

# CARACTERISTICAS CULTURALES Y BIOLOGICAS EN CEPAS DE *Botrytis cinerea* PERS. EX FR., AISLADAS EN LA IX Y X REGIONES<sup>1</sup>

## Cultural and biological characteristics of isolates of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. obtained from the IX and X Regions

Angela Tortora U.<sup>2</sup>, Luigi Ciampi P.<sup>2</sup> y Susana González M.<sup>2</sup>

### SUMMARY

A research was carried out to study and cultural and biological characteristics of *Botrytis cinerea* with the objective to find degrees of variability among the fungus-isolates obtained from different localities. *B. cinerea* was isolated from five plant species of economic importance in the region: blackberries (*Rubus constrictus* Lef. et M.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), eucalyptus (*Eucalyptus globulus* L.), raspberries (*Rubus idaeus* L.) and strawberries (*Fragaria x ananassa* D.). Samples were collected in 21 localities, from Loncoche (39° S in the IX Region to Ancud (42° S) in the X Region.

The strains biological characteristics were *in vitro* compared in relation to: conidia size sclerotia dry matter and virulence and cultural characteristics such as color, mycelium development capacity, maturity time and number of sclerotia. Statistical comparisons were carried out among isolates obtained from different localities. Results showed statistically significant differences for all the characteristics studied and also for daily growth values. It was not possible to find a statistically significant relation between parasite and locality. The only character that did not show variability among localities of the evaluated strains of *B. cinerea* was sclerotium dry matter.

Among biological characteristics the virulence test made on apple pieces showed a very scarce variability, only small differences were observed in the *B. cinerea* strains evaluated. Nevertheless, significant differences were observed in the sporulation capacity of all isolates. It was relevant that all Cayumapu specimens did not sporulate *in vitro*, and showed the formation of white mycelium.

**Key words:** blackberries, blueberries, eucalyptus, raspberries, strawberries, *Botrytis cinerea*, raspberry grey mold, botritis.

### INTRODUCCION

El sector agrícola y forestal del sur de Chile ha experimentado profundos cambios durante los últimos años, destacándose entre éstos un aumento sustancial de plantaciones de arbustos frutales (frambuesas e híbridos, moras, parrillas, groselleros y arándanos) como de especies forestales (eucalipto y pino), las cuales juegan un rol muy importante en el desarrollo silviagropecuario de la zona.

Las condiciones ambientales predominantes de la región favorecen la amenaza permanente de agentes fitopatógenos, que pueden afectar, en distintas etapas, el ciclo de vida de los recursos existentes.

Entre las enfermedades causadas por hongos se destaca *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., siendo uno de los patógenos más comunes y más ampliamente distribuidos tanto a nivel nacional como mundial (Latorre, 1988). La gran importancia de este patógeno radica en ser un organismo cosmopolita y genéticamente heterogéneo (Hansen y Smith, 1932). *B. cinerea* representa un serio problema tanto a nivel de campo como en postcosecha, debido a la capacidad que tiene de presentar estado de latencia por un largo período (Jarvis, 1962 y Williamson, McNicol y Dolan, 1987) y a la alta potencialidad destructiva, particularmente en zonas con primaveras y veranos muy húmedos, condiciones presentes en el sur de Chile.

En la actualidad, el control de este patógeno se ha enfrentado principalmente con varias aplicaciones de fungicidas, sin embargo, esta práctica ha dado como resultado que se presenten razas de *B. cinerea* resistentes a fungicidas. Este fenómeno es

<sup>1</sup>Recepción de originales: 21 de enero de 1994.  
Estudio realizado con el aporte de un proyecto FONDECYT 52-92 y DID-UACH.  
<sup>2</sup>Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

debido a que esta especie posee una alta tasa de variabilidad (Lorbeer, 1980). De acuerdo a estas características, *B. cinerea* proporciona un excelente ejemplo para el estudio de la variabilidad, donde es posible visualizarla en un momento como un grupo de numerosas razas o cepas morfológicamente agrupadas en una planta hospedera, pero *in vitro* muestra notables y constantes diferencias culturales. A este respecto, Paul (1929); Hansen y Smith (1932) y Gindler (1979) establecen, que la variabilidad es posible explicarla principalmente por la condición del micelio, el cual está formado por segmentos que contienen numerosos núcleos, fenómeno denominado heterocariosis.

En base a estos antecedentes, este trabajo tiene como objetivo esencial determinar características culturales y biológicas de *B. cinerea* que permitan establecer rasgos de variabilidad entre un gran número de cepas aisladas desde localidades pertenecientes a la IX y X Región de Chile. De acuerdo a esta perspectiva, el presente trabajo de investigación contempló los siguientes objetivos específicos: a) comparar características biológicas y fitopatológicas, tales como: tamaño de conidias, virulencia y materia seca de esclerocios, entre cepas de *B. cinerea*, y, b) comparar características culturales tales como: color y capacidad de crecimiento miceliar, tiempo de maduración y número de esclerocios, entre cepas de *B. cinerea*.

## MATERIALES Y METODOS

### Aislamiento de cepas de *B. cinerea*

El material para la obtención de las cepas de *B. cinerea* fue recolectado entre enero y abril de 1992, de 21 localidades entre Loncoche y Ancud, repartidos en los siguientes hospederos: 3 muestras de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), 5 de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.), 11 de frambuesa (*Rubus idaeus* L.), 2 de frutilla (*Fragaria x ananassa* D.) y 6 de mora (*Rubus constrictus* Lef. et M.). Se obtuvieron 5 submuestras o cepas por hospedero y localidad, recolectando principalmente frutos, hojas y ramillas con síntomas y/o signos, y abarcando toda la superficie del cultivo.

De las muestras que presentaban signos del patógeno, se aisló directamente usando como medio de cultivo agar papa dextrosa (APD), confeccionado en base a 20 g de agar, 12,5 g de glucosa, 200 g de papa y 1.000 ml de agua destilada. Los frutos y otras partes vegetales, tales como hojas y ramillas que sólo presentaban síntomas, se colocaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente por 3 a 4 días. Una vez desarrollados los signos, se

procedió a aislar el hongo en placas APD. Posteriormente, las placas fueron depositadas en estufa de cultivo a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C y repicadas hasta la obtención de cultivos puros de *B. cinerea*, los cuales fueron mantenidos en tubos con APD inclinados, sellados con parafina sólida y almacenados en refrigerador a 4 °C.

### Determinación de las características biológicas y culturales de cepas de *B. cinerea*

De cada cepa mantenida en tubo se repicó a placas con APD en duplicado, las que se mantuvieron posteriormente en una estufa de cultivo a  $22 \pm 2$  °C, por 2 días. A partir del segundo día, se obtuvo un trozo desde la zona de avance mediante un sacabocado de 4 mm de diámetro. El disco de agar se depositó centralmente sobre las placas con 14 ml de medio APD (Difco) cada una, dejando el micelio en contacto con el agar, incubándose durante 2 días en una estufa a  $22 \pm 2$  °C. El estudio de la variabilidad de las cepas de *B. cinerea* se realizó a partir de estos cultivos puros, colocando cada disco obtenido de la zona de avance de la colonia, con un sacabocado de 4 mm en placas APD con 14 ml de medio por placa, centralmente, con el micelio en contacto con el agar. Por cada cepa se realizaron tres repeticiones, para, finalmente, incubar la totalidad de las placas en una misma estufa a  $22 \pm 2$  °C. Para cada cepa aislada de *B. cinerea*, se examinaron las siguientes características:

**Crecimiento diario.** Se cuantificó a través del área de crecimiento cada 24 hr, marcando el perímetro de la zona de avance de la colonia con un lápiz permanente sobre la placa. Posteriormente, se calculó el área de crecimiento de cada cepa.

**Tiempo de maduración, número y materia seca de los esclerocios.** La madurez de los esclerocios fue determinada a través de cambios en la coloración de éstos. Se consideró que los esclerocios estaban maduros cuando alcanzaban una coloración oscura (Backhouse y Willets, 1984).

Los esclerocios fueron contados a los 18 días de sembradas las placas, una vez que todos los esclerocios de las cepas alcanzaron su madurez. Todos los esclerocios fueron recolectados individualmente por cepa a los 24 días desde la siembra. Fueron lavados con agua destilada para eliminar residuos de micelio y agar, se dejaron secar por 24 hr a temperatura ambiente y luego se pesaron individualmente por cepa. Los esclerocios fueron depositados en una estufa de secado a 105 °C por 63 hr y mediante la diferencia de peso fue calculada la materia seca de los esclerocios.

**Tamaño de conidias.** Después de 12 días de cultivo, se colectaron las conidias de cada cepa y se realizaron preparaciones permanentes con lactofenol más azul de algodón. Fueron medidas un total de 50 conidias por cepa y para la medición se utilizó un microscopio (Zeiss).

**Color del micelio.** Para cada cepa de *B. cinerea* aislada, el color se comprobó con una carta de colores (The Royal Horticultural Society, 1966) usando las tonalidades de gris y blanco.

**Prueba de virulencia.** Esta prueba se realizó sobre trozos obtenidos de manzanas, cv. Granny Smith, las cuales fueron lavadas con hipoclorito de sodio al 5% por 5 min; luego, fueron enjuagadas con agua destilada estéril y secadas con papel absorbente estéril. Los trozos de manzana fueron cortados uniformemente con un sacabocado de 16 mm de diámetro por 35 mm de largo. Se colocó sobre estos trozos un disco de APD de 4 mm de diámetro, el cual se obtuvo de la zona de crecimiento de la colonia de *B. cinerea* de 3 días. Los trozos de manzana fueron depositados sobre placas Petri estériles de 40 mm de diámetro. Las placas abiertas fueron colocadas, a su vez, sobre bandejas plásticas adaptadas como cámaras húmedas. Cada bandeja contenía 5 cepas por localidad con 3 repeticiones, más 3 placas donde los trozos de manzana contenían sólo agar, los cuales sirvieron como testigos. Las bandejas fueron incubadas por 5 días a  $20 \pm 2$  °C. Sobre los trozos de manzanas se midió la resistencia eléctrica a través de un voltímetro, para esto se introdujo en cada extremo de los trozos de manzana un par de electrodos. Posteriormente, se aisló el hongo en placas APD, para cumplir con los postulados de Koch.

#### Diseño y análisis estadístico

Se utilizó como diseño estadístico bloques completos al azar con tres repeticiones. Se realizaron análisis de variancia para determinar las diferencias entre las cepas *B. cinerea* de cada localidad en estudio. Los promedios fueron comparados con la prueba de hipótesis específica de Tukey para el nivel de significancia del 5%.

## RESULTADOS

### Aislamiento de las cepas de *B. cinerea*

A partir de frutos y tejido vegetal infectado con *B. cinerea*, se obtuvieron tres cultivos puros por cepa realizadas a partir de las 135 submuestras obtenidas. El hongo fue aislado de material procedente

de 21 localidades de la zona sur de Chile a partir de 5 hospederos diferentes. Los aislamientos fueron realizados durante el período comprendido entre enero y abril de 1992.

### Características biológicas y culturales de las cepas de *B. cinerea* aisladas

Las cepas de *B. cinerea* aisladas, 135 en total, fueron comparadas en cuanto a características biológicas y culturales, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a la localidad y hospedero en que éstas fueron recolectadas.

### Crecimiento diario de las cepas de *B. cinerea*.

Las observaciones fueron realizadas durante tres días. Los resultados de estas mediciones se presentan en el Cuadro 1, donde es posible observar las diferencias que existen en el crecimiento micelial, entre las cepas de cada localidad. Se puede observar que las cepas de *B. cinerea* de las localidades en estudio, presentaron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo diario del micelio. Las cepas de *B. cinerea* provenientes de la localidad de Ancud, fueron las que presentaron el crecimiento más lento. Al comparar las cepas aisladas de los diferentes hospederos, es posible observar (Cuadro 2), que existen diferencias significativas, puesto que las cepas aisladas de frambueso y mora son las que presentan una mayor área de crecimiento diario.

### Formación de esclerocios maduros de *B. cinerea*.

Se detectó que existe variación en relación a los días en que los esclerocios demoran en llegar a un estado maduro. En el Cuadro 1, se observa variación en el tiempo de maduración de los esclerocios formados por las cepas aisladas de los distintos lugares estudiados. Las cepas de las localidades de La Unión, Ancud, Máfil, La Peña, Huellahue, Panguipulli, Santa Rosa, Berries and Sprouts, Cayumapu, Los Lagos, Tecnofrío, Santa Elvira, Sociedad Agrícola Antilhue y San José, requirieron de un mayor tiempo para que los esclerocios se formaran y maduraran, no mostrando diferencias significativas entre sí.

**Número de esclerocios.** Existieron diferencias significativas en el número de esclerocios que fueron capaces de formar las cepas de *B. cinerea*, de las distintas localidades (Cuadro 1). El promedio de las cepas de las localidades de La Dehesa, Tecnofrío, El Arenal, La Peña, Cudico presentaron el mayor número de esclerocios, siendo estadísticamente iguales entre sí. Al observar estos resultados, es posible establecer que las cepas de *B. cinerea*, en general, presentaron un alto grado de variabilidad.

**CUADRO 1. Valor promedio del área de crecimiento del micelio, tiempo de maduración, número y materia seca de los esclerocios y resistencia eléctrica sobre trozos de manzana inoculadas con cepas de *Botrytis cinerea* agrupadas por localidad**

**TABLE 1. Average surface growth of mycelium, maturation time, number and dry weight of sclerotia and electric resistance on apple pieces inoculated with *Botrytis cinerea* strains grouped by locality**

Localidad	Area de crecimiento del micelio (cm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	Tiempo de maduración de los esclerocios (días) <sup>1</sup>	Número de esclerocios <sup>1</sup>	Materia seca de esclerocios (%) <sup>1</sup>	Resistencia eléctrica (Ω) <sup>1</sup>
<b>IX Región</b>					
Soc. Agric. Antilhue	19,1 ab <sup>2</sup>	11,3 abcde <sup>2</sup>	51,8 bcdef <sup>2</sup>	84,4 N.S.	54,5 bc <sup>2</sup>
Tecnofrío	18,3 abcd	11,4 abcde	72,3 ab	82,4 N.S.	48,1 bc
<b>X Región</b>					
Santa Rosa	18,7 abc	13,0 abcd	50,8 bcdef	82,9 N.S.	40,0 bc
Panguipulli	18,8 abc	13,3 abcd	33,8 ef	84,7 N.S.	64,1 ab
Santa Elvira	18,9 abc	11,3 abcde	51,2 bcdef	83,8 N.S.	39,9 bc
Los Lagos	20,0 a	11,6 abcde	49,2 bcdef	84,9 N.S.	26,4 c
Berries and Sprouts	18,9 abc	12,5 abcde	63,1 bcde	84,4 N.S.	47,0 bc
La Unión	17,7 abcd	14,8 a	56,0 bcdef	84,5 N.S.	46,2 bc
Cudico	16,9 bcd	9,5 e	66,0 abcd	84,7 N.S.	38,9 bc
Futrone	18,6 abc	10,1 cde	63,0 bcde	84,5 N.S.	41,5 bc
San José	16,2 cd	11,2 abcde	44,7 bcdef	84,0 N.S.	47,6 bc
Máfil	17,8 abcd	13,9 ab	27,9 f	80,0 N.S.	53,1 bc
Peichuquín	18,6 abc	10,6 bcde	54,9 bcdef	84,6 N.S.	55,5 bc
La Dehesa	19,9 abc	9,5 e	98,5 a	83,6 N.S.	59,9 bc
La Peña	15,7 d	13,4 abc	66,3 abcd	85,1 N.S.	36,5 bc
El Arenal	16,5 bcd	9,6 de	67,3 abc	84,4 N.S.	56,1 bc
La Quila	17,3 abcd	9,6 de	31,9 f	84,4 N.S.	39,6 bc
Huellethue	17,6 abcd	13,4 abc	41,4 bcdef	84,1 N.S.	32,4 bc
Cayumapu	17,2 abcd	12,3 abcde	57,8 bcde	84,6 N.S.	38,9 bc
Pichoy	17,2 abcd	11,0 bcde	28,5 f	85,9 N.S.	38,4 bc
Ancud	8,7 e	14,6 a	57,5 bcdef	83,7 N.S.	65,9 ab
Testigo					95,4 a

<sup>1</sup>Cada valor representa el promedio de todas las cepas aisladas en la localidad.

<sup>2</sup>Medias con distintas letras difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ), según hipótesis específica de Tuckey.

N.S.: Cifras no significativas entre el promedio de las cepas de cada localidad.

**CUADRO 2. Valor promedio del crecimiento diario de las cepas de *Botrytis cinerea* agrupadas por hospedero**

**TABLE 2. Daily growth average of *Botrytis cinerea* isoaltes grouped by host**

Hospedero	Area de crecimiento diario <sup>1</sup>
Frambuesa	18,5 a
Mora	18,5 a
Arándano	16,9 b
Frutilla	16,0 c
Eucalipto	15,5 c

<sup>1</sup>Columnas con distinta letra difieren significativamente ( $P > 0,05$ ) según hipótesis específica de Tuckey.

**Materia seca de los esclerocios.** No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el promedio de las cepas por localidad (Cuadro 1).

**Tamaño de las conidias.** El tamaño de las conidias de las cepas aisladas presentaron una gran variación, siendo el promedio de las cepas de la localidad de El Arenal, las que presentaron las conidias más largas y más anchas y, por ende, las de mayor tamaño (Cuadro 3). Una característica importante de destacar fue lo sucedido en la localidad de Cayumapu, donde el total de las cepas (5) aisladas de esa localidad, no fueron capaces de formar conidias *in vitro*, presentando las cepas un micelio color blanquecino.

CUADRO 3. Valor promedio del tamaño de las conidias correspondiente a las cepas de *Botrytis cinerea* agrupadas por localidad

TABLE 3. Average value of conidial size of *Botrytis cinerea* isolates grouped by locality

Localidad	Tamaño de las conidias <sup>1</sup>	
	Largo (μ)	Ancho (μ)
<b>IX Región</b>		
Tecnofrío	8,5 h <sup>2</sup>	6,6 h <sup>2</sup>
Soc. Agríc. Antihue	9,0 fgh	7,1 fg
<b>X Región</b>		
Santa Rosa	9,7 cdefg	7,7 bcdef
Panguipulli	8,9 gh	7,3
Santa Elvira	9,5 defg	7,5 cdefg
Los Lagos	9,1 fgh	7,3 efg
Berries and Sprouts	9,5 defg	7,6 bcdefg
La Unión	10,0 cde	8,0 bc
Cudico	10,5 bc	8,2 b
Futrono	10,0 cde	8,0 bcde
San José	10,0 cde	8,0 bcd
Máfil	8,9 gh	7,0 g
Pelchuquín	9,4 defg	7,5 cdefg
La Dehesa	9,5 defg	7,6 bcdefg
La Peña	9,4 defg	7,2 efg
El Arenal	11,6 a	9,2 a
La Quila	10,2 bcd	8,3 b
Huellehue	9,2 efg	7,1 fg
Cayumapu <sup>3</sup>	-	-
Pichoy	9,9 cdef	7,9 bcde
Ancud	10,9 ab	7,9 bcde

<sup>1</sup>Cada valor representa el promedio de todas las cepas aisladas en la localidad.

<sup>2</sup>Columnas con distinta letra difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ) según hipótesis específica de Tuckey.

<sup>3</sup>No presentan esporulación las cepas aisladas de esta localidad.

CUADRO 4. Cepas de *Botrytis cinerea* agrupadas según el color de micelio de acuerdo a la carta de colores de la Royal Horticultural Society

TABLE 4. *Botrytis cinerea* isolates grouped according to mycelium color in concordance to the Royal Horticultural Society color chart

Localidad	Color del micelio			
	Grupo de color			
	Verde-grisáceo	Blanco-grisáceo	Amarillo-grisáceo	Blanco
<b>IX Región</b>				
Soc. Agrícola				
Antihue	3	1	0	1
Tecnofrío	1	4	0	0
<b>X Región</b>				
Santa Rosa	4	1	1	4
Panguipulli	3	2	0	1
Santa Elvira	3	1	0	1
Los Lagos	0	5	0	0
Berries and Sprouts	4	6	0	0
La Unión	3	7	0	0
Cudico	2	2	0	1
Futrono	1	4	0	0
San José	4	5	2	4
Máfil	0	3	1	1
Pelchuquín	6	4	0	0
La Dehesa	2	3	0	0
La Peña	3	1	1	0
El Arenal	1	0	1	3
La Quila	1	0	0	4
Huellehue	2	3	0	0
Cayumapu	1	0	1	3
Ancud	1	0	1	3
Pichoy	2	2	1	0

**Color del micelio.** Como se observa en Cuadro 4, las cepas presentaron diferentes colores de micelio, destacándose el color gris, sin embargo, otro color que predominó en el micelio entre las cepas estudiadas fue el color blanco, encontrándose principalmente en aquellas cepas que no fueron capaces de formar la fase conidial *in vitro*.

**Virulencia.** El testigo fue el que presentó mayor resistencia al paso de la electricidad, siendo estadísticamente igual a las cepas correspondientes a las localidades de Ancud y Panguipulli, sin embargo, las cepas de estas dos localidades fueron estadísticamente iguales que el resto de las cepas de las localidades estudiadas, con excepción de las cepas de la localidad de Pichoy (Cuadro 1).

**Hospedero.** Al agrupar las cepas de *B. cinerea* de acuerdo al hospedero del cual fueron aisladas, y al analizar su tasa de crecimiento diario es posible apreciar (Cuadro 2) que hay diferencias significativas entre las cepas. Siendo las aisladas de frambuesa y mora las que tienen un área de crecimiento diario más marcado que el resto. Las aisladas de arándano son de tasa menor y por último las de frutilla y eucaliptos las más lentas.

## DISCUSION

En el sur de Chile, el hongo *B. cinerea*, se encuentra extensamente distribuido debido a que esta zona presenta características de temperaturas y humedad ideales para el desarrollo y propagación del patógeno puesto que como señalan Dennis y Cohen

(1976) y Jarvis (1977), este hongo requiere de temperaturas templadas (15 a 20 °C) y una humedad relativa alta, condiciones ampliamente difundidas en esta región.

Entre las características biológicas y culturales se detectaron importantes disimilitudes con relación a la capacidad de crecimiento del micelio, número y días de maduración de los esclerocios, tamaño de las conidias y virulencia sobre tejido de manzana. Resultados similares a éstos fueron descritos por Menzinger (1966); Jarvis (1977); Gindle (1979); Lorbeer (1980); Bryk (1985) y Salinas y Schot (1987). Frente a estos resultados es posible deducir que *B. cinerea* es un hongo con una alta tasa de variabilidad. Esta característica también fue detectada al comparar las cepas provenientes de los diferentes hospederos, las que evidenciaron diferencias significativas en el valor promedio de crecimiento diario *in vitro*. El porcentaje de materia seca de los esclerocios, analizado en este trabajo, no entregó diferencias estadísticamente significativas, lo que indicaría que se trata de una característica más bien intrínseca a la especie de *B. cinerea*.

De acuerdo a los resultados obtenidos y de todas las experiencias realizadas en este estudio, tales como crecimiento micelial; tiempo de maduración de esclerocios, número y porcentaje de materia seca de esclerocios; color de la colonia y virulencia en tejido de manzana, se demuestra claramente que las localidades desde las cuales fueron obtenidas las cepas de *B. cinerea*, no presentan ninguna relación, ni efecto en cuanto al comportamiento de las colonias estudiadas *in vitro*. Estas consideraciones son corroboradas con los resultados obtenidos por Dennis y Cohen (1976), quienes, al aislar un gran número de cepas de *B. cinerea*, comprobaron que el origen de los aislamientos y la edad de éstos, no tenían efecto significativo sobre las características de las colonias.

La gran variabilidad existente entre las cepas de *B. cinerea*, aisladas desde distintas localidades del sur de Chile, puede ser explicada por el fenómeno de la heterocariosis; similares conclusiones son descritas por Paul (1929); Hansen y Smith (1932); Menzinger (1965); Gindle (1979); Roberts y Boothroyd (1972); Burnett (1975) y Lorenz (1983). Las diferencias entre las cepas fueron más evidentes en el número de esclerocios, que en las otras características estudiadas, resultados similares fueron obtenidos por Bryk (1985). Otros autores como Paul (1929), Gindle (1979), Lorenz (1983) y Salinas y Schot (1987), también observaron diferencias cuantitativas en el número de esclerocios. Según las razas morfológicas descritas por Paul (1929), la raza esclerotial forma una gran cantidad

de esclerocios, sin embargo, las otras dos razas, la micelial y conidial, no necesariamente desarrollan estas estructuras. Frente a las consideraciones realizadas en los párrafos anteriores, y que señalan aspectos vinculados con la formación de esclerocios, cabría esperar que también existiera variación en el porcentaje de materia seca de estas estructuras, dada la gran variación detectada entre las cepas. Los análisis estadísticos realizados no confirman esta presunción. La materia seca fue estadísticamente similar para todos los esclerocios de las cepas en estudio, los cuales presentaron un alto porcentaje de ésta.

Dentro de las características estudiadas de las cepas de *B. cinerea*, el tamaño de las conidias es uno de los aspectos que también presentó variación entre las cepas. Diversos investigadores explican esta variación en el tamaño de la conidia dentro de la especie, por ejemplo, Sapano citado por Lorbeer (1980), divide aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de vides, en siete razas morfológicas basadas en el tamaño de las conidias. Por otra parte, Lauber (1971), obtuvo un número de líneas fisiológicamente distintas en cinco aislamientos de *B. cinerea* y demostró que el tamaño de las conidias era dependiente del pH, relación C:N y de los nutrientes del medio de cultivo, como también del año del cultivo y de la humedad relativa; a este respecto, Hansen (1938), estableció que el número de núcleos de la conidia variaba directamente con el tamaño de la espora. La conidia de un aislamiento de *B. cinerea*, variaba en tamaño de 8 x 12µ a 12 x 15µ y el número de núcleos variaba de 7 a 19. De acuerdo a esto, Tolmsoff (1983), señala que el largo de las esporas indica heteroploidía como un importante mecanismo de variación entre hongos.

Un aspecto importante de destacar fue, lo sucedido en las cepas de la localidad de Cayumapu, donde el total de la cepas aisladas de esta localidad no esporuló *in vitro*, formando un micelio de color blanquecino. De acuerdo a esto, Salinas y Schot (1987), comparando aspectos morfológicos y fisiológicos entre aislamientos de *B. cinerea*, encontraron un aislamiento que produjo un micelio blanquecino que no esporuló y tampoco formó esclerocios, después de dos semanas de incubación bajo luz continua. Por ello, la incapacidad de formar conidias por algunas cepas estudiadas, se puede deber a tres causas: a) la falta de luz UV durante el ensayo, ya que esta prueba fue realizada durante los meses de invierno (junio-julio), donde la intensidad lumínica durante esta época, en esta zona, es muy baja y las cepas solamente estuvieron expuestas a la luz de tubos fluorescentes en forma indirecta por 8 hr, aproximadamente, ya que, la estufa de cultivo no contaba con luz propia; b)

también puede deberse a que son razas incapaces de formar conidias bajo luz visible, tal como lo señalan Stewart y Long (1987), o c) que son razas del hongo que no esporulan en medio de cultivo. La acción del espectro luminoso en la formación de conidias en *B. cinerea*, es similar a lo señalado para el grupo UV de los hongos, tales como *Alternaria dauci*, *Ascochyta pisi*, *Stemphylium botryosum*, *S. solani* y para la formación de peritecios de *Pleospora herbarum* (Leach y Sproston citados por Honda y Yunoki, 1978).

El color del micelio fue comparado con la carta de colores del The Royal Agricultural Society (1966), donde se presentan principalmente cuatro grupos de colores, destacándose principalmente el grupo de los grises (Gryed-group). También se destacó el grupo de los blancos (White-group), donde este color estuvo predominantemente presente en aquellas cepas que no fueron capaces de formar conidias *in vitro*. Gindle (1979) y Pantelejmonova y D'yakov (1988), también han determinado policromatismo en el micelio de *B. cinerea*.

La virulencia de las cepas en estudio fue evaluada sobre trozos de manzana, introduciéndose estos trozos dos electrodos, los que a través de un voltímetro midieron la resistencia eléctrica ( $\Omega$ ) del tejido vegetal. La forma en que esta prueba fue realizada, difiere de los esquemas tradicionales, ya que no se cuantificó el complejo enzimático, sino que el efecto que producen las enzimas liberadas por el hongo cuando estas actúan a nivel celular y como consecuencia del cual el contenido de las vacuolas es liberado (Edlich y otros, 1989). El poseer las vacuolas iones orgánicos, ácidos orgánicos, azúcares, enzimas y un surtido de metabolitos secundarios, facilita la conductividad eléctrica (Taiz y Zeiger, 1991). La medición de la resistencia eléctrica se basó en lo mencionado anteriormente, ya que, al no ser afectado el tejido vegetal por las enzimas, la resistencia eléctrica es mayor, debido a que no hay un medio líquido suficiente para que se produzca una mayor conductividad eléctrica. Los resultados obtenidos sobre resistencia eléctrica de manzana evidenció que el testigo sin inocular presentó una mayor resistencia al paso de la electricidad. Al respecto, las cepas aisladas de las localidades de Ancud y Panguipulli, no presentaron diferencias con relación al testigo.

A pesar que en este trabajo las enzimas producidas por *B. cinerea* no fueron cuantificadas, se puede establecer que existen diferencias entre las cepas

en cuanto a su virulencia. Esto queda claramente evidenciado por las diferencias establecidas en la medición de resistencia eléctrica, especialmente con relación al testigo.

Frente a los resultados aquí discutidos, la variabilidad de las cepas de *B. cinerea*, quedó confiablemente demostrada, donde todos estos antecedentes conducen a una conclusión, la cual ya ha sido corroborada por numerosos autores, y es que *B. cinerea* es una especie polífaga, la cual se adapta a condiciones climáticas muy variadas. A esto debemos agregar su heterocariosis, de donde es posible que nuevas razas fisiológicas puedan ser originadas fácilmente, de entre las cuales cobran importancia aquellas de renovada virulencia hacia los hospederos estudiados.

### CONCLUSIONES

- El estudio de las características biológicas (tamaño de conidias y virulencia) y culturales (color y capacidad de crecimiento miceliar, tiempo de maduración y número de esclerocios), de las cepas de *B. cinerea*, aisladas desde especies de importancia agrícola y forestal del sur de Chile, permitió establecer la existencia de un alto grado de variabilidad en este patógeno.
- Las características biológicas evaluadas, así como aquellas de naturaleza cultural, con la excepción del porcentaje de materia seca de los esclerocios, constituyen parámetros efectivos para establecer la variabilidad entre cepas de *B. cinerea*.
- Existen diferencias significativas en los valores promedios de crecimiento diario entre las cepas de *B. cinerea* aisladas y agrupadas por hospedero.
- La variabilidad detectada entre las cepas de *B. cinerea*, provenientes de las distintas localidades, puede ser atribuida a que no se utilizaron cultivos monoconidiales, situación que incrementa las posibilidades de generación de nuevos genotipos de patógeno, como resultado, probablemente, de la naturaleza heterocariótica de *B. cinerea*.
- La cuantificación de la virulencia a través de la medición de la resistencia eléctrica ( $\Omega$ ), en trozos de manzana inoculados con las cepas en estudio, permitió establecer sólo pequeñas diferencias en

la capacidad de dañar tejido entre los distintos aislamientos de *B. cinerea*, debido a la reducida sensibilidad del método.

- La mayoría de las cepas de *B. cinerea* en estudio, esporularon *in vitro*, sin embargo, las cepas

aisladas de la localidad de Ancud no evidenciaron formación de conidias, lo cual podría sugerir la presencia de genotipos que requieren de condiciones diferentes a las ensayadas, para alcanzar tal condición.

## RESUMEN

Se estudiaron características culturales y biológicas del hongo *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., con el propósito de establecer grados de variabilidad entre aislamientos obtenidos desde diferentes localidades. Para lo anterior se procedió al aislamiento de *B. cinerea* desde cinco especies frutales y forestales de importancia para la zona, tales como: arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.), frambuesa (*Rubus idaeus* L.), frutilla (*Fragaria x ananassa* D.) y mora (*Rubus constrictus* Lef. et M.), que fueron recolectadas de un total de 21 localidades, comprendidas entre la Comuna de Loncoche a 39° lat. S, en la IX Región y la Comuna de Ancud ubicada a 42° lat. S, en la X Región de Chile.

Las cepas obtenidas *in vitro*, fueron comparadas en cuanto a características biológicas, tales como: tamaño de conidias, materia seca de esclerocios y virulencia y características culturales, tales como: color y capacidad de crecimiento miceliar, tiempo de maduración y número de esclerocios. También, las cepas de *B. cinerea* fueron comparadas y agrupadas por hospedero, donde se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de crecimiento diario.

Las cepas fueron comparadas por localidad, mostrando los resultados diferencias estadísticamente significativas entre las cepas aisladas para las características evaluadas, no siendo posible establecer una relación parásito-localidad. De todas las características culturales evaluadas entre las cepas de *B. cinerea*, la materia seca de los esclerocios fue la única característica que no evidenció variabilidad.

Dentro de las características biológicas, la prueba de virulencia realizada sobre trozos de manzana, presentó escasa variación, ya que sólo pequeñas diferencias fueron observadas entre las cepas de *B. cinerea* evaluadas. Sin embargo, diferencias significativas fueron observadas en la capacidad de esporulación entre las cepas aisladas de *B. cinerea*, destacándose, principalmente, la localidad de Cayumapu, donde la totalidad de éstas no esporuló *in vitro*, caracterizándose por la formación de un micelio de color blanquecino.

**Palabras claves:** arándano, eucalipto, frambuesa, frutilla, mora, *Botrytis cinerea*, moho gris del frambueso, botritis.

## LITERATURA CITADA

- BACKHOUSE, D. and WILLETS, J.H. 1984. A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. Canadian Journal of Microbiology 30: 171-196.
- BRYK, H. 1985. The variability of morphological characters and mycelium growth rate of monoconidial culture of *Botrytis cinerea* Pers. Acta Agrobotanica 38: 137-145.
- BURNETT, J.H. 1975. Mycogenetics. John Wiley & Sons, London. 320 p. Annals of Applied Biology 109: 545-554.
- DENNIS, C. and COHEN, E. 1976. The effect of temperature on strains of soft fruit spoilage fungi. Annals of Applied Biology 82: 51-56.
- EDLICH, W.; LORENZ, G.; LYR, H.; NEGA, E. and POMMER, E. 1989. New aspects on the infection of *Botrytis cinerea* Pers. Netherland Journal Plant Pathology 95: 53-62.
- GINDLE, M. 1979. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. Journal of General Microbiology 111: 109-120.
- HANSEN, H.N. 1938. The dual phenomenon in imperfect fungi. Micologia 3: 442-445.
- HANSEN, H.N., and SMITH, E.R. 1932. The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. Phytopathology 22: 953-964.
- HONDA, Y. and YUNOKI, T. 1978. Action spectrum for phoyosporogenesis in *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. Plant Physiology 61: 711-713.
- JARVIS, R.W. 1962. The dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Fr. in a raspberry plantation. Transactions of the British Mycological Society 45: 549-559.



- JARVIS, R.W. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity. Research Branch Canada Department of Agriculture. Monograph Ottawa Canada. 195 p.
- LATORRE, B. 1988. Enfermedades de las plantas cultivadas. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 307 p.
- LAUBER, H.P. 1971. Variabilität und kernverhältnisse bei *Botrytis cinerea*. Schweiz. Landw. Forsch. 10:1-64. Original no consultado, compendiado en Review of Plant Pathology 1972 51(10), N° 3.837.
- LORBEER, W. J. 1980. Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Coley-Smith, J. R.; Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. (ed). The Biology of *Botrytis*. Academic Press, London. p.: 19-36.
- LORENZ, H.D. 1983. Untersuchungen zur morphologischen Variabilität und zur Pathogenität von *Botrytis cinerea* Pers. und *Botryotinia fuckelliana* Whetz. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 90: 622-633.
- MENZINGER, R.W. 1965. Karyologische Untersuchungen an arten und formen der gattung *Botrytis* Mich. Archiv für Mikrobiologie 52: 178-196.
- MENZINGER, R. W. 1966. Zur Variabilität und taxonomie von arten und formen der gattung *Botrytis* Mich. I. Untersuchungen zur kulturbedingten Variabilität morphologischer eigenschaften von formen der gattung *Botrytis*. Zentralblatt für Bakt., Parasitkde Infek Hyg. Orig. A. 120: 141-178.
- PANTELEJMONOVA, T. I. and D'YAKOV, YU. T. 1988. Study of heterokaryosis in the grey rot pathogen *Botrytis cinerea* Pers. ex Fru. Mikologiya: Fitopatologiya 22: 420-427. Original no consultado, compendiado en Review of Plant Pathology 1989, 68 (9), N° 444.
- PAUL, W.R. 1929. A comparative morphological and physiological study of a number of strains of *Botrytis cinerea* Pers. with special reference to their virulence. Transactions British Mycological Society 14: 118-135.
- ROBERTS, A.D. and BOOTHROYD, W.C. 1972. Fundamentals of plant pathology. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 402 p.
- SALINAS, J. and SCHOT, P.C. 1987. Morphological and physiological aspects of *Botrytis cinerea*. Mededelingen van de Facultet Landbouwentenschappenn Rijksuniversiteit Gent 52: 771-776.
- STEWART, M.T. and LONG, G.P. 1987. Sporulation of *Botrytis cinerea* in the dark. New Zeland Journal of Experimental Agriculture 15: 389-392.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. 1991. Plant Physiology. The Benjamin/Cumming Publishing Company Inc. California. 559 p.
- THE ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. 1966. Colour Chart. London. s/p.
- TOLMSOFF, J.W. 1983. Heteroploidy as a mechanism of variability among fungi. Annual Review of Phytopathology 21: 317-340.
- WILLIAMSON, B. McNICOL, R.J. and DOLAN, A. 1987. The effect of inoculating flowers and developing fruits with *Botrytis cinerea* on post-harvest grey mould on red raspberry. Annals of Applied Biology 111: 285-294.