± 1.03		
#3	9.39	± 1.94	5.88	± 0.73	1.63	± 0.41	*	± *	*	± *		
#4	9.44	± 1.81	6.28	± 1.00	1.53	± 0.35	*	± *	*	± *		
BI	10.63	± 1.99	6.45	± 0.99	1.68	± 0.40	*	± *	*	± *		
BII	8.45	± 1.60	6.47	± 0.99	1.33	± 0.31	4.74	± 1.40	3.76	± 1.26		

* = No producen esclerocios; SD= desviación estándar



Figura 8. Características de las estructuras macroscópicas de los aislamientos de *Botrytis cinerea*. A: Esclerocio de superficie rugosa; B: Esclerocio de superficie lisa.

4.2.3. TASAS DE CRECIMIENTO

El análisis de varianza demostró que existe diferencia en las tasas de crecimiento a distintas temperaturas y entre aislamientos (Figura 9) (Anexo 2 y 3). A temperaturas favorables (15 °C, 20 y 25 °C óptimas), los aislamientos no mostraron diferencias significativas a temperaturas de 20 y 25°C, mientras que si presentaron diferencia a 15°C. El crecimiento promedio a temperaturas óptimas fueron las siguientes: 23.38 mm/día a 20°C; 22.92 mm/día a 25°C y 18.30 mm/día a 15°C. Las temperaturas de 20°C y 25° fueron los que proporcionaron una mayor tasa de crecimiento micelar a los aislamientos llenando las placas aproximadamente al cuarto día. Mirzaei *et al.* (2007), Wagih *et al.* (2019) y Gaber *et al.* (2019) obtuvieron similares velocidades de crecimiento en *Botrytis cinerea* procedente de diferentes hospederos coincidiendo en que la temperatura óptima se encuentra entre los 20 y 25°C. Las temperaturas límite (5 y 28 °C), afectaron significativamente la tasa de crecimiento micelial de los aislamientos de *Botrytis*. La velocidad de crecimiento se redujo notablemente a 5 y 28 °C en comparación con el óptimo. La tasa de crecimiento a 5°C fue en promedio de 4.55mm/día a 5°C y a 11.34 mm/día a 28°C.

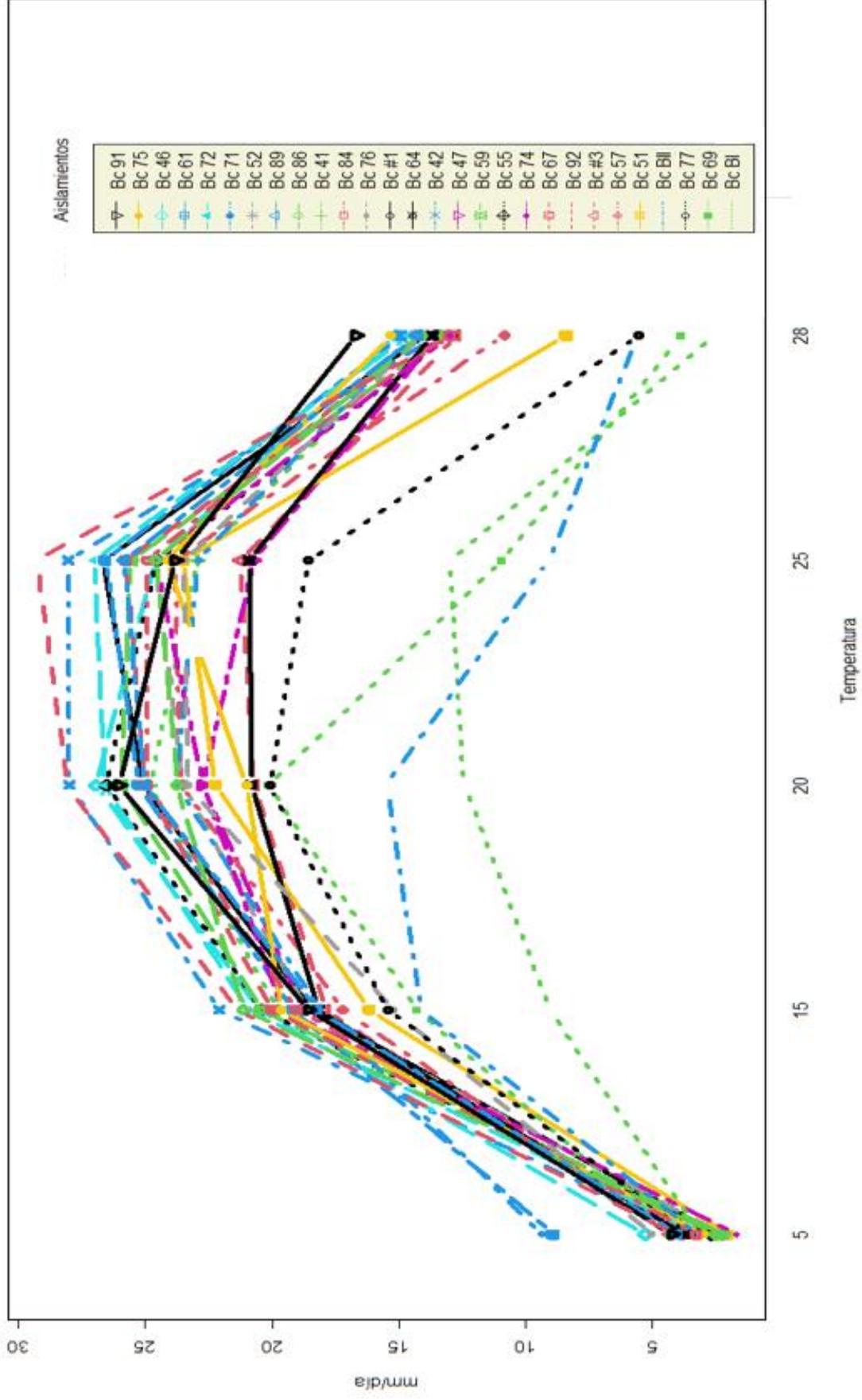


Figura 9. Crecimiento micelial promedio de los aislamientos de *Botrytis cinerea* a diferentes temperaturas.

4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

4.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN

La metodología propuesta por Saitoh *et al.* (2006) modificada por la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología de la UNALM permitió la extracción de ADN de los aislamientos de todos los asilamientos, proporcionando la cantidad y calidad adecuada para los procedimientos de PCR desarrollados en esta investigación. La concentración obtenida superó los 50 ng / μ L; que según Cornejo *et al.* (2014), están dentro del rango adecuado para las reacciones de PCR y otras técnicas. Así mismo, para estimar la pureza del ADN se consideró la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm en cuyo caso, se obtuvo un promedio de 1.9 que indica una concentración de ADN óptimo y bajo en contaminantes.

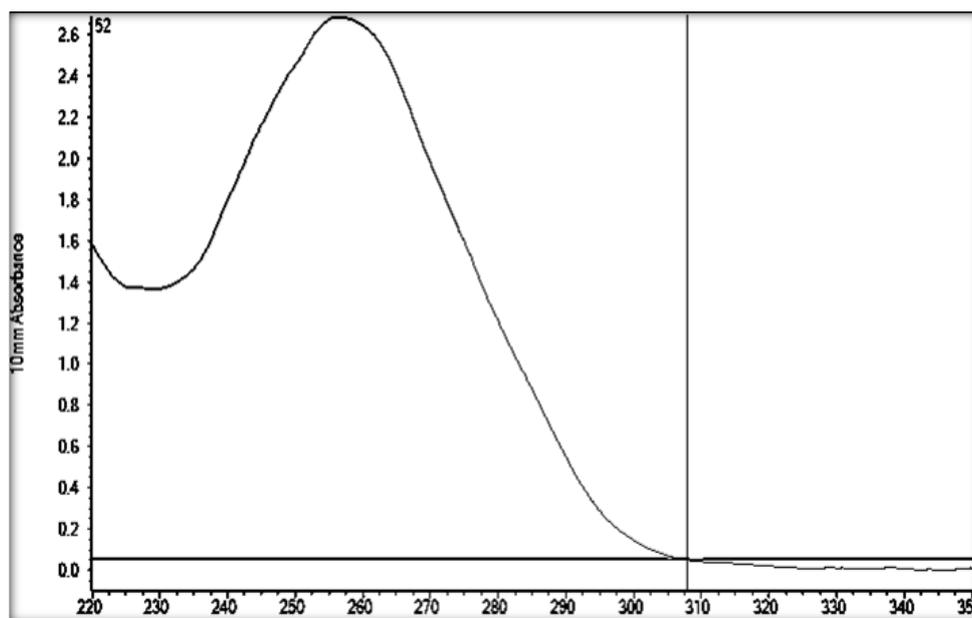


Figura 10. Análisis cuantitativo y cualitativo de extracción de ADN mediante espectrofotometría.

Tabla 15. Análisis cuantitativo y cualitativo de extracción de ADN mediante espectrofotometría.

N°	Aislamiento	Cantidad de ADN ng /μL	Calidad de ADN 260/280
1	#4	209.4	2.20
2	41	63.9	2.09
3	42	204.6	2.10
4	45	91.6	2.10
5	47	221.2	2.11
6	51	178.2	2.06
7	52	132.4	2.18
8	55	122.8	2.13
9	57	174.1	2.05
10	59	247.5	2.12
11	61	198.1	2.08
12	62	189.8	2.17
13	64	1048.3	2.14
14	66	73.8	2.06
15	69	127.0	2.14
16	71	150.6	2.10
17	72	63.8	2.16
18	74	122.7	2.12
19	75	98.3	2.09
20	76	219.5	2.11
21	77	121.5	2.22
22	83	40.3	2.11
23	84	111.5	2.18
24	86	108.4	2.22
25	89	580.0	2.11
26	91	62.3	2.17
27	92	443.7	2.00
28	#1	60.3	2.12
29	#3	415.9	2.01

4.3.2. DIFERENCIACIÓN DE *Botrytis* spp. Y GRUPOS DE *Botrytis cinerea* BASADOS EN PCR.

DIFERENCIACIÓN DEL COMPLEJO *Botrytis cinerea* DE OTRAS ESPECIES DEL GÉNERO *Botrytis*

Para todos los aislamientos se logró amplificar una banda de aproximadamente 700 pb (Figura 11) mediante el uso del primer específico C729+/- para la detección del Complejo *Botrytis cinerea* (*Botrytis cinerea* y *Botrytis pseudocinerea*) desarrollado por Rigotti *et al.* (2002), a partir de la región IGS. Este primer amplifica una banda de 700 pb para aislamientos pertenecientes al complejo *Botrytis cinerea* y una banda de 600pb para la especie *Botrytis fabae*, no amplificando para otras *Botrytis* spp. excepto para *B. pelargonii* que cuyo caso también amplifica una banda de 700 pb pero que es diferenciable de *B. cinerea* por sus características morfológicas y por ser un patógeno exclusivo del geranio (Mirzaei *et al.* 2007 y Pei *et al.* 2019). Por tanto, este resultado descarta la presencia de otras especies de *Botrytis* no pertenecientes al complejo de *Botrytis cinerea* en los aislamientos estudiados y corrobora la identificación realizada mediante la caracterización morfológica y cultural de estos.

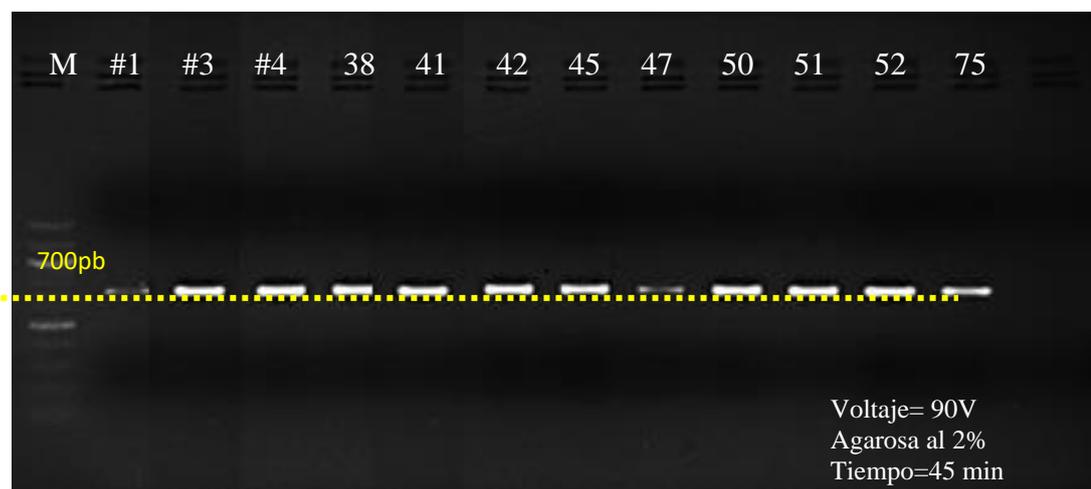


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR amplificados con el primer C729+/- de aislamientos de *Botrytis cinerea*. (1 al 75: aislamientos de *Botrytis cinerea*, 700 pb, leader (M), control (C)).

DIFERENCIACIÓN Y COMPOSICIÓN AL COMPLEJO *BOTRYTIS CINEREA*

Los primers BcinN^{+/-}, mrr1^{+/-} y g2944^{+/-} desarrollados por Plesken lograron amplificar patrones de bandas que permitieron detectar la presencia de la subpoblación de *Botrytis cinerea* S y N en campos productores de arándanos (Figura 12). La cantidad de aislamientos positivos para *Botrytis cinerea* S fue de 18 que representan el 62% del total, muy por encima de la subpoblación N que fue de 11 que es igual al 38% restante. Esto indica que la subpoblación S de *Botrytis cinerea* es predominante en los campos de producción de arándanos muestreados. Legocha *et al.* (2012) reporta que la subpoblación S pertenece a un nuevo clado que está estrechamente relacionado con *B. cinerea* y la especie de huésped específico *B. fabae*. Además, encontró que todos los fenotipos multi-droga resistentes del tipo MDR1h con resistencia parcial mayor al fludioxonil y ciprodinil que el tipo MDR1 estudiado por Kretschmer (2009) se restringían a los aislamientos del grupo S y que la acumulación de resistencia a diferentes fungicidas se daba en los aislamientos MDR1h. Esto indicaría que el desarrollo de resistencia a fungicidas en poblaciones de campo ocurre de forma independiente entre diferentes genotipos N y S. Por lo que resalta la importancia práctica de comprender la composición genética de las poblaciones de este patógeno (Legocha *et al.*, 2012; Rupp *et al.*, 2017)

Por otro lado, no se logró detectar la presencia de la especie simpátrica, *Botrytis pseudocinerea*, reportada por Saito (2014) como parte del complejo *Botrytis cinerea* en el cultivo de arándano, dentro de los aislamientos recuperados en este estudio.

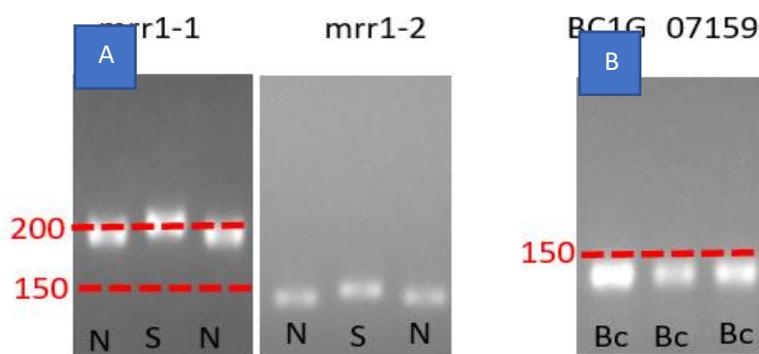


Figura 12. Diferenciación basada en PCR de *B. pseudocinerea* y genotipos de *B. cinerea*. Los tamaños de los amplicones producidos por los primers propuestos por Plesken *et al.*, (2015) para todos los aislamientos correspondieron a *B. cinerea* (B) y a los genotipos S y N (A).

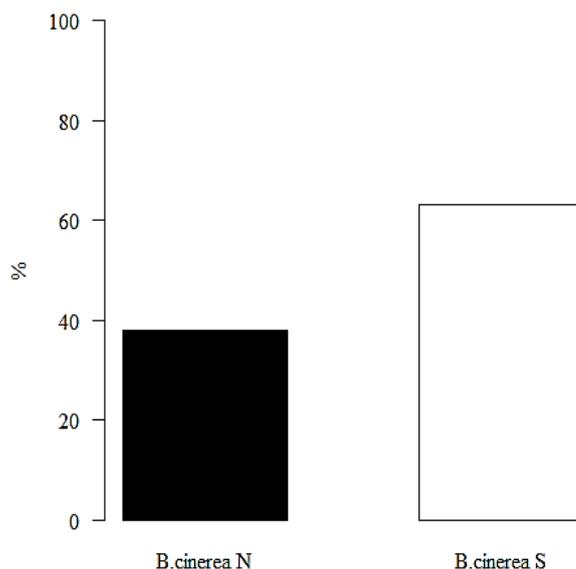


Figura 13. Porcentaje de aislamientos pertenecientes a las subpoblaciones N y S de *Botrytis cinerea* provenientes de flores y frutos de arándanos.

4.3.3. CORRESPONDENCIA GENOTÍPICA BASADO EN LA DETECCIÓN DE TRANSPOSONES

De los cuatro genotipos reportados por Giraud *et al.* (1997) basados en la presencia de elementos transponibles: Vacuma, Boty, Flipper y Transposa; solo se detectó los genotipos Transposa y Boty. El genotipo Transposa fue el de mayor frecuencia con un 72% del total de aislamientos; mientras que el genotipo Boty se presentó en un 28%.

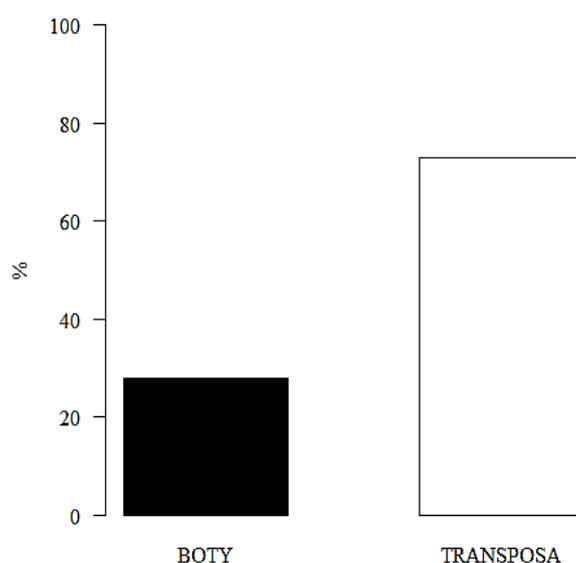


Figura 14. Porcentaje según la correspondencia genotípica basada en la presencia de elementos transponibles de aislamientos de *Botrytis cinerea* recuperados de flores y frutos de arándanos.

Los elementos transponibles se caracterizados por su capacidad de migrar dentro del genoma constituyendo una porción considerable del genoma de los eucariotas y posee un impacto importante en la evolución (Zhang *et al.*, 2017). Diferentes estudios han demostrado cierta relación entre la patogenicidad, resistencia a fungicidas y la fenología de *Botrytis cinerea* con la presencia de elementos transponibles. Walker *et al.* (2011) demostró que en aislamientos de *Botrytis cinerea* provenientes de viñedos franceses que la frecuencia del genotipo Vacuma dentro del complejo de *Botrytis cinerea* es mayor a etapas iniciales de la primavera, y va disminuyendo conforme pasa el tiempo (Plesken *et al.*, 2015). Gómez (2013) menciona que se ha evidenciado un comportamiento diferencial de los genotipos con respecto a su sensibilidad a ciertos ingredientes activos de fungicidas. Giraud *et al.* (1999) reporta que tanto *B. cinerea* genotipo Transposa como genotipo vacuma presentaban resistencia a carbendazim y a diethofenca. Solo transposa se comportaba como resistente a vinclozolin y que sólo algunos aislamientos vacuma presentaban resistencia a fenhexamid. Wagih *et al.* (2019) demostró cierta correlación entre la distribución de elementos transponible y la virulencia en aislamientos de *Botrytis cinerea*, revelando que todos los aislamientos de Transposa presentaron mayor capacidad de virulencia que los del tipo Vacuma.

En este estudio solo se detectaron los genotipos Transposa y Boty al igual que Muños y Campos (2013) pero con 72 y 28 % de frecuencia respectivamente. En general, muchas investigaciones al estudiar las frecuencias de los genotipos según los ET demuestran que las poblaciones de *Botrytis cinerea* están principalmente por Transposa, seguida de Boty, Flipper y en menor medida por Vacuma (Kumari *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017; Wagih *et al.*, 2019). Zhang *et al.* (2017) reporto que el tipo Transposa fue más alta la población total y en la mayoría de las subpoblaciones estudiadas, y que el tipo Boty fue más alta en las regiones de clima cálido. Además, menciona que los tipos Flipper se distribuyen principalmente en áreas tropicales húmedas.

Lo mencionado anteriormente, explicaría la no presencia de los genotipos Flipper y Vacuma entre los aislamientos estudiados. La baja frecuencia natural de estos genotipos en las poblaciones de *Botrytis cinerea* reducen la probabilidad de recuperación en el momento del muestro. Para el caso de Vacuma, posiblemente el muestreo se realizó cuando las condiciones de estacionalidad no fueron las óptimas y la frecuencia era demasiado baja. Por otro lado, las condiciones cálidas secas de la región de Chavimochic explicarían la presencia de genotipos Boty, y la ausencia de Flipper en los aislamientos estudiados.

4.3.4. DETERMINACIÓN DEL GRUPO DE APAREAMIENTO

La metodología empleada por Zhang *et al.* (2017), que hace uso de los primers desarrollados por van Kan *et al.* (2010) logró determinar el grupo de apareamiento correspondiente para cada aislamiento. Como resultado se detectó la presencia de los grupos heterotálicos, MAT1-1 y MAT1-2, y se descartó la presencia de aislamientos homotálicos MAT1-1/2, presentes en *Botrytis cinerea*. La frecuencia de ambos grupos de apareamiento fue muy cercanas a la proporción 1:1, reportada por Faretra *et al.* (1988), Kumari *et al.* (2014) y Zhang *et al.* (2017). El porcentaje de aislamientos MAT1-1 alcanzó el 52%; mientras que MAT1-2, el 48% restante. Según Beever y Weeds (2004), la reproducción sexual entre los dos grupos de apareamiento de *B. cinerea*, es una causa menor de la diversidad genética observada debido a que las estructuras sexuales del hongo rara vez se observan en campo.

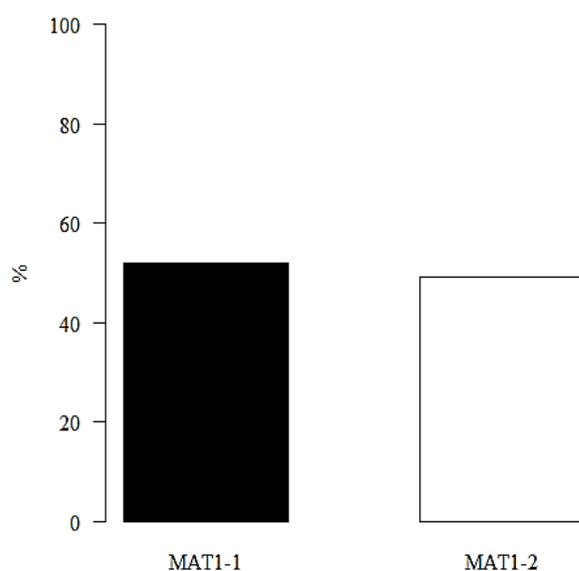


Figura 15. Porcentaje según el grupo de apareamiento sexual de aislamientos de *Botrytis cinerea* recuperados de flores y frutos de arándanos

4.3.5. ANÁLISIS DE LAS REGIONES DEL ESPACIO TRANSCRITO INTERNO (ITS)

El producto de PCR para la región ITS amplificado con los primer ITS1 e ITS 4 fue de 500 bp para los veintinueve aislamientos estudiados (Figura 16). Este resultado coincide con lo obtenido por (Aktaruzzaman *et al.*, 2017, Waih *et al.*, 2019).

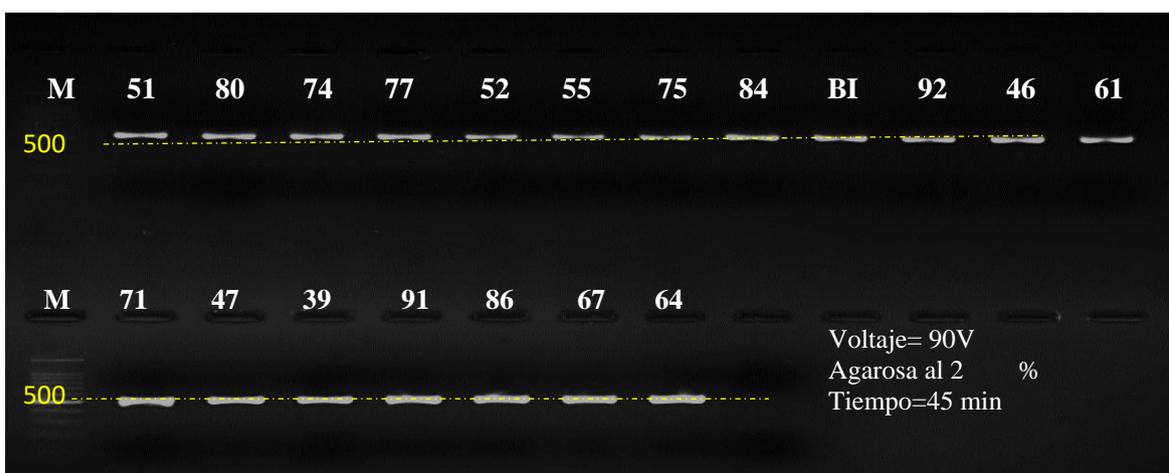


Figura 16. Amplificación de las regiones ITS de los aislamientos 51, 80, 74, 77, 52, 55, 75, 84, BI, 92, 46, 61, 71, 47, 39, 91, 86, 67 y 64 de *Botrytis cinerea*.

4.3.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se logró la construcción de un árbol filogenético usando el programa MEGA7 para la aplicación de la metodología de Neighbor-Joining (NJ) a partir de secuencias de la región ITS del ADNr de cuatro aislamientos de *Botrytis cinerea* aislados en este trabajo (42, 61, 64 y 75) y de cepas obtenidas de la base de datos NCBI, con una prueba de Bootstrap (1000 réplicas) para evaluar el soporte de agrupaciones. Se observó que los aislamientos de este estudio formaron un grupo con otras cepas de *Botrytis cinerea* separado de *Sclerotinia sclerotiorum* empleado como grupo externo en otras investigaciones (Anexo 4).

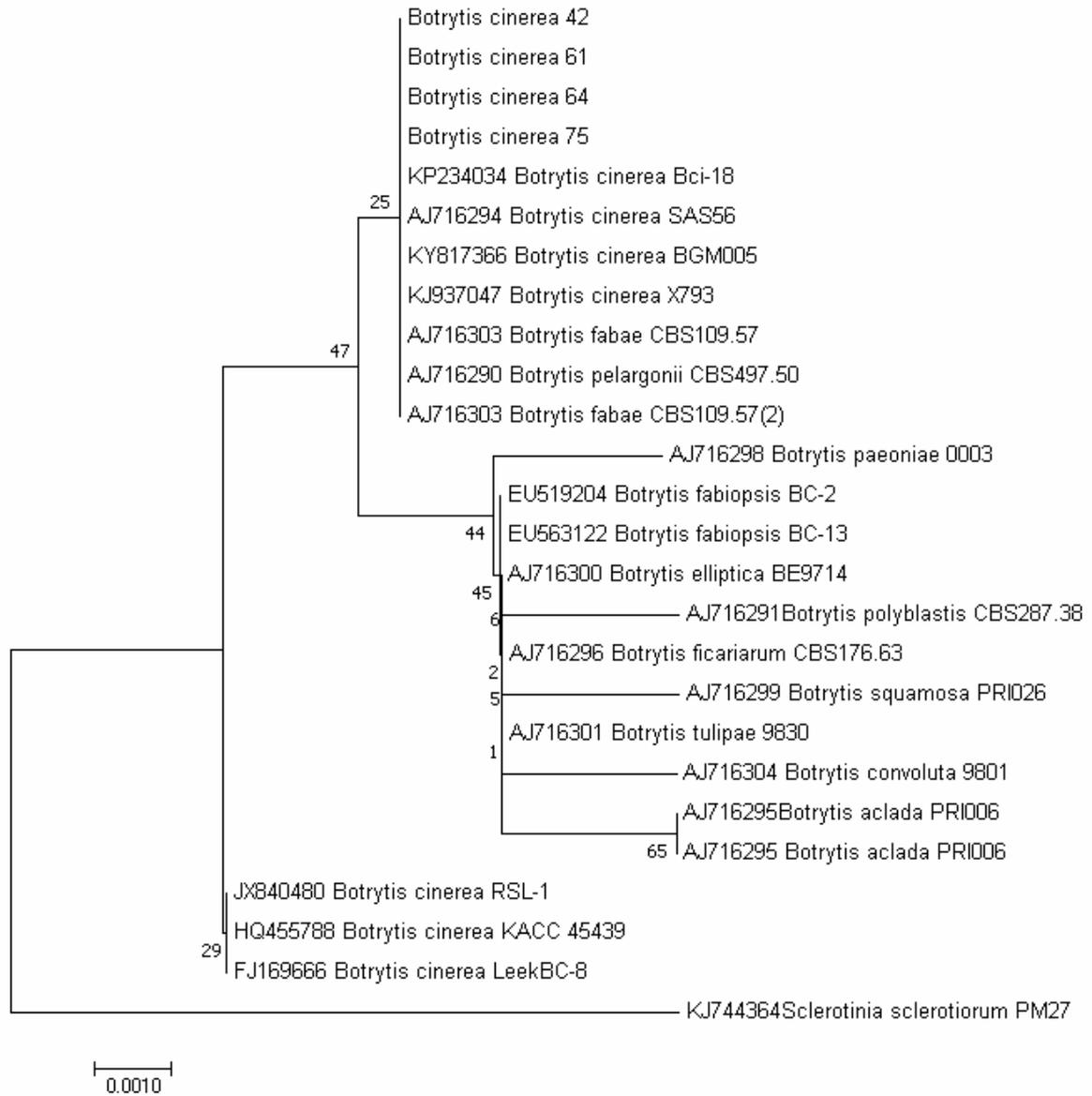


Figure 17. Análisis filogenético de la región espaciadora transcrita interna (ITS) de secuencias de *Botrytis cinerea*.

4.4. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Los aislamientos 42, 45, 61, 64, 74 y 75 de *Botrytis cinerea* seleccionados en base a su perfil genético para este ensayo lograron infectar frutos de arándanos durante el periodo de evaluación. La colonización del patógeno pudo observarse con cierta dificultad en algunos frutos inoculados a las veinticuatro horas después de la inoculación; sin embargo, fue más evidentes a las 48 horas por la presencia de tejido micelial creciendo en la superficie del fruto y extendiéndose desde el punto de inoculación (zona proximal del fruto) hacia otras partes. La evaluación culminó al sexto día, cuando uno del aislamiento infectó al cien por ciento de los frutos. Los signos y síntomas externos observados fueron la presencia de micelio gris en la superficie y exudación en algunos frutos, mientras que los internos consistieron en el ablandamiento de los tejidos y el cambio coloración de la pulpa (figura). Por otro lado, no se observó síntomas de descomposición y signos de la enfermedad en los frutos testigos no inoculados y sin agua (TSA); solo uno de los catorce frutos del testigo inoculado solo con agua (TCA) produjo síntomas de pudrición gris.

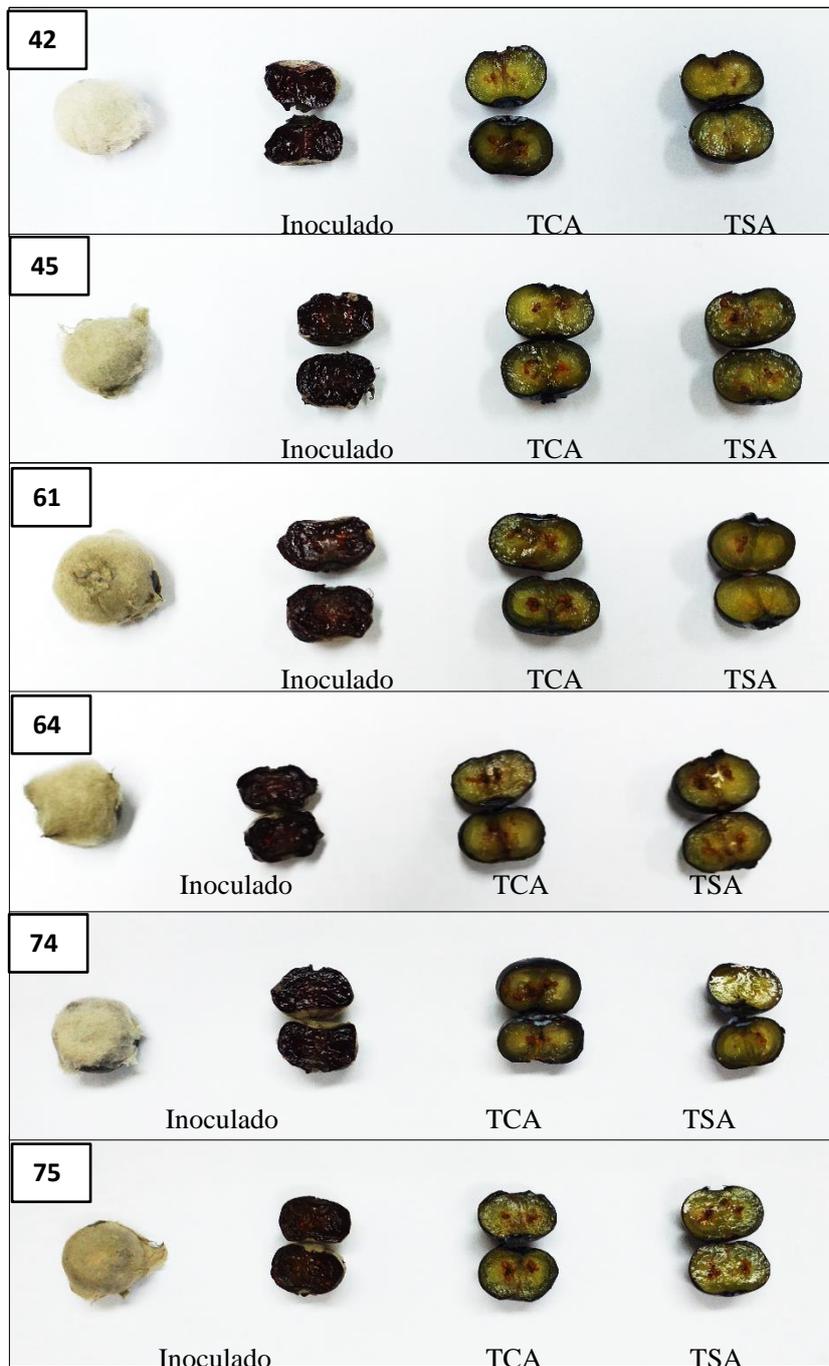


Figura 18. Síntomas y signos internos y externos de seis aislamientos de *Botrytis cinerea* sobre frutos de arándanos. Frutos inoculados con 10 μ l de suspensión conidias ($1,0 \times 10^5$ esporas / ml) e incubados a temperatura de 25°C por 8 días y con presencia de degradación interna de tejidos.

Finalmente, todos los aislamientos inoculados produjeron la enfermedad de moho gris y estructuras morfológicas propias de *Botrytis cinerea* sobre frutos de arándanos corroborando así la patogenicidad de estos.

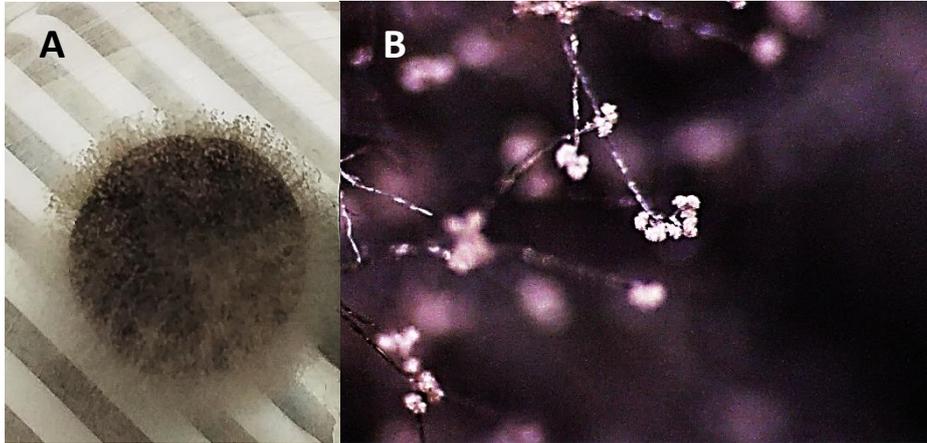


Figura 19. A. Moho gris sobre fruto de arándano. B. Estructuras de propagación de *Botrytis cinerea*.

V. CONCLUSIONES

- La caracterización morfológica permite evidenciar la gran variabilidad de los aislamientos de *Botrytis cinerea* recuperados de arándanos en cuanto al aspecto cultural, capacidad formadora de esclerocios y nivel de esporulación de estos. Además, se determinó que la temperatura óptima para su desarrollo se encuentra entre los 20 y 25°C. Los aislamientos del tipo S3 fue el de mayor frecuencia con 58.6%.
- La ampliación de la región ITS (700pb) no permite identificar y discriminar a *Botrytis cinerea* de otras especies de *Botrytis*. Sin embargo, el análisis filogenético basados en esta región permite agrupar a los aislamientos a nivel de género. Por otro lado, el primer C729+/- específico para *Botrytis cinerea* determino que los aislamientos pertenecen al Complejo *Botrytis cinerea* por la amplificación de una banda de 700pb. Se determino la existencia de ambos grupos de apareamiento MAT1 y MAT2, en similar proporción (1:1) en la población de aislamientos *B. cinerea*. Solo se detectaron aislamientos del tipo Transposa y Boty, predominando fuertemente Transposa. Se comprobó la existencia de las dos subpoblaciones de *B. cinerea*, N y S.
- Los seis perfiles genéticos seleccionados para la prueba de patogenicidad son patogénicos y ocasionaron signos y síntomas característicos de moho gris en frutos de arándanos.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un análisis de correlación entre las características genotípicas y fenotípicas empleando un mayor número de aislamientos para poder establecer alguna relación entre el genotipo y algunas características biológicas de *B. cinerea* en campos de arándano.
- Estudiar la sensibilidad a fungicida de los aislamientos pertenecientes a la población S presentes en los campos de arándanos de Chavimochic, ya que han sido relacionados con fenotipos multi-drogo resistentes en otras investigaciones y es necesario monitorear su frecuencia en campo.
- Replicar esta investigación añadiendo otras variables de estudio como son la virulencia y la sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *B. cinerea* en otras zonas productoras de arándanos para establecer estrategias de manejo eficaces del moho gris.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aktaruzzaman, M., Afros, T., Lee, Y.G., Kim, B.S. (2017). *Botrytis cinerea* is the causal agent of post-harvest grey mould rot on green bean (*Phaseolus vulgaris*) in Korea. *Australasian Plant Disease Notes*, 12(1). Recuperado de doi:10.1007/s13314-017-0261-6
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1998) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Edition, APS Press, St. Paul, 218 p.
- Beever, R.E., Weeds, P.L. (2004). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad, Y, Williamson, B, Tudzynski, P, and Delen, N. *Botrytis*, Biology, Pathology and Controls. Netherland, Kluwer Academic Publisher. p. 29-52
- Cooke, D.E.L., Duncan, J.M. (1997). Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research* 101(6), 667–677. Recuperado de doi:10.1017/s0953756296003218
- Copier, C., Auger, J., Rosales, I.M., Walker, A.S., Esterio, M. (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. Tesis para optar al título profesional de Ingeniera agrónoma y al grado de Magíster en ciencias agropecuarias con mención sanidad vegetal. Santiago, Chile. Universidad de Chile
- Cornejo, R. A., Serrato D., A., Rendón A., B. & Rocha M., M. G. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I), 255 pp
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. New York. United State of America. University Press. 1,262 p.
- Dewey, F.M., Grant-Downton, R. (2015). *Botrytis*-Biology, Detection and Quantification: In *Botrytis*- the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems. p. 17–34. Recuperado de doi:10.1007/978-3-319-23371-0_2

- Dewey, F.M., Grant-Downton, R. (2015). *Botrytis*-Biology, Detection and Quantification: In *Botrytis- the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*. p. 17–34. Recuperado de doi:10.1007/978-3-319-23371-0_2
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N. (2007). *Botrytis* spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems. In: Elad, Y, Williamson, B, Tudzynski, P, and Delen, N. *Botrytis*, Biology, Pathology and Controls. Netherland, Kluwer Academic Publisher. p.1–8. Recuperado de doi:10.1007/978-1-4020-2626-3_1
- Ellis, M.B. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute. p. 608.
- Espinosa de los Montes, M.C. (2006). Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Cádiz-España.
- Esterio, M. (2005). Caracterización genotípica y fenotípica de la forma esclerocial de *Botrytis cinerea* Pers. en cv. Thompson Seedless (*Vitis vinifera* L.) en dos localidades del valle central de Chile. Tesis de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención producción Frutícola. Santiago, Chile, Universidad de Chile. p.114.
- Faretra, F., Antonacci, E., Pollastro, S. (1988). Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Microbiol 134:2543-2550.
- Fournier, E, Levis, C, Fortini, D, Leroux, P, Giraud, T, Brygoo, Y. (2003). Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. Mycologia 95(2): 251-261. Recuperado de doi: 10.1080/15572536.2004.11833110
- French, E.R.; & Hebert, T.T. (1980). Métodos de Investigación Fitopatológica. Costa Rica, IICA. 289 p.
- Castellani A (1963). Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. Mycopathol et Mycol Appl ; 20: 1-6.
- Gaber, M.A., Wagih, E.E., Shehata, M.R., Fahmy, M.M., & Wahab, H.A. (2019). Detection and Characterization of *Botrytis cinerea* Isolates from Vegetables in Egypt. International Journal of Phytopathology.

- García, J.C.; García G.; Ciordia M. (2018). El cultivo de arándano en el norte de España. España, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Consejería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales Principado de Asturias. p.188.
- Garfinkel, A.R.; Lorenzini, M., Zapparoli, G. Chastagner, G.A. (2017). *Botrytis euroamericana*, a new species from peony and grape in North America and Europe. *Mycologia* 109(3): 495–507. Recuperado de doi:10.1080/00275514.2017.1354169
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque., C., Leroux, P, LoBuglio, K., Brygoo, Y. (1999). Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89: 967-973.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., Brygoo, Y. (1997). RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution* 14(11): 1177–1185. Recuperado de doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025727
- Gómez, R., Tatiana, (2013). Caracterización de aislamientos de *Botrytis cinerea* de rosas en la Sabana. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitopatología. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 88p.
- Gül E., Karakaya A. (2020). Prevalence of *Botrytis cinerea* in Tomato Greenhouses in Antalya Province of Turkey and Phenotypic Characterization of Isolates. In: Brka M., Omanović-Miklićanin E., Karić L., Falan V., Toroman A. (eds) 30th Scientific-Experts Conference of Agriculture and Food Industry. AgriConf 2019. IFMBE Proceedings, vol 78. Springer, Cham
- Harper, L.A., Derbyshire, M.C., López-Ruiz, F.J. (2019). Identification and characterization of *Botrytis medusae*, a novel cryptic species causing grey mould on wine grapes in Australia. *Plant Pathology*. Recuperado de: doi:10.1111/ppa.13005
- Hennebert, G.L. (1973). *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* 7(2):183-204.
- Hennebert, G.L., Groves, JW. (1963). Three new species of *Botryotinia* on Ranunculaceae. *Canadian journal of Botany* 41:341-365.
- Jarvis W.R.. (1980). Epidemiology. In: Coley-Smith J.R., Verhoeff K and Jarvis, W.R. (eds) *The Biology of Botrytis*. (pp. 219-250) Academic Press, London, UK

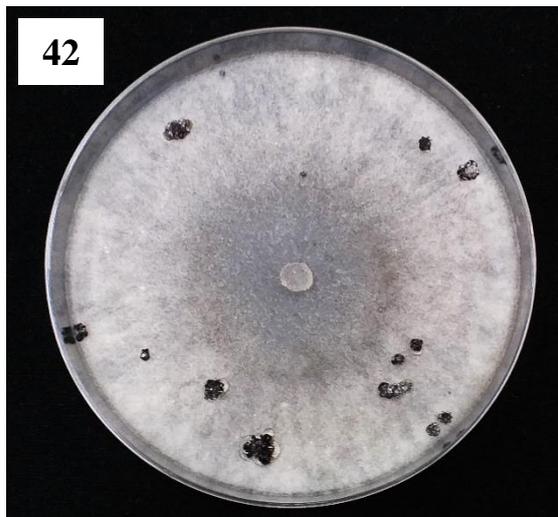
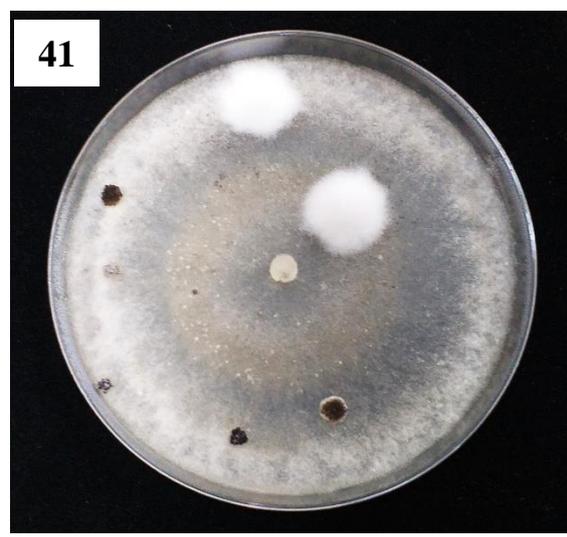
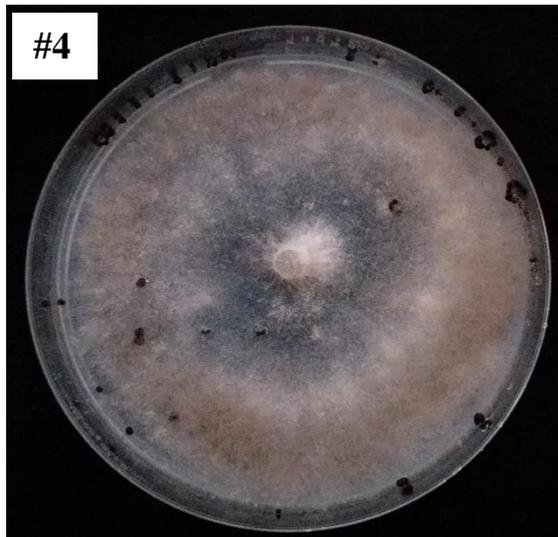
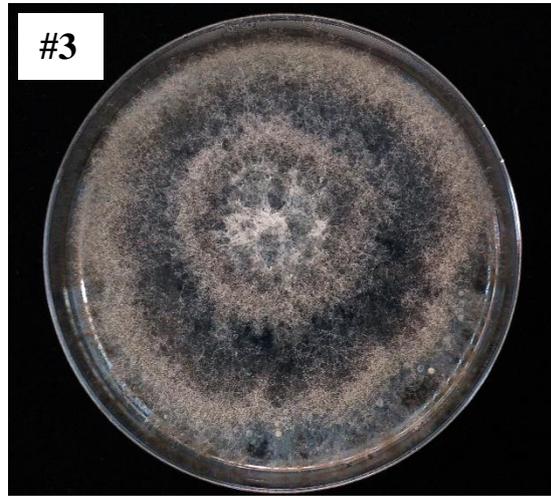
- Jarvis, W.R. (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity, A guide to the Literature. Ottawa, Canada, Canada Department of Agriculture. Monograph No. 15.
- Kumari, S., Tayal, P., Sharma, E., & Kapoor, R. (2014). Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates. *Microbiological research*, 169(11), 862-72 .
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, R.W.S., Kauff, F., Scalliet, G., Hahn, M. (2012). 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. Recuperado de doi:10.1128/aem.02655-12
- Levis, C., Fortini, D., Brygoo, Y. (1997). Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Mol. Gen. Genet.* 254:674-680.
- Llanos AK. (2017). Control de *Botrytis cinerea* Pers. en fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Aromas mediante fungicidas biológicos y químicos en Huaral. Tesis para obtener el título de ingeniero agrónomo. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 181 p.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., & Fermaud, M. (2003). Phenotypic Differences Between vacuina and transposon subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109(5): 479–488. Recuperado de doi:10.1023/a:1024222206991
- Medina, M., Sánchez, M. (2014). Producción y exportación de arándanos para estados unidos. Tesis para optar el grado en Magíster en Administración de Empresas. Lima, Perú. Universidad de ciencias aplicadas.
- Mirzaei, E.M., Goltapeh, M. Shams-bakhsh, N. Safaie, M. Chaichi (2009). Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. *J Phytopathol*, 157 (2009), pp. 474-482
- Muñoz, C., Talquenca, S.G., Oriolani, E., Combina, M. (2010). Genetic characterization of grapevine-infecting *Botrytis cinerea* isolates from Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 27:66-70
- Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., Giraud, T. (2002). Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycol. Res.* 106: 594-601.
- Pei, Y., Tao, Q., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Li, Z., Qi, X., Xu, J., Zhang, M., Chen, H., Chang, X., Tang, H., Sui, L., and Gong, G. 2019. Phenotypic and genetic

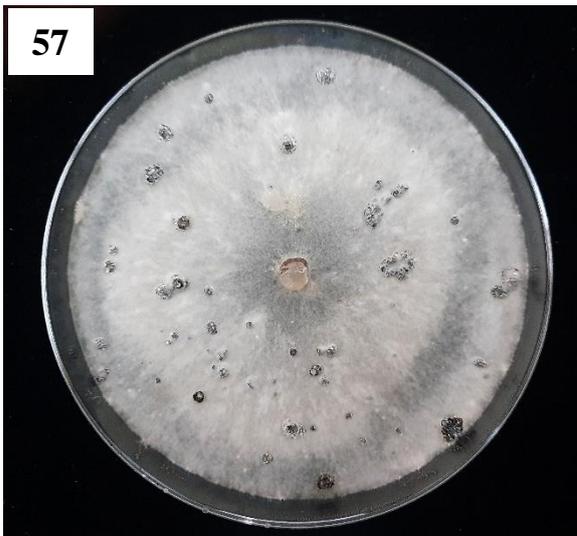
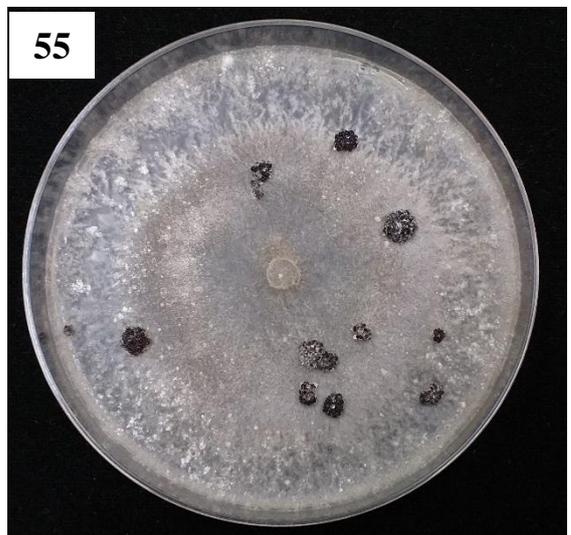
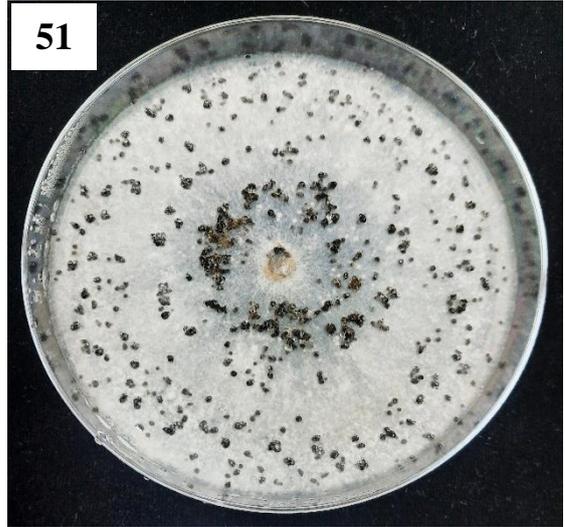
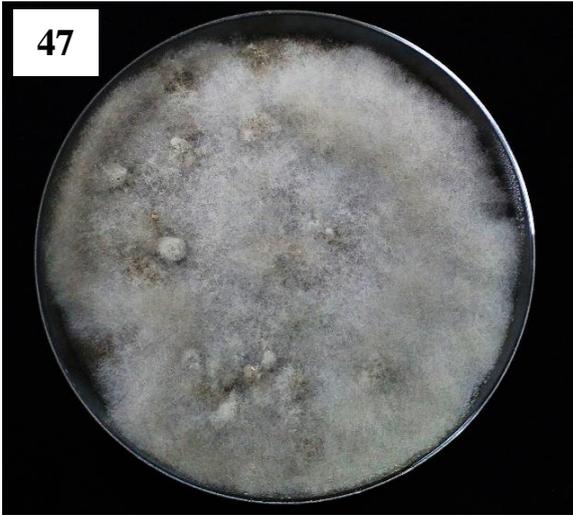
- characterization of *Botrytis cinerea* population from kiwifruit in Sichuan Province, China. *Plant Dis.* 103: 748-758
- Plesken, C., Weber, R.W.S., Rupp, S, Leroch, M., Hahn, M. (2015). *Botrytis pseudocinerea* is a Significant Pathogen of Several Crop Plants but Susceptible to Displacement by Fungicide-Resistant *B. cinerea* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 81(20), 7048–7056. Recuperado de doi:10.1128/aem.01719-15
- Posada C. (2019). Arándanos, producto estrella de agroexportación. La Cámara, Lima, Perú, 10 Jun. 2019 Consultado 9 Feb. 2020. Disponible en https://www.camaralima.org.pe/repositorioaps/0/0/par/r882_3/comercio%20exterior.pdf
- Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., Viret, O. (2002). Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea*. In Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:169-174
- Rupp, S.; Plesken, C.; Rumsey, S.; Dowling, M.; Schnabel, G.; Weber, R.; Hahn, M. (2017). *Botrytis fragariae*, una nueva especie que causa moho gris en las fresas, muestra altas frecuencias de resistencia a fungicidas específicos y a base de eflujo. *Microbiología aplicada y ambiental* 83 (9), e00269-17. Recuperado de doi: 10.1128 / AEM.00269-17
- 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. Recuperado de doi:10.3389/fmicb.2016.02075
- Saito, S., Michailides, T.J., Xiao C.L. (2014). First Report of *Botrytis pseudocinerea* Causing Gray Mold on Blueberry in North America. *Plant Disease* 98(12): 1743-1743.
- Saitoh, K., Togashi, K., Tsutomu A., Teraoka, T. (2006). A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology.* 72. 348-350. 10.1007/s10327-006-0300-1.
- Staats, M., van Baarlen P., van Kan J.A. (2004). Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22(2): 333–346. Recuperado de doi:10.1093/molbev/msi020

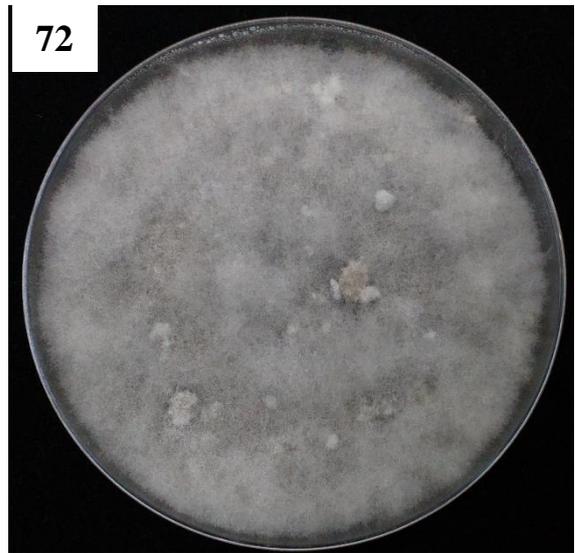
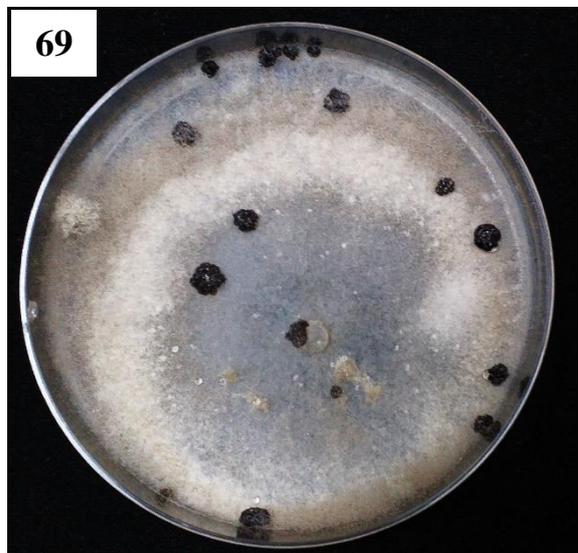
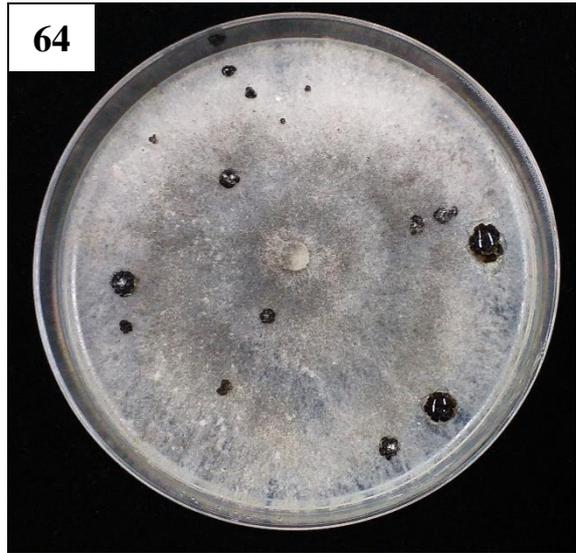
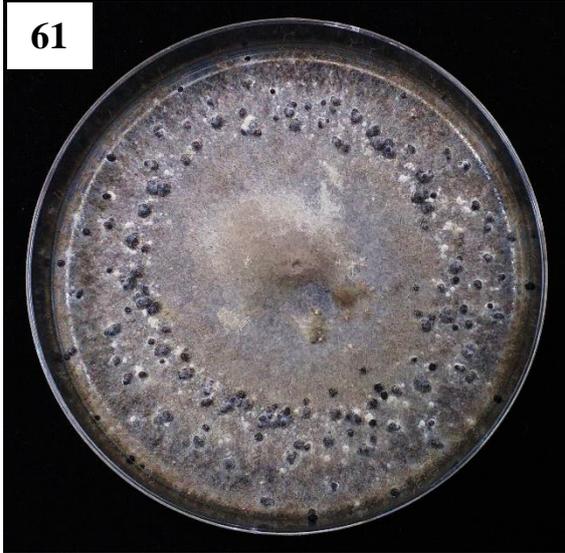
- Terrones, J., Nieto, D., Nava, C., Téliz, D., García, R., Vallejo, M., Sánchez, P. (2019). *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology* 37(3).
- Valero-Jiménez, C.A., Veloso, J., Staats, M., Van Kan, J.A.L. (2019). Comparative genomics of plant pathogenic *Botrytis species* with distinct host specificity. *BMC Genomics* 20(1). Recuperado de doi:10.1186/s12864-019-5580-x
- van Kan, J.A.L., Duarte, J., Dekkers, E., Dyer, P.S., Kohn, L.M. (2010). The *Botrytis cinerea* mating type loci. Cadiz, Spain. XV International *Botrytis* ´ symposium
- Vega M. 2020. Perú destrona a Chile como mayor exportador de arándanos en (2019) (en línea). *Biobiochile, Chile*, 6 Feb. 2020 Consultado 10 Feb. 2020. Disponible en <https://www.biobiochile.cl/noticias/nacional/chile/2020/02/06/peru-destrona-a-chile-como-mayor-exportador-de-arandanos-en-2019.shtml>
- Walker, A.S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., Dupont J., Fournier, E. (2011). *Botrytis pseudocinerea*, a New Cryptic Species Causing Gray Mold in French Vineyards in Sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101(12): 1433–1445. Recuperado de doi:10.1094/phyto-04-11-0104
- 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. Recuperado de doi:10.1007/bf03356376
- White, T.J., Bruns, T, Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Academic Press*. 315–322.
- Zhang, Y., Li, X., Shen, F, Xu, H., Li, Y., Liu, D. (2018). Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from grape Vineyards in China. *Plant Disease* 102(1): 40–48. Recuperado de doi:10.1094/pdis-01-17-0062-re
- Zhou, Y.J.1, 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. Recuperado de doi:10.3852/13-032.

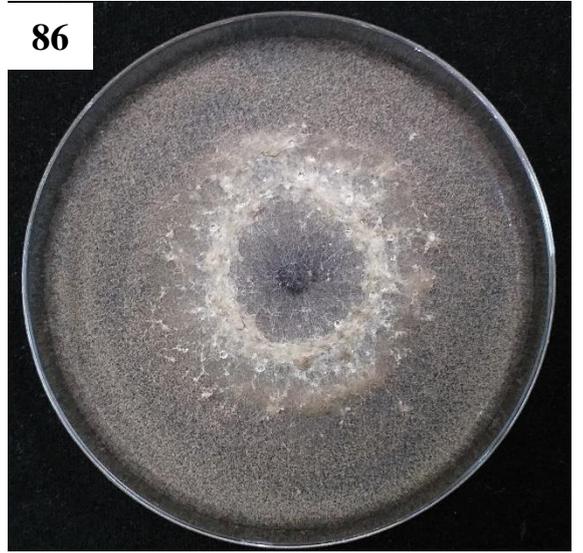
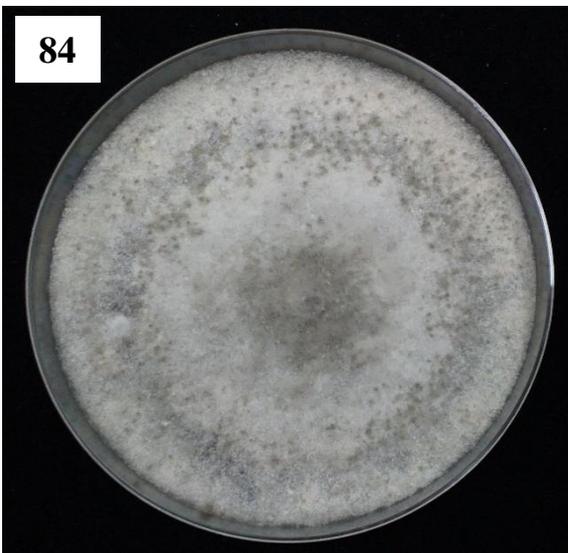
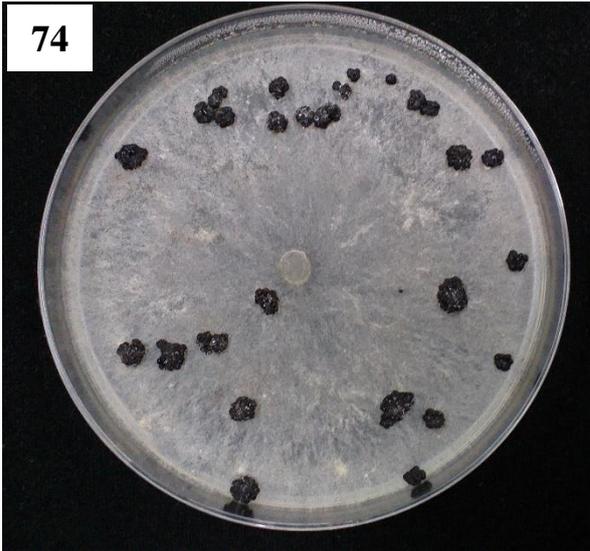
VIII. ANEXOS

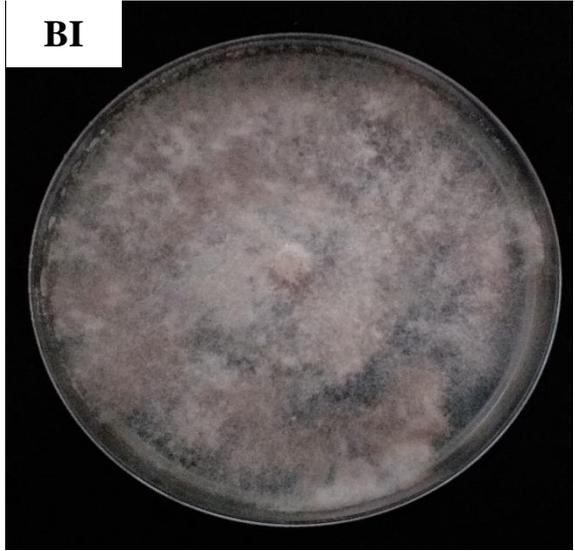
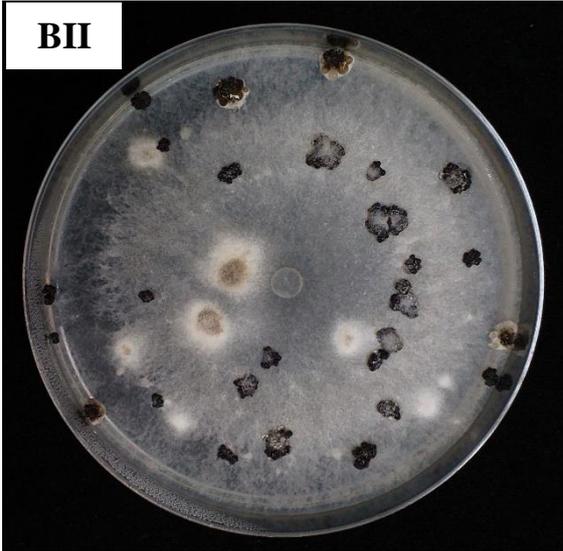
Anexo 1: Colonias de aislamientos *B. cinerea* recuperados de flores y frutos de arándanos.











Anexo 2: Anva del crecimiento del diámetro de aislamientos de *B. cinerea* a diferentes temperaturas (5, 15, 20, 25 y 28°C)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aislamiento	27	2719.8	100.73	667.76	0.000
Temperatura	4	21449.2	5362.30	35547.11	0.000
Aislamiento*Temperatura	108	1682.0	15.57	103.24	0.000
Error	280	42.2	0.15		
Total	419	25893.2			

Anexo 3: Prueba Tukey del Crecimiento del diámetro de aislamientos de *B. cinerea* procedentes de cultivos de arándanos de Chavimochic.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Temperatura	N	Media	Agrupación
20	84	23.0657	A
25	84	21.9229	B
15	84	19.3581	C
28	84	10.9576	D
5	84	4.4391	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Aislamiento	N	Media	Agrupación
92	15	19.3153	A
42	15	18.6056	B
46	15	18.2292	B C
72	15	17.8486	C D
89	15	17.4069	D E
59	15	17.3792	D E
91	15	17.2389	E F
61	15	17.2375	E F
51	15	17.2281	E F
55	15	17.1750	E F
67	15	16.9667	E F G
75	15	16.8181	F G H
86	15	16.7619	F G H I
57	15	16.5903	G H I J
84	15	16.5500	G H I J
71	15	16.3861	H I J
47	15	16.2556	I J K
#1	15	16.1806	J K
52	15	16.1194	J K
74	15	16.0931	J K
76	15	15.8361	K
41	15	15.7750	K
64	15	15.1389	L
#3	15	15.0639	L
77	15	14.0333	M
69	15	11.1083	N
BII	15	9.9528	O
BI	15	7.2694	P

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 4. Secuencias obtenidas del NCBI para la elaboración del árbol Filogenético y secuencias de las regiones interna transcrita (ITS) de los aislamientos de *Botrytis cinerea*.

>*Botrytis cinerea* 42

TGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTAT
TACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAAACTC
TTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGA
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTTCAGTAATGGCAGGCTCTAA
AATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTG
TGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG
AACTTAAGCATAT

>*Botrytis cinerea* 61

TGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTAT
TACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAAACTC
TTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGA
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTTCAGTAATGGCAGGCTCTAA
AATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTG
TGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG
AACTTAAGCATAT

>*Botrytis cinerea* 64

TGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTAT
TACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAAACTC
TTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGA
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTTCAGTAATGGCAGGCTCTAA
AATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTG
TGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG
AACTTAAGCATAT

>*Botrytis cinerea* 75

TGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTAT
TACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAAACTC
TTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGA
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTTCAGTAATGGCAGGCTCTAA

AATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTG
TGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTG
AACTTAAGCATAT

> *KP234034 Botrytis cinerea* Bci-18

GGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTAC
TTTGTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACCTCTTT
TTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTGAGCG
TCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAAT
CAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGC
TTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCG

> *AJ716294 Botrytis cinerea* SAS56

CATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCT
TTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACCTCTTTTTATTAATG
TCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAAC
CCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGG
CGCCGCTGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAA
ACCCAAATTTTTCTATGGTTGACC

> *JX840480 Botrytis cinerea* RSL-1

GGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAG
TTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCT
GCCTTTGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACCTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGT
ACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTT
AGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGG
TCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTT
TTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAA

> *KY817366 Botrytis cinerea* BGM005

ATTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTC
CCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCC
AGAGAATACCAAACCTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGG
GGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCA

GTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTC
GTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAG
GTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAT

> *KJ937047 Botrytis cinerea X793*

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCC
ACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAG
AGAATACCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGT
AATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGT
TACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

> *AJ716303 Botrytis fabae CBS109.57*

ATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCC
TTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACT
ATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGC
TTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCC
TGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTTC
TATGGTT

> *EU519204 Botrytis fabiopsis BC-2*

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCC
ACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAG
AGAAAACCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGT
AATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGT
TACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

> *EU563122 Botrytis fabiopsis BC-13*

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCC
ACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAG
AGAAAACCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGG

GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGT
AATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGT
TACAGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

> AJ716295 *Botrytis aclada* PRI006

CATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCT
TTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGCATGCTCGCCAGAGAAAACCAAACTCTTTTTATTAAT
GTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCG
GCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAA
AACCCAAATTTTTCTATGGTTGACC

> AJ716302 *Botrytis calthae* CBS175.63

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCC
TTCGGGCCTTGCCTGCTCGCCAGAGGATACCAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACT
ATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAG
CTTGGTATTGAGTCCATGTCAGCAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCCGCTGGGTCC
CTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTT
CTATGGTT

> AJ716304 *Botrytis convoluta* 9801

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCC
TTCGGGTCTTGTATGCTCGCCAGAGAAAACCAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACT
ATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGC
TTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCCGCTGGGTCC
TGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTT
TATGGTT

> AJ716298 *Botrytis paeoniae* 0003

CATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCT
TTGGCGAGCTGCCCTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAAAACCAAACTCTTTTTATTAAT
GTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCG

GCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAA
AACCCAAATTTTTCTATGGTTGACC

> AJ716300 *Botrytis elliptica* BE9714

CATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCT
TTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAAAACCAAACCTTTTTATTAAT
GTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCG
GCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAA
AACCCAAATTTTTCTATGGTTGACC

> AJ716291 *Botrytis polyblastis* CBS287.38

CATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCT
TTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCATGTATGCTCGCCAGAGAAAACCAAACCTTTTTATTAAT
GTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCG
GCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAA
AACCCAAATTTTTCTATGGTTGACC

> AJ716296 *Botrytis ficariarum* CBS176.63

CATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCT
TTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAAAACCAAACCTTTTTATTAAT
GTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCG
GCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAA
AACCCAAATTTTTCTATGGTTGACC

> AJ716299 *Botrytis squamosa* PRI026

CATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTATATTATTACTTTGTTGCT
TTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAAAACCAAACCTTTTTATTAAT
GTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCG
GCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAA
AACCCAAATTTTTCTATGGTTGACC

> AJ716301 *Botrytis tulipae* 9830

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCC
TTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAAAACCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACT
ATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGC
TTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCC
TGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTC
TATGGTT

> AJ716295 *Botrytis aclada* PRI006

CATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCT
TTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGCATGCTCGCCAGAGAAAACCAAAACTCTTTTTATTAAT
GTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCG
GCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAA
AACCCAAATTTTTCTATGGTTGACC

> AJ716290 *Botrytis pelargonii* CBS497.50

CATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCT
TTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAAACTCTTTTTATTAATG
TCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAAC
CCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGG
CGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAA
ACCCAAATTTTTCTATGGTTGACC

> AJ716303 *Botrytis fabae* CBS109.57

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCC
TTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACT
ATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGC
TTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGCTGGGTCC
TGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTC
TATGGTT

> HQ455788 *Botrytis cinerea* KACC 45439

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCC
ACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTTGGGCCTTGTATGCTCGCCAG
AGAATACCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGT
AATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGT
TACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

> FJ169666 *Botrytis cinerea* LeekBC-8

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCC
ACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTTGGGCCTTGTATGCTCGCCAG
AGAATACCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGT
AATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGT
TACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

> KJ744364 *Sclerotinia sclerotiorum* PM27

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACC
CTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCTCTTCGGGGCCTTGTATGCTCGCCAGA
GAATATCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGG
CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTATTGAGTCCATGTCAGTAA
TGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTA
CAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAG
GGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATCTCTGT