

INVESTIGACIONES

VARIABILIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *Botrytis cinerea* PROVENIENTES DE VID Y TOMATE CON RESISTENCIA A DICARBOXIMIDAS¹

Genetic variability of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* isolated from grapes and tomato

Gastón Muñoz V.², Patricio Hinrichsen R.² y Mario Alvarez A.²

ABSTRACT

In order to identify a molecular marker able to detect dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea*, genetic variability in two populations of the pathogen was analyzed. One group of strains was isolated from grapes and a second one from tomato. In both groups, sensitive ($EC_{50} < 2$ mg/L), low-level resistant (EC_{50} 2 a 10 mg/L), and highly resistant strains ($EC_{50} > 10$ mg/L) to dicarboximides were detected. Resistance to iprodione correlated positively with resistance to procymidone although osmotic sensitivity, a component of fungal colonizing ability, did not correlate with the observed degrees of resistance. Genetic variability was assessed by RAPDs. Ten primers were selected which provided 56 polymorphic bands. High genetic variability was found in this species with similarity coefficients varying between 0.55 and 0.98. Bands tightly linked to dicarboximide resistance could not be identified, and a cluster analyses using UPGMA could not cluster apart resistant and sensitive strains. Unexpectedly, this later analysis showed that strains isolated from grapes are different from those isolated from tomato. We conclude that due to the high genetic variability of *B. cinerea* the use of fungal populations is not the most appropriate approach to identify a molecular marker associated with resistance to dicarboximides. Alternative approaches are suggested for this later purpose and some aspects regarding the population structure of this pathogen in Chile are discussed.

Keywords: *Botrytis cinerea*, dicarboximide resistance, genetic variability, population structure.

INTRODUCCIÓN

Botrytis cinerea Pers. Fr. es un hongo fitopatógeno que ataca una amplia variedad de plantas de importancia económica, entre las que se encuentran frutales, hortalizas y flores (Lorbeer,

1980). La pudrición gris causada por este hongo es una de las enfermedades fungosas más importantes en nuestro país (Auger, 1983). El control del patógeno se realiza principalmente mediante la aplicación de fungicidas, incluido compuestos de la familia de las dicarboximidias (DC), tal como iprodione. El uso excesivo y repetido de fungicidas conlleva el riesgo de desarrollo de resistencia al compuesto, lo que podría conducir a una pérdida de control. Esto ha obligado a mantener un constante monitoreo de los niveles de resistencia de la población del patógeno (Carreño y Alvarez, 1990; Latorre *et al.*, 1994).

¹Recepción de originales: 27 de marzo de 1998. Trabajo financiado por FONDECYT a través del proyecto 3970018.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.
E-mail: gamunoz@platina.inia.cl

La determinación de la resistencia en las poblaciones se realiza microbiológicamente. Esto involucra aislar la cepa para luego cultivarla en presencia de distintas concentraciones del fungicida, cuantificando así su resistencia. Este proceso es lento y laborioso, lo que dificulta el análisis de un gran número de muestras.

Estudios de genética clásica realizados por Faretra y Pollastro (1993) han establecido que un único gen, denominado *Darf1*, es el responsable de la resistencia a dicarboximidias en *B. cinerea*. Este autor ha descrito tres alelos para *Darf1*, los cuales dan cuenta de tres niveles de resistencia según su respectiva EC_{50} (concentración efectiva del fungicida capaz de inhibir el crecimiento miceliar en un 50%): sensibles (DC^S , $EC_{50} < 2$ mg/L), levemente resistentes (DC^{LR} , EC_{50} 2-10 mg/L), y altamente resistentes (DC^{HR} , $EC_{50} > 10$ mg/L). Beever y Parkes (1993) reportaron otro alelo de *Darf1*, cuyas cepas tienen el fenotipo de altamente sensibles (DC^{HS} , $EC_{50} < 0,5$ mg/L) y una particular morfología al cultivarlas en un medio con alta salinidad. Para las cepas DC^{HR} , se ha descrito que tendrían afectada su habilidad colonizadora (Grindle, 1979; Leroux *et al.*, 1981; Katan, 1982) ya que generalmente presentan una menor tasa de crecimiento, reducida esporulación, mayor sensibilidad osmótica y menor virulencia. Si consideramos esto, se puede inferir que sin la presión del fungicida las cepas DC^{HR} no prevalecerían en el campo ni en cultivos de laboratorio. Esta putativa inestabilidad de las cepas DC^{HR} podría hacer, además, que la proporción de este tipo de cepas se esté subestimando con los métodos tradicionales. Por lo tanto, para la detección de cepas de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidias serían más apropiadas metodologías que permitan la detección directa de tales cepas, sin pasar por cultivos, y que además fueran rápidas, sensibles y aplicables a un alto número de muestras. Esto se puede lograr al utilizar técnicas moleculares (Maclean *et al.*, 1993).

El actual desarrollo de la biología y genética molecular ha permitido que se disponga de me-

todologías como la denominada RAPD (amplificación aleatoria de polimorfismos del ADN; Williams *et al.*, 1990). Esta técnica permite caracterizar genéticamente poblaciones de individuos, sin necesidad de un mayor conocimiento genético de los mismos. A nivel fitopatológico, la aplicación de esta metodología ha permitido encontrar marcadores genéticos asociados a fenotipos tales como la resistencia a fungicidas (Fabritius *et al.*, 1997). Mediante estudios genético-moleculares se ha podido elucidar el mecanismo de acción de los fungicidas tal como los bencimidazoles (Sheri-Neiss *et al.*, 1978; Davidse, 1986), lo que a su vez ha permitido desarrollar técnicas de análisis de ADN para la detección rápida y específica de cepas resistentes a tales fungicidas en las especies *Venturia inaequalis* (Koenraadt y Jones, 1992), y *Botrytis cinerea* (Luck and Gilling, 1995). Otra ventaja de las técnicas moleculares es que no se requiere aislar el patógeno a detectar e incluso pueden derivar en un ensayo cuantitativo (Edwards *et al.*, 1997).

Esta línea de trabajo tiene como objetivo la obtención de un marcador molecular asociado con resistencia a dicarboximidias en *B. cinerea*. La disponibilidad de este marcador facilitaría la detección de cepas resistentes a dicarboximidias y contribuiría al conocimiento del mecanismo de acción de este tipo de fungicidas. En este trabajo se evaluó el potencial de la metodología de RAPD como primera herramienta hacia la obtención de marcadores de resistencia a dicarboximidias. Esta metodología fue aplicada a dos poblaciones del patógeno, constituidas por cepas provenientes de vid y tomate con distinto grado de resistencia a dicarboximidias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y mantención de las cepas

Las cepas de *B. cinerea* utilizadas en este trabajo forman parte de la colección del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones

Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, ubicado en Santiago. Inicialmente, las cepas fueron colectadas con el objetivo de determinar los niveles de resistencia a bencimidazoles y dicarboximidias. Cada cepa, que representa un aislado monoespórico, fue mantenida mediante subcultivos en tubos de APD (agar papa dextrosa).

Las cepas aisladas de vid (*Vitis vinifera*) provenían de diversos cultivares de uva de mesa, y fueron colectadas entre octubre y noviembre de 1996 en la zona de San Fernando y Curicó (35° Lat. Sur, 71° Long. W); para su aislamiento, se procedió tal como describieron Carreño y Álvarez (1990). Las cepas provenientes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) fueron colectadas de diversos cultivares de tomate cultivados en invernaderos de la zona de Quillota y Limache (33° Lat. Sur, 71° Long. W), en agosto de 1992; para el aislamiento, muestras de hojas de la planta se incubaron en cámara húmeda hasta aparición de micelio y esporulación.

En este estudio se utilizaron algunas cepas de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidias que fueron seleccionadas como mutantes espontáneos obtenidos en el laboratorio. Estas cepas (U5-1, DC^{LR}; U57-1, DC^{HR}; y T16-1, DC^{HR}; Cuadro 1) fueron seleccionadas como sectores de micelio con mayor crecimiento al cultivar una cepa DC^S (U5, U57 y T16, Cuadro 1) en presencia de una concentración subletal de iprodione. Para esto, se sembró en forma puntual un volumen 20 uL de una suspensión de esporas, con una concentración de 2×10^7 esporas/mL, sobre placas de APD conteniendo iprodione a una concentración de 10 veces el EC₅₀ de la cepa sembrada. Después de una incubación de 7 días, se rescataron los sectores de rápido crecimiento, siendo transferidos y mantenidos bajo las mismas condiciones de cultivo en las que se seleccionaron. Posteriormente, se les determinó su correspondiente EC₅₀.

Las cepas fueron denominadas por una letra que identifica el cultivo del cual fueron aisladas (U, vid; T, tomate), seguida de un número. Los mu-

tantes resistentes fueron designados con la misma denominación de la cepa sensible de la cual se originaron, seguido de un guión y un número.

Determinación de nivel de resistencia a dicarboximidias

Las dicarboximidias utilizadas fueron iprodione y procimidone, formuladas bajo la marca comercial de Rovral® 50 PM y Sumisclex® 50 PM, respectivamente. El nivel de resistencia se expresó a través de la EC₅₀, en mg de ingrediente activo (i.a.) por litro de solución. Para determinar este parámetro, primero se determinó la inhibición que sufría el crecimiento micelial del hongo al ser enfrentado a diferentes concentraciones del fungicida con respecto al crecimiento en ausencia del compuesto; luego se realizó un análisis de regresión entre el logaritmo de la concentración del fungicida y el porcentaje de inhibición transformado a valores Probit, tal como describieron Carreño y Álvarez (1990). Para determinar con mayor exactitud los valores de EC₅₀ se utilizaron tres rangos de concentración del fungicida. El rango bajo consistió de las concentraciones 0, 0,2, 0,5, 1,5, y 5,0 mg/L; para rango medio se utilizaron las concentraciones 0, 2, 5, 10 y 20 mg/L; y en el rango alto las concentraciones fueron 50, 100, 200 y 400 mg/L. Para cada cepa y concentración, la determinación de la EC₅₀ se realizó en triplicado.

Determinación de la sensibilidad osmótica

La sensibilidad osmótica se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo al ser cultivado en la presencia de 0,64 M NaCl (Beever y Parkes, 1993). Para esto, el hongo se cultivó en placas de Petri en forma similar al punto precedente pero utilizando el medio agar-malta-levadura (1,5% agar, 2% malta y 0,2% extracto levadura). A los tres días de cultivo, se midió el diámetro de crecimiento micelial, estableciéndose el porcentaje de inhibición referido al crecimiento en ausencia de 0,64 M NaCl. Cada determinación es el resultado de tres repeticiones del ensayo por cepa.

Cuadro 1. Niveles de resistencia a dicarboximidias y sensibilidad osmótica de cepa de *Botrytis cinerea* aisladas de vid y tomate

Table 1. Resistance levels to dicarboximides and osmotic sensitivity of *Botrytis cinerea* strains collected from grapes and tomato

Cepa Nº	Codigo ¹	Supuesto Alelo <i>Darf</i> ³	Valores de EC ₅₀ (mg/L i.a.) ⁴		Inhibición del crecimiento por NaCl 0,64 M (%) ⁵
			Iprodione	Procimidone	
1	U29	DC ^{HS}	0,15	0,19	62
2	U41	DC ^{HS}	0,21	0,24	61
3	U57	DC ^{HS}	0,30	0,23	65
4	U5	DC ^S	0,77	1,93	58
5	U148	DC ^S	1,41	3,79	61
6	U83	DC ^S	1,81	6,52	58
7	U42	DC ^{LR}	2,28	5,01	29
8	U5-1 ²	DC ^{LR}	3,44	7,63	48
9	U57-1 ²	DC ^{HR}	421,00	142,00	71
10	T50	DC ^{HS}	0,11	0,07	63
11	T57	DC ^{HS}	0,22	0,06	65
12	T10	DC ^S	0,75	2,74	51
13	T16	DC ^S	1,48	2,88	55
14	T22	DC ^S	1,86	2,10	53
15	T5	DC ^{LR}	2,39	3,10	57
16	T16-1 ²	DC ^{HR}	172,00	93,00	43

¹Letra indica hospedero de donde se aislaron las cepas. U, vid; T, tomate.

²Cepa mutante resistente a dicarboximida aislada en el laboratorio como mutante espontáneo, según se describe en Materiales y Métodos.

³Alelo putativo del gen *Darf1* que portarían las respectivas cepas según se describe en el texto.

⁴Los valores se determinaron mediante análisis de correlación entre el porcentaje de inhibición versus el logaritmo de la concentración del fungicida y representan el promedio de tres repeticiones.

⁵Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial referido a la ausencia de la sal. Los valores representan el promedio de tres repeticiones.

Obtención del ADN del hongo

Las cepas de *B. cinerea* fueron cultivadas por 7 días en medio líquido estático a 23°C. Se utilizaron matraces Erlenmayer de 250 mL con 30 mL de caldo malta-levadura (2% malta y 0,2% extracto levadura). Cada matraz fue inoculado con 1 mL de una suspensión de esporas del hongo cuya concentración fue de 2 x 10⁷ esporas/mL. La capa de micelio obtenida fue lavada con agua destilada estéril, secada entre dos capas de toalla de papel y congelada a -80°C. La biomasa fue molida en mortero en presencia de

nitrógeno líquido y el polvo obtenido, traspasado a un tubo de eppendorff. El ADN genómico fue extraído aplicando el método descrito por Bainbridge *et al.* (1990).

La calidad del ADN obtenido fue analizado electroforéticamente en geles de agarosa al 0,8% en solución amortiguadora Tris-HCl, Borato de sodio y EDTA pH 8,0 (TBE) Sambrook *et al.*, 1989). La cuantificación de ADN se realizó fluorimétricamente usando un fluorímetro DyNA QUANT 200 (Hoefer Pharmacia Biotech, Inc.) según indica el fabricante.

Condiciones de las reacciones de RAPD

Inicialmente, se evaluaron 30 partidores, escogidos al azar de las diferentes series disponibles de Operon Technologies Inc. (Alameda, California, EE.UU.), en cuanto a la generación de perfiles polimórficos. Basados en lo anterior, se seleccionaron finalmente los siguientes 10 partidores: OPA-17, OPB-6, OPB-20, OPC-4, OPC-12, OPD-19, OPE-2, OPE-11, OPO-16 y OPW-18. Las reacciones de amplificación (15 uL) consistían de 4 uM del partidor, 800 uM de la mezcla de deoxynucleotidos trifosfato, 2,5 mM de MgCl₂ y 1U de *Taq* DNA polimerasa (Gibco BRL). A cada reacción se le agregó 10 ng de ADN fúngico, en un volumen de 2 uL y una gota de aceite mineral. Las amplificaciones tuvieron lugar en un termociclador MJ Research PT-100, usando el siguiente programa de temperaturas: 2 ciclos de 60 s a 95°C, 60 s a 37 °C y 80 s a 72°C, seguido de 39 ciclos de 35 s a 94°C, 40 s a 40°C y 80 s a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C. Todo el volumen de la reacción de amplificación fue analizado electroforéticamente en geles de agarosa al 1,5% en TBE, las bandas de ADN visualizadas con luz ultravioleta posterior a tinción con bromuro de etidio, y fotografiados con película Polaroid 667 (Sambrook *et al.*, 1989). El tamaño de los productos de amplificación fue determinado usando el estándar de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL).

Análisis de las bandas polimórficas

El perfil de bandas que generó un determinado partidor fue analizado, registrando para cada cepa la presencia ("1") o ausencia ("0") de bandas de ADN de similar tamaño. El criterio utilizado para identificar una banda como polimórfica fue su presencia o ausencia en forma consistente en dos amplificaciones independientes. Con estos datos, se preparó una matriz binaria que combina los 56 polimorfismos detectados con los 10 partidores en las cepas analizadas, la cual fue analizada utilizando el paquete computacional NTSYS 1.60 (Rohlf, 1988). Para cada

par de cepas se determinó el grado de similaridad utilizando el coeficiente de similaridad Jaccard (Sneath, P. y Sokal, R., 1973), lo cual permite agrupar las cepas estudiadas generando un árbol o dendrograma de afiliación mediante el algoritmo UPGMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección y características de las cepas analizadas

Para realizar este trabajo, se decidió emplear dos grupos de *B. cinerea*: aislamientos provenientes de tomate y otro grupo de aislamientos de vid, debido a que en estos cultivos los regímenes de aplicación de fungicidas son diferentes, por lo que el hongo se encontraría sometido a diferentes presiones de selección por dicarboximidias. Al analizar la colección de cepas, se encontró que la mayoría eran sensibles, cepas del tipo DC^{LR} se encontraban en una pequeña proporción, mientras que no se encontraron cepas del tipo DC^{HR}. La ausencia de cepas DC^{HR} en las poblaciones escogidas fue suplida con mutantes espontáneos aislados en el laboratorio a partir de cepas sensibles.

En el Cuadro 1 se indican las cepas analizadas y las características determinadas. A medida que se desarrolla mayor resistencia a iprodione, las cepas también se hacen resistentes a procimidone. Esta resistencia cruzada entre compuestos de la familia de las dicarboximidias ha sido descrita (Carreño y Alvarez, 1990; Katan, 1982) y atribuida a la estructura química similar entre los mismos. En efecto, todos estos compuestos poseen en común la estructura química 3-5 diclorofenilo, lo cual hace suponer que tales fungicidas actuarían mediante un mecanismo similar, pudiendo tener un mismo sitio de acción. Sin embargo, los valores de EC₅₀ para procimidone fueron más bajos que los de iprodione en las cepas DC^{HR}. Esto indica que ambas dicarboximidias tendrían una afinidad distinta con el sitio de acción.

Es bastante notable el alto valor de EC_{50} encontrado en las cepas DC^{HR} . En efecto, la resistencia se incrementó 1400 veces entre las cepas U57 y U57-1, mientras que para el par T16 y T16-1 el incremento fue de 114. Se ha observado que las cepas mutantes con alta resistencia a dicarboximidias obtenidas en el laboratorio presentan valores de EC_{50} sobre los 100 mg/L (Grindle, 1984; Grindle y Dolderson, 1987; Farestra y Pollastro, 1993). Se ha discutido también que al estudiar mutantes obtenidos en el laboratorio, éstos no necesariamente posean mutaciones que ocurrirían bajo condiciones de campo (Hollomon *et al.*, 1997). Esto ha sido comprobado para el caso de resistencia hacia fungicidas del grupo de los bencimidazoles. Sin embargo, todas las mutaciones afectan el mismo sitio de acción, que corresponde al gen de la β -tubulina, estando ubicadas en diferentes la posiciones del mismo (Sheri-Neiss *et al.*, 1978, Davidse, 1986; Koenraad *et al.*, 1992; Yarden y Katan, 1993; Luck and Gilling, 1995). Para el caso de las dicarboximidias en *sB. cinerea*, y dado que solo un gen ha sido involucrado en la resistencia, podríamos enfrentar una situación similar.

Para estimar si la adquisición de resistencia a dicarboximidias implicaba algún costo sobre la habilidad colonizadora del hongo, se determinó la sensibilidad osmótica de las cepas en estudio. Sin embargo, no se encontró una correlación entre la inhibición del crecimiento micelial del hongo en condiciones de alta salinidad y el incremento en la resistencia a dicarboximidias (Cuadro 1). De hecho, la cepa DC^{HR} T16-1 fue menos sensible que las DC^S . Hay que mencionar el hecho que las cepas DC^{HS} presentan una morfología diferente del resto de las cepas y no esporulan (no mostrado). Esto indica que para tener una real apreciación de la habilidad colonizadora del hongo deben ser evaluados varios de sus componentes, tales como tasa de crecimiento, esporulación, virulencia, etc. (Staub, 1991).

Se ha especulado que la resistencia a dicarboximidias tendría repercusiones sobre la fisiología

del hongo, especialmente cuando se desarrollan altos niveles de resistencia (Leroux *et al.*, 1981; Staub, 1991). Estudios de campo, que muestran una disminución en la frecuencia de cepas resistentes al discontinuar la aplicación de dicarboximidias, sugieren un costo de la resistencia a dicarboximidias sobre la habilidad colonizadora (Staub, 1991). Sin embargo, si bien se han descrito cepas resistentes menos "hábiles" que las sensibles (Pommer y Lorenz, 1982; Katan, 1982), otras cepas resistentes, provenientes de campo y laboratorio, han mostrado ser estables y tan "hábiles" como las DC^S (Hisada *et al.*, 1981; Katan, 1982). Es claro que estudios bioquímicos y genéticos son necesarios para elucidar el mecanismo de acción de las DC. En este sentido, la disponibilidad de marcadores asociados con la resistencia a dicarboximidias sería un aporte.

Detección de polimorfismos de ADN en las cepas seleccionadas

Para buscar un marcador molecular asociado con la resistencia a dicarboximidias, se escogió como primer enfoque analizar genéticamente, mediante la metodología de RAPD, poblaciones del hongo que presentaran todos los niveles de resistencia descritos para estos fungicidas.

Las condiciones de las reacciones de RAPD fueron inicialmente optimizadas con respecto a las concentraciones del ión magnesio y de ADN, que son los parámetros más importantes en este tipo de reacción (Innis *et al.*, 1990). Posteriormente se seleccionaron 10 partidores que generaron entre 2 a 11 bandas polimórficas, obteniéndose un total de 56. Este número de bandas es adecuado para realizar análisis de agrupamiento (Nei, 1973; Johns *et al.*, 1997)

El perfil de bandas generado con los partidores OPE-11 y OPC-4 se muestra en la Figura 1. En general, las bandas obtenidas variaron en tamaño de 200 a 3000 pb. En forma consistente, algunas cepas mostraron reacciones débiles de amplificación (Figura 1, panel A, carril 9) o no amplifica-

ron bandas (Figura 1, panel B, carril 10) frente a un determinado partidior. Esto indica que bajo las condiciones de ensayo algún compuesto presente en las cepas implicadas interfería en la reacción. A excepción de las cepas T10, T16 y

T22 la mayoría de las cepas mostraron perfiles que las diferencian entre sí. Esto quiere decir que ninguna cepa fue exactamente igual a otra, lo que se comprueba en el dendrograma que se presenta en la Figura 2.

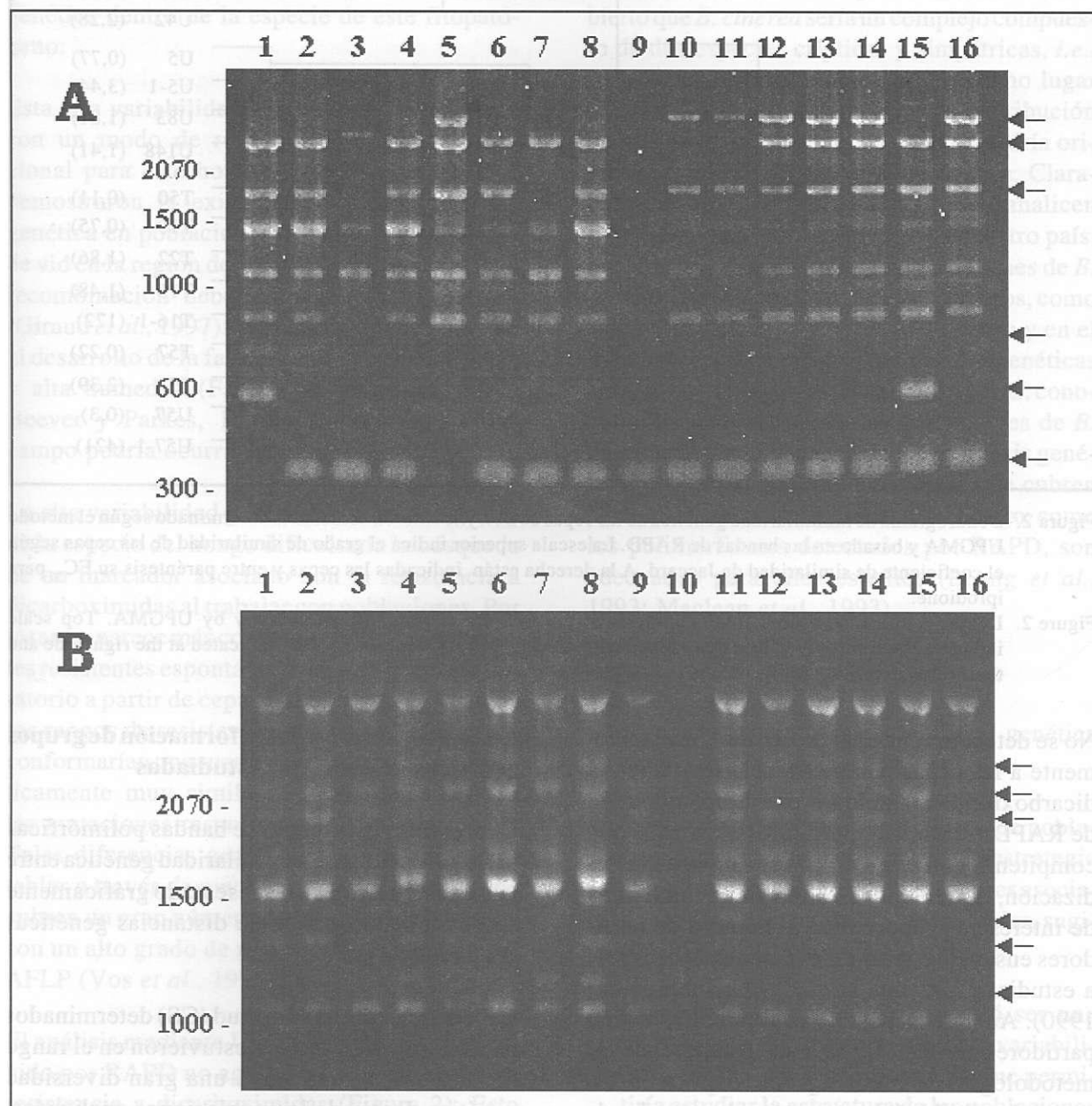


Figura 1. Perfil de bandas observados para los partidiores OPE-11 (A) y OPC-4 (B) en los ensayos de RAPDs para las cepas de *Botrytis cinerea* analizadas. Los números de cada carril indican la cepa según se detalla en el Cuadro 1. A la izquierda se indica la movilidad del estándar de masa molecular en pares de bases. Las flechas de la derecha indican las bandas polimórficas.

Figure 1. Band profile obtained with primers OPE-11 (A) and OPC-4 (B) in the RAPDs assays of the *Botrytis cinerea* strains. Each lane numbers indicate the strain as described in Table 1. At left side, migration of MW is indicated in base pairs. Arrows at the right side indicate polymorphic bands.

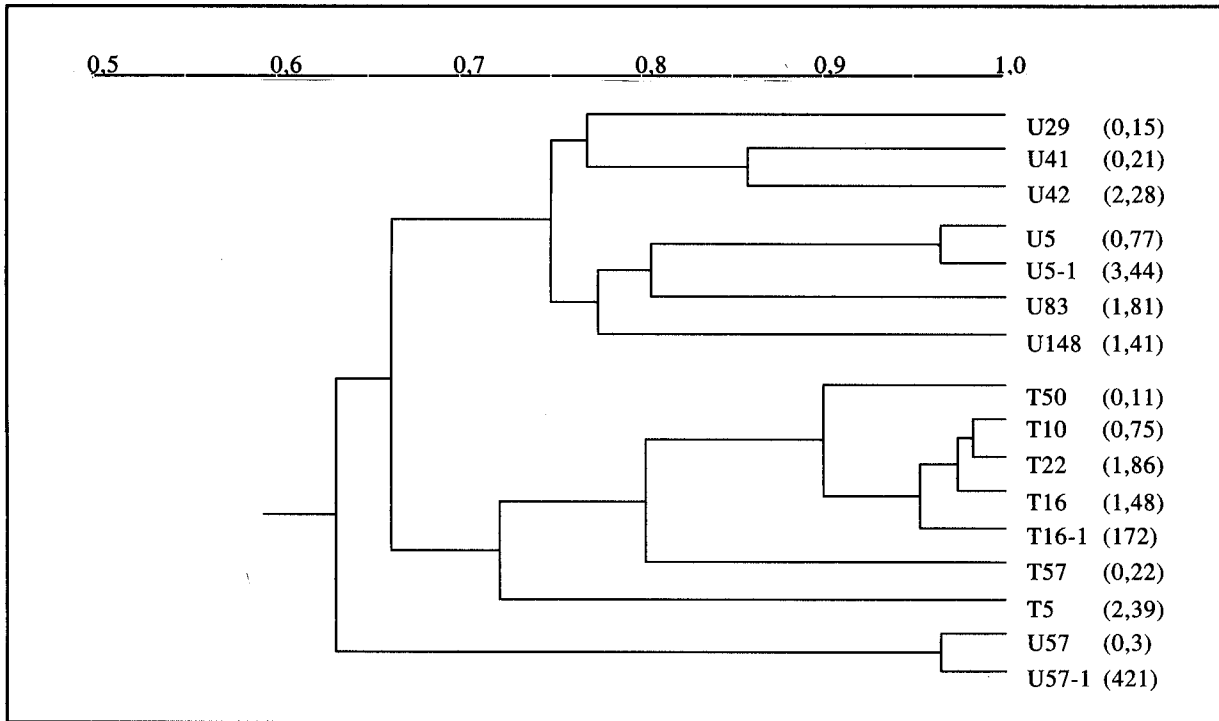


Figura 2. Dendrograma de la similaridad genética de las cepas de *Botrytis cinerea* estudiadas determinado según el método UPGMA y basado en las bandas de RAPD. La escala superior indica el grado de similaridad de las cepas según el coeficiente de similaridad de Jaccard. A la derecha están indicadas las cepas y entre paréntesis su EC₅₀ para iprodione.

Figure 2. Dendrogram derived from RAPD analysis of the *Botrytis cinerea* strains in study by UPGMA. Top scale indicates the similarity values determined with Jaccard's coefficient. Strains are indicated at the right side and their respective EC₅₀ for iprodione in brackets.

No se detectaron bandas asociadas consistentemente a las cepas con resistencia leve o alta a dicarboximidas. Debido a que la metodología de RAPDs se basa en partidores aleatorios que compiten según afinidad con los sitios de hibridación, la probabilidad de encontrar una banda de interés es proporcional al número de partidores ensayados, ya que se incrementan los *loci* a estudiar (Williams *et al.*, 1990; Innis *et al.*, 1990). Aunque es posible continuar evaluando partidores de RAPD, se han descrito nuevas metodologías de análisis genético que tendrían mayor factibilidad de encontrar el marcador de interés. Es el caso de AFLP (Vos *et al.*, 1995), metodología que sería más efectiva para identificar mutaciones de tipo puntual, que parecieran ser las involucradas en el desarrollo de resistencia a fungicidas (Yarden y Katan, 1993; Luck and Gilling, 1995; Hollomon, 1997).

Análisis de similaridad y formación de grupos genéticos de las cepas estudiadas

La presencia o ausencia de bandas polimórficas permitió cuantificar la similaridad genética entre las cepas analizadas, representado gráficamente como un dendrograma de distancias genéticas (Figura 2).

Los coeficientes de similitud (CS) determinados para las cepas en estudio estuvieron en el rango de 0,52 a 0,98, indicando una gran diversidad genética dentro de las poblaciones analizadas. Van der Vlugt-Bergmans *et al.* (1993), informó un rango de similaridad genética menor (0,83 a 0,94) al analizar mediante 65 bandas de RAPD, en 8 cepas holandesas y 2 italianas provenientes de diversos hospederos. Estudios genéticos más recientes de poblaciones de *B. cinerea* realizados

mediante RAPD (Kerssies *et al.*, 1997) o mediante frecuencia de alelos detectados a través de ensayos tipo PCR-RFLP (Giraud *et al.*, 1997), concuerdan con los datos aquí informados en cuanto a la existencia de una gran diversidad genética dentro de la especie de este fitopatógeno.

Esta alta variabilidad genética no corresponde con un modo de reproducción estrictamente clonal para este hongo. Giraud *et al.* (1997), demostraron la existencia de recombinación genética en poblaciones de *B. cinerea* aisladas de vid en la región de Champagñe, Francia. Esta recombinación debería darse por vía sexual (Giraud *et al.*, 1997). Las condiciones que llevan al desarrollo de la fase sexual, baja temperatura y alta humedad (Faretra y Antonacci, 1988; Beever y Parkes, 1993), sugieren que en el campo podría ocurrir en invierno.

La alta variabilidad genética encontrada dentro de la especie del hongo dificultaría la búsqueda de un marcador asociado con la resistencia a dicarboximidias al trabajar con poblaciones. Por lo tanto, parece más conveniente analizar mutantes resistentes espontáneos obtenidos en el laboratorio a partir de cepas DC^s y que cubran todos los rangos de resistencia descritos. Tales cepas conformarían una suerte de líneas clonales, genéticamente muy similares, diferenciándose en las mutaciones responsables de la resistencia. Tales diferencias genéticas podrían ser detectables a través de metodologías "masivas", que cubren un gran número de *loci* en cada ensayo y con un alto grado de reproducibilidad, como el AFLP (Vos *et al.*, 1995).

El análisis mediante UPGMA de los datos obtenido por RAPD no agrupó a las cepas según su resistencia a dicarboximidias (Figura 2). Esto refleja el hecho de no haber encontrado bandas asociadas con la resistencia. Sin embargo, las cepas analizadas se separaron en dos grupos que se diferencian según el hospedero. Esto indica que las cepas aisladas de vid son genéticamente diferentes de las provenientes de tomate. Tal

diferenciación podría reflejar el diferente origen geográfico de las muestras, o bien sugeriría que cada cultivo poseería una población propia mejor adaptada o especializada de *B. cinerea*. Recientemente, mediante análisis genéticos, se ha descubierto que *B. cinerea* sería un complejo compuesto de dos especies crípticas y simpátricas, *i.e.*, presentes al mismo tiempo en el mismo lugar (Giraud *et al.*, 1997). La diferente distribución de ambas especies en un hospedero podría originar la diferenciación aquí observada. Claramente se necesita realizar estudios que analicen la presencia de ambas especies en nuestro país, analizar la variabilidad de las poblaciones de *B. cinerea* provenientes de otros hospederos, como esta variabilidad se divide en el tiempo y en el espacio y establecer las relaciones filogenéticas entre tales poblaciones. En otras palabras, conocer cómo se estructuran las poblaciones de *B. cinerea* en Chile. A este respecto, análisis genéticos usando marcadores neutrales que cubren aleatoriamente todo el genoma del hongo, como los polimorfismos detectados por RAPD, son adecuados para tales estudios (Leung *et al.*, 1993; Maclean *et al.*, 1993).

CONCLUSIONES

- Se encontró una alta variabilidad genética dentro de la especie de *B. cinerea*.
- Debido a lo anterior, la utilización de poblaciones de *B. cinerea* no parece la estrategia más adecuada para buscar marcadores asociados con la resistencia a dicarboximidias, sugiriendo la utilización de mutantes.
- La metodología de RAPD mostró ser una herramienta eficaz para analizar la variabilidad genética del fitopatógeno, lo que permitiría estudiar la estructura de las poblaciones de este hongo.
- Los análisis de similaridad genética y agrupamiento evidenciaron que las cepas aisladas de tomate son diferentes de aquellas aisladas de vid.

RESUMEN

Con objeto de buscar un marcador molecular para detectar cepas de *Botrytis cinerea* resistentes a dicarboximidias, se analizó la variabilidad genética intra-especie de dos poblaciones del fitopatógeno. Un grupo de cepas fueron aisladas de vid (*Vitis vinifera*) y el otro de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Cada grupo incluía cepas que cubrían los diversos rangos de resistencia descritos para dicarboximidias: sensibles ($EC_{50} < 2$ mg/L), levemente resistentes (EC_{50} 2 a 10 mg/L), y alta resistencia ($EC_{50} > 10$ mg/L). La caracterización microbiológica de estas cepas mostró que la resistencia a iprodione se correlaciona con resistencia a procimidone. La sensibilidad osmótica, un componente de la habilidad colonizadora del hongo, no correlacionó con el grado de resistencia de las cepas.

La variabilidad genética se analizó mediante la metodología de RAPD. Se seleccionaron 10 partidores que generaron un total de 56 bandas polimórficas. Se encontró una alta variabilidad genética dentro de la especie con coeficientes de similaridad entre 0,55 y 0,98. No se encontraron bandas que se asociaran con la resistencia y en el análisis de agrupamiento, mediante

UPGMA, las cepas resistentes no formaron un grupo diferente de las sensibles. Sin embargo, en tales análisis, la población proveniente de tomate mostró ser diferente de la de vid. Concluimos que, debido a la alta variabilidad genética de las poblaciones del hongo, la utilización de éstas no sería la estrategia más adecuada para buscar marcadores asociados con la resistencia a dicarboximidias. Se propone y discute otra estrategia para los fines anteriores y se precisan algunos aspectos sobre el estudio de la estructura de las poblaciones *Botrytis cinerea* en Chile.

Palabras claves: *Botrytis cinerea*, resistencia a dicarboximidias, variabilidad genética, estructura de poblaciones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar un especial agradecimiento a las investigadoras Alicia Bruna y Gloria Tobar, por su cooperación al facilitar las cepas aisladas de tomate, y a Solange Cea, por su colaboración durante el inicio del trabajo, todas ellas pertenecientes al Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional La Platina.

LITERATURA CITADA

- AUGER, J. 1983. La pudrición gris de la vid, *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. Algunos aspectos epidemiológicos de importancia para su control. Aconex 4: 15-18.
- BAINBRIDGE, B.W.; SPREADBURY, C.L.; SCALISE, F.G. AND COHEN, J. 1990. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. FEMS Microbiol. Lett. 66: 113-118.
- BEEVER, R.E. AND PARKES, S.L. 1993. Mating behaviour and genetics of fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in New Zealand. N.Z. J. Crop Hortic. Sci. 21: 303-310.
- CARREÑO, I. Y ALVAREZ, M. 1990. Determinación de razas resistentes de *Botrytis cinerea* de vid a fungicidas dicarboximidias. Agricultura Técnica (Chile) 50: 298-303.
- EDWARDS, S.G.; FITTER, A.H. AND YOUNG, J.P.W. 1997. Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, within plants roots by competitive polymerase chain reaction. Mycol. Res. 101: 1440-1444.

- FABRITIUS, A.L.; SHATTOCK, R.C. AND JUDELSON, H.S. 1997. Genetic analysis of metalaxyl insensitivity loci in *Phytophthora infestans* using linked DNA markers. *Phytopathology* 87: 1034-1040.
- FARETRA, F. AND ANTONACCI, E. 1988. Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathol. Mediterr.* 26: 29-35.
- FARETRA, F. AND POLLASTRO, S. 1993. Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. *Plant Pathol.* 42: 48-57.
- GIRAUD, T.; FORTINI, D.; LEVIS, C.; LEROUX, P., AND BRYGOO, Y. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Mol. Biol. Evol.* 14: 1177-1185.
- GRINDLE, M. 1979. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* 111: 109-120.
- HISADA, Y.; TAKAKI, H.; KATO, T.; OZAKI, T. AND KAWASE, Y. 1981. Fitness of procimidone-resistant *Botrytis cinerea* strains developed *in vitro*. *Neth. J. Plant Pathol.* 87: 243-244.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNISNSKY, J.J. AND WHITE, T. 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press Inc. New York, USA. 482 p.
- JOHNS, M.A.; SKROCH, P.; NIENHUIS, J.; HINRICHSEN, P.; BASCUR, G. AND MUÑOZ, C. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Sci.* 37: 605-613.
- KATAN, T. 1982. Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclimide (dicarboximide) fungicides in the gray mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. *Plant Pathol.* 31: 131-141.
- KERSIES, A.; BOKER-VAN ZESSEN, A.I.; WAGEMAKERS, C.A.M. AND VAN KAN, J.A.L. 1997. Variation in pathogenicity and polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Dis.* 81: 781-786.
- KOENRAADT, H. AND JONES, A.L. 1992. The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 82: 1354-1358.
- LATORRE, B.; FLORES, V.; SARA, A.M. Y ROCO, A. 1994. Dicarboximide-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile: survey and characterization. *Plant Dis.* 78: 990-994.
- LEROUX, P.; GREDT, M. AND FRITZ, R. 1981. Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide fungicides. *Neth. J. Plant Pathol.* 87: 244-245.
- LEONE, G. 1990. *In vivo* and *in vitro* phosphate-dependent polygalacturonase production by different isolates of *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 94: 1039-1054.
- LEUNG, H.; NELSON, R.J. AND LEACH, J.E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *In: Advances in Plant Pathology.* Academic Press. New York. Vol 10. p. 157-205.
- LORBEER, J.W. 1980. Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*. *In: J.R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W.R. Jarvis (Eds.). The biology of Botrytis.* Academic Press. London. p. 19-40.

- LUCK, J.E. AND GILLINGS, M.R. 1995. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycol. Res.* 99: 1483-1488.
- MACLEAN, D.J.; BRAITHWAITE, K.S.; MANNERS, J.M. AND IRWIN, J.A.G. 1993. How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis? *In: Advances in Plant Pathology*. Academic Press. New York. Vol 10. p. 207-244.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70: 3321-3323.
- POMMER, E.H. AND LORENZ, G. 1982. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides. A literature review. *Crop Protection* 2: 221-230.
- ROHLF, F.J. 1988. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.6. Exeter Software. Setauket, New York, USA.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- SNEATH, P. AND SOKAL, R. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. Freeman, San Francisco, USA.
- STAUB, T. 1991. Fungicide resistance: practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 421-442.
- VAN DER VLUGT-BERGMANS, C.J.B.; BRANDWAGT, B.F.; VAN'T KLOOSTER, J.W.; WAGEMAKERS, C.A.M. AND VAN KAN, J.A.L. 1993. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 97: 1193-1200.
- VOS, P.R.; HOGERS, M.; BLEEKER, M.; VAN DER LEE REIJANS, T.; HORMES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AND ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucl. Acid Res.* 18: 7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, J.A. AND TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- YARDEN, O. AND KATAN, T. 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478-1483.