

Tesina de grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias, Udelar

*Identificación y caracterización de cepas de
especies de *Penicillium* causantes del moho azul
en poscosecha de manzana*



Cecilia Schinca Rodríguez

2017

Tutora: Dra. Silvana Vero

Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, Udelar

Agradecimientos

- ❖ Primero que nada quiero agradecer a Silvana por permitirme realizar la tesis de grado bajo su tutoría. Por todo lo que me enseñó, por su apoyo y cariño. Y por sobre todas las cosas agradezco su infinita paciencia en todo este proceso.
- ❖ A todas mis compañeras del laboratorio 14: Belén y Gabriela que me acompañaron en los primeros pasos con los *Penicillium*, Silvana, Mariana, Vanessa, Virginia, por los consejos, la disposición siempre a colaborar y la buena onda que hicieron de mi pasaje por allí una experiencia maravillosa.
- ❖ A todos los compañeros del laboratorio de microbiología de la Facultad de Química que colaboraron en generar un lindo ambiente de trabajo.
- ❖ Al INIA por el apoyo financiero otorgado a través de un proyecto FPTA.
- ❖ Al Ing. Agrónomo Ignacio Aguilar y a Fernando Macedo por su colaboración en los análisis estadísticos del ensayo de fludioxonil en manaza.
- ❖ A mi familia por el apoyo constante durante la carrera y por darme mis espacios durante el proceso de esta tesis sin dejar de alentarme.
- ❖ A mis amigos por el aguante, los necesarios tirones de oreja y la buena onda.
- ❖ A Pablo especialmente por estar siempre, por no dejarme caer, por apoyarme, darme consejos y acompañarme.

Resumen

Uno de los grandes problemas en frutas almacenadas poscosecha es la podredumbre denominada moho azul producida por *Penicillium* spp. Es la principal enfermedad en manzanas almacenadas en cámara fría en EEUU, Canadá y Europa, así como en Uruguay.

En la mayoría de los casos, *Penicillium expansum* es descrito como el principal agente causal de la enfermedad, pero otras especies como *Penicillium solitum* y *Penicillium crustosum* han sido reportadas. Para la identificación de las especies de *Penicillium* en la actualidad los métodos moleculares resultan más rápidos, objetivos y de menor manipulación.

Una de las estrategias para controlar el desarrollo de estos patógenos durante el almacenamiento poscosecha de manzana, es la aplicación de distintos fungicidas. Los benzimidazoles, como el tiabendazol, son ampliamente utilizados a nivel mundial. Actúan por unión a la β -tubulina impidiendo la formación de los microtúbulos, evitando así la formación del huso cromático durante la mitosis. Sin embargo, la resistencia a estos fungicidas ha sido de rápida aparición, manifestándose en varias especies patógenas de manzana como *Penicillium expansum* y *Penicillium solitum*. Esta resistencia se debe, en la mayoría de los casos, a mutaciones puntuales en el gen que codifica para la β -tubulina. También se utilizan fungicidas del grupo de los fenilpirroles como el fludioxonil, el cual ha mostrado mayor efectividad a la hora de combatir la enfermedad. Este fungicida no está registrado en Uruguay para su uso en poscosecha de manzana, pero sí se utiliza en EEUU, Argentina y Chile.

En el presente trabajo, se identificaron y caracterizaron cepas nacionales de *Penicillium* aisladas de manzanas con síntomas de moho azul. Para la identificación se desarrolló un método basado en el análisis de los productos obtenidos de la digestión con determinadas enzimas de restricción de los amplicones de parte del gen de la beta tubulina y la región ITS1-ITS2 del ADN nuclear. Este método podría ser de utilidad en programas de monitoreo de especies causantes de moho azul en manzanas. La caracterización incluyó el estudio de la agresividad de las cepas en manzana y la evaluación de la sensibilidad a dos fungicidas: tiabendazol y fludioxonil. Se estudiaron además las bases moleculares de la resistencia al tiabendazol.

Índice

Agradecimientos	1
Resumen	2
Índice.....	3
1. Introducción.....	5
1.1. Producción de manzana en Uruguay.....	5
1.2. Moho azul en manzana	6
1.2.1. Especies que causan la enfermedad	6
1.2.2. Etiología y control	7
1.3. Bases moleculares de la resistencia a fungicidas.....	8
1.4. Métodos de monitoreo de resistencia a fungicidas	9
1.5. Resistencia a fenilpirroles.....	10
1.6. Resistencia a benzimidazoles	10
2. Objetivos	12
2.1. Objetivo general:	12
2.2. Objetivos específicos:.....	12
3. Materiales y métodos	13
3.1. Aislamientos utilizados	13
3.2. Desarrollo de método <i>in silico</i> para la identificación de los aislamientos.....	13
3.3. Análisis de las cepas uruguayas utilizando el método desarrollado.....	14
3.3.1. Extracción de ADN.....	14
3.3.2. Reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction)	15
3.3.3. Análisis de perfiles de restricción (Restriction Fragment Length Polymorfism, RFLP)	16
3.4. Identificación de aislamientos por análisis de secuencias del gen de la β tubulina	16
3.5. Caracterización de las cepas de acuerdo a su agresividad en manzana	17

3.6.	Caracterización de las cepas de acuerdo a su sensibilidad al tiabendazol (TBZ) y fludioxonil (FL).....	17
3.6.1.	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	17
3.6.2.	Determinación de la Concentración Efectiva Cincuenta (CE50).....	18
3.6.3.	Determinación de la sensibilidad en fruto para fludioxonil	18
3.7.	Caracterización de las cepas mediante el estudio de mutaciones en el gen de la β -tubulina causantes de baja sensibilidad al tiabendazol	19
4.	Resultados	20
4.1.	Desarrollo del método <i>in silico</i> para identificar los aislamientos	20
4.2.	Análisis de los aislamientos uruguayos utilizando el método desarrollado.....	21
4.3.	Identificación de aislamientos por análisis de secuencias del gen de la β tubulina	24
4.4.	Caracterización de las cepas de acuerdo a su agresividad en manzana	25
4.5.	Caracterización de las cepas de acuerdo a la sensibilidad a TBZ y FL.....	26
4.5.1.	Determinación de la CIM.....	26
4.5.2.	Determinación de la CE50 para el FL	27
4.5.3.	Determinación de sensibilidad en fruto para fludioxonil.....	27
5.	Discusión	31
6.	Conclusiones y perspectivas	34
7.	Bibliografía.....	35
Anexo I	39
Anexo II	41
Anexo III.	42

1. Introducción

1.1. Producción de manzana en Uruguay

La manzana constituye la principal producción nacional dentro de los frutales de hoja caduca, con más de 37675 toneladas producidas en la zafra 2015-2016 siendo la variedad Granny Smith la de mayor producción de acuerdo a los datos publicados por la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA, 2016). El destino principal de esta fruta (aproximadamente 85%) es el consumo en fresco en el mercado interno, derivándose el resto a la exportación o la industria en porcentajes variables según el año (DIEA, 2016). Luego de la cosecha y con el fin de equilibrar la oferta y demanda, la fruta se conserva en cámaras frías (0°C) de atmósfera común o controlada por períodos prolongados, que pueden llegar hasta más de 6 meses. A pesar de maximizar esfuerzos para reducir la susceptibilidad de los frutos y también minimizar las fuentes posibles de entrada de patógenos antes, durante y después de la cosecha, las pérdidas en la poscosecha en muchos casos siguen siendo significativas. Se estima que las pérdidas totales de frutas y hortalizas a nivel mundial alcanza el 45%, siendo la poscosecha una de las etapas de la cadena de suministro de alimentos con altos porcentajes de pérdidas, tanto en regiones industrializadas como en países en desarrollo (FAO, 2012). Parte de estas pérdidas son debidas a la acción de patógenos fúngicos que se desarrollan durante el almacenamiento poscosecha. Tradicionalmente, el control de dichos patógenos, se ha basado en la aplicación de fungicidas de síntesis química previo al almacenamiento. En la actualidad, es muy reducido el número de principios activos efectivos autorizados para su uso en esta etapa, debido principalmente a consideraciones toxicológicas y a exigencias de los importadores. Esto ha generado dificultades a la hora de instrumentar estrategias de manejo anti-resistencia, ya que las mismas se basan en la alternancia o rotación de principios activos de diferente modo de acción (Brent & Hollomon, 2007). Como consecuencia, se ha constatado la presencia de poblaciones de patógenos resistentes a los fungicidas más comúnmente utilizados en diferentes productos hortifrutícola (Wozniak, 2003; Esterio, Auger, Ramos, & García, 2007; Gepp et al., 2012). Por otra parte el uso de fungicidas, especialmente en esta etapa tan cercana al consumo, está siendo muy cuestionada por el público consumidor, el cual ha incrementado su conciencia acerca de los riesgos a la salud y al medioambiente que trae consigo el uso de fungicidas. Un nuevo concepto de calidad ha surgido. Los consumidores ya no se fijan solamente en la estética del producto, sino que exigen, que el mismo esté libre de residuos tóxicos y que, además, haya sido producido siguiendo prácticas sustentables y respetuosas del medio ambiente. Para poder dar respuesta a estas demandas

se han desarrollado programas de Producción Integrada (PI) y de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Estos Programas mediante la integración de los agricultores con los servicios de extensión y los centros de investigación implementan la producción comercial de frutas y hortalizas de alta calidad minimizando el uso de plaguicidas y sus efectos secundarios (Giacinti, 2003; Mondino et al. 2003). Es por lo tanto muy importante conocer los niveles de resistencia a los fungicidas disponibles de las poblaciones de patógenos locales de forma de utilizar solamente aquellos productos que resulten efectivos.

1.2. Moho azul en manzana

1.2.1. Especies que causan la enfermedad

Las principales enfermedades desarrolladas durante el almacenamiento poscosecha de manzana son causadas por hongos y son denominadas el moho azul y el moho gris en base a los síntomas y signos de la enfermedad (Turechek, 2004). El moho azul es la principal enfermedad en manzanas almacenadas en cámara fría en EEUU, Canadá y Europa (Sholberg et al., 2005), así como en Uruguay (Pianzola, Moscatelli, & Vero, 2004). Es causada en la mayor parte de los casos por *P. expansum*, pero puede ser provocada por otras especies del género *Penicillium* como *P. solitum* y *P. crustosum* (Frisvad & Samson, 2004; Samson, Seifert, Kuijper, Houbraeken, & Firsvad, 2004; Scholtz & Korsten, 2016).

La identificación de las especies de *Penicillium* suele realizarse principalmente por observaciones micro y macroscópicas y por características de crecimiento en diversos medios de cultivo (Pitt, 1997; Bandh, Kamili, & Ganai, 2012). Sin embargo estos métodos son laboriosos y requieren en algunos casos tiempos de incubación de hasta una semana, por lo cual actualmente se han desarrollado métodos moleculares, que resultan más rápidos, objetivos y de menor manipulación. Uno de éstos métodos es el desarrollado por Sholberg et al. (2005) para la identificación de distintas especies de *Penicillium* el cual se basa en la comparación de las secuencias de una región de 360 pb del gen de la β -tubulina. Vico et al. (2014) utilizaron para la identificación de cepas de *P. expansum* secuencias de la región del gen de la poligalacturonasa (Pepg1), la región ADNr ITS y parte del gen que codifica para la β -tubulina.

1.2.2. Etiología y control

La pudrición del moho azul no es considerada un problema en el campo, a pesar de que allí pueden aislarse estos hongos con facilidad. Es, sin embargo, una de las principales enfermedades en los establecimientos de almacenamiento. En estos lugares el inóculo primario de la enfermedad se encuentra en los recipientes y cámaras de almacenamiento contaminados. La infección ocurre cuando las conidias entran en las heridas que pueden encontrarse en manzanas dañadas durante la cosecha y manejo, producidas por insectos o por las lenticelas abiertas. Las conidias se diseminan principalmente por vía aérea, pero también pueden esparcirse por el agua utilizada en los baños de inmersión. Lo primero que se puede observar luego de la infección, es una lesión circular, blanda y hundida, de color amarillo a marrón pálido, en la superficie de la fruta. Las lesiones se expanden con rapidez, descomponiendo el tejido, volviéndolo acuoso y la cáscara de la fruta por encima de la pudrición toma una apariencia arrugada. En condiciones de humedad el hongo produce numerosas esporas verde-azuladas en la superficie de la fruta (Turechek, 2004).

Para controlar el desarrollo de los mencionados patógenos en manzana es indispensable el cuidado de las medidas de manejo de la fruta de forma de minimizar la aparición de heridas. A su vez son importantes las medidas de limpieza y sanitización de las plantas procesadoras y de los locales de almacenamiento con el fin de disminuir el inóculo primario. Por último, en los países en que está permitido, previo al almacenamiento, se realizan aplicaciones de fungicidas para minimizar el riesgo de aparición de podredumbres. Los fungicidas más utilizados a nivel mundial han sido los pertenecientes al grupo de los benzimidazoles, por ejemplo tiabendazol y los inhibidores de la síntesis del ergosterol de los cuales el de mayor aplicación ha sido el imazalil. Existen otros principios activos desarrollados, que han demostrado efectividad en el control del moho azul en manzanas durante el almacenamiento, como por ejemplo el pirimetanil y el fludioxonil (Li & Xiao, 2008; Sholberg et al., 2005). Este último fue registrado en 2004 en Estados Unidos para su uso en poscosecha en frutas pomáceas y en la actualidad está siendo utilizado en países de la región como Chile y Argentina (Colodner, 2011). Sin embargo, no está registrado para el control de moho azul en manzanas en nuestro país. Este fungicida pertenece al grupo de los fenilpirroles y es efectivo en inhibir la germinación de conidias y la elongación de los tubos germinales de *P. expansum* (Li & Xiao, 2008).

En Uruguay los fungicidas registrados para su uso en poscosecha de manzana son el tiabendazol, imazalil (imidazol), iprodione (dicarboximida), captan (ftalimidas), pirimetanil (anilino pirimidina), procloraz (imidazol) y carbenzadim (bencimidazol) (MGAP, 2017).

1.3. Bases moleculares de la resistencia a fungicidas

La resistencia de un hongo a un fungicida se puede definir como un rasgo estable y heredable en el individuo, el cual proporciona sensibilidad disminuida frente al producto, de forma tal que el hongo es resistente al fungicida a las dosis y condiciones normales de uso (Vero, Garmendia, Alborés, & Masi, 2009).

Existen diversos mecanismos bioquímicos que explican que un fungicida no produzca efecto en su organismo blanco (Ma & Michailides, 2005): modificación del sitio blanco, sobreexpresión de las moléculas que son blanco de acción del fungicida, activación en el hongo de los sistemas de eflujo del fungicida, activación de una vía alternativa a la afectada por el fungicida. Estos mecanismos de resistencia son consecuencia de mutaciones, que pueden ser inserciones, deleciones o sustituciones. Dichas mutaciones pueden ocurrir en un solo gen, monogénicas, o pueden producirse en varios genes, poligénica. El primer caso, se conoce también como resistencia cualitativa, ya que la aparición de este tipo de resistencia divide a la población del patógeno en individuos de mayor o de menor sensibilidad, sin observarse sensibilidades intermedias. Generalmente, se trata de mutaciones que provocan un cambio en el sitio blanco del fungicida. La resistencia poligénica o cuantitativa se manifiesta en un cambio gradual de los niveles de sensibilidad de la población de patógenos debido a la acumulación de mutaciones, observándose individuos con distintos grados de sensibilidad. Este tipo de resistencia se ha encontrado asociada a una reducción en la concentración intracelular del fungicida por cambios en los sistemas de eflujo del hongo, al uso de vías alternativas a las afectadas por el fungicida y a la sobreexpresión de las moléculas blanco (Deising, Reimann, & Pascholati, 2008).

1.4. Métodos de monitoreo de resistencia a fungicidas

Existen varias técnicas para el monitoreo de la presencia y distribución de cepas resistentes a fungicidas, la mejor a utilizar dependerá del patógeno y del fungicida. Los métodos más comunes *in vitro* para monitorear la resistencia a un fungicida de un patógeno consisten en la inoculación directa de aislamientos en un medio con distintas concentraciones del fungicida y en la determinación de la inhibición del crecimiento o la inhibición de la germinación de esporas. En general, pueden utilizarse distintos métodos, por ejemplo, la determinación de la de concentración inhibitoria mínima del fungicida (CIM) o la determinación de la concentración efectiva (CE) 90 o 50.

La CIM, se define como la mínima concentración de fungicida que impide el crecimiento del hongo, y debe determinarse para cada aislamiento. Este tipo de ensayo se realiza para determinar la sensibilidad de aislamientos fúngicos de origen clínico. El ensayo de referencia del método utilizado por los laboratorios clínicos fue desarrollado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de Estados Unidos. El mismo consiste en inocular una cantidad estandarizada del hongo en estudio en tubos de medio líquido conteniendo cantidades crecientes de fungicida. Luego de un período de incubación se determina la mínima concentración de fungicida que impide el crecimiento. Las concentraciones, medios y tiempos de incubación se establecen para cada fungicida y cada patógeno. Un grupo de investigadores modificó este método para realizarlo en placas con medio sólido, y comprobaron su eficacia para determinar la resistencia a tiabendazol de cepas de *P. expansum* (Cabañas, Abarca, Bragulat, & Cabañas, 2009). Esta adaptación tiene como ventaja que se pueden sembrar varios aislamientos por placa, ahorrando tiempo y medio de cultivo.

La CE50 o CE90 representa la concentración de fungicida que inhibe en un 50% o 90% alguna característica asociada al crecimiento del hongo como por ejemplo el crecimiento micelial o la germinación de esporas. Es uno de los métodos más frecuentemente propuestos por el FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) para determinar la sensibilidad de determinados hongos a determinados fungicidas.

La resistencia a fungicidas puede ser monitoreada también mediante métodos moleculares. Los mismos implican un conocimiento previo de los cambios genéticos del patógeno asociados a la resistencia y se basan en la detección de dichos cambios.

1.5. Resistencia a fenilpirroles

Los fenilpirroles son análogos químicos de la pirrolnitrina, compuesto natural con reconocida actividad antifúngica producido por *Pseudomonas spp.* Estos fungicidas, representados por el fludioxonil y el fenpiclonil, tienen varios efectos fisiológicos importantes en el hongo blanco que incluyen la hiperpolarización de membrana, cambios en el metabolismo del carbono y la acumulación intracelular de metabolitos, en particular glicerol, lo cual provoca el aumento de volumen y el estallido de las hifas. Se ha demostrado que estos fungicidas producen la activación de los mecanismos de respuesta a shock osmótico a través de una histidina quinasa que forma parte de la cascada de señalización de la respuesta (Kilani & Fillinger, 2016). Se ha encontrado, hasta el momento que la resistencia a estos fungicidas, se debe a mutaciones puntuales en el gen que codifica para dicha histidina quinasa que provoca que la proteína no sea capaz de reconocer el fungicida como activador de la cascada. Los mutantes de laboratorio resistentes a fludioxonil resultan sensibles al stress osmótico (Leroux et al., 2002) lo cual disminuye su habilidad competitiva y por lo tanto son pocos los hallazgos de cepas resistentes (Kilani & Fillinger, 2016). Sin embargo, se han detectado cepas de *Alternaria alternata* y de *Penicillium expansum* con resistencia natural a dichos fungicidas (Avenot & Michailides, 2015; Gaskins, Vico, Yu, & Jurick II, 2015).

1.6. Resistencia a benzimidazoles

Los benzimidazoles actúan por unión a la β -tubulina impidiendo la formación de los microtúbulos, evitando así la formación del huso cromático durante la mitosis. Por ello han sido clasificados por el FRAC (FRAC: Fungicide Resistance Action Committee, 2013) como inhibidores de la mitosis y división celular (Fishel, 2009).

La resistencia a estos fungicidas ha sido de rápida aparición, manifestándose en varias especies fúngicas patógenas de manzana tales como *Penicillium expansum* y *Penicillium solitum* (Sholberg et al., 2005; Vero et al., 2009). Esta resistencia se debe, en la mayoría de los casos a mutaciones puntuales en el gen de la β -tubulina, principalmente por cambios en los codones 198, 200 y 240 (Malandrakis et al., 2013; Sholberg et al., 2005). El tiabendazol es un fungicida que pertenece a este grupo.

Sholberg y colaboradores (2005) encontraron una asociación entre el codón 198 del gen de la beta tubulina y la resistencia al tiabendazol en *P. expansum* y *P. solitum*. En los aislamientos que analizaron, sustituciones en el codón 198 de GAG por GCG o GTG siempre correspondían a cepas resistentes al fungicida. De todas formas, también encontraron aislamientos resistentes con la secuencia GAG en el codón 198 de la beta tubulina, sugiriendo para esos casos que la resistencia podría ser el resultado de otras mutaciones en el gen de la beta tubulina o en otros genes. Otros investigadores encontraron otras mutaciones en el gen de la beta tubulina relacionadas con la resistencia de *P. expansum* a este fungicida (Cabañas, Castellá, Abarca, Bragulat, & Cabañas, 2009; Li & Xiao, 2008).

El conocimiento de la aparición de resistencia a los fungicidas y las bases moleculares de la misma es importante para realizar una correcta utilización de estos compuestos y poder realizar un sistema de aplicaciones que permitan un correcto manejo anti resistencia.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

Identificar y caracterizar cepas de *Penicillium spp.* causantes de moho azul en manzanas en Uruguay.

2.2. Objetivos específicos:

- Desarrollar un método molecular sencillo para la identificación a nivel de especie de cepas de *Penicillium* causantes de moho azul.
- Identificar aislamientos nativos de estos hongos mediante el método desarrollado.
- Caracterizar las cepas identificadas de acuerdo a su agresividad y sensibilidad a dos fungicidas: fludioxonil y tiabendazol.
- Caracterizar las cepas de mediante el estudio de las mutaciones presentes en el gen de la beta tubulina de las cepas con baja sensibilidad al tiabendazol.

3. Materiales y métodos

3.1. Aislamientos utilizados

En el presente trabajo se estudiaron 53 aislamientos de *Penicillium* spp obtenidos por Silvana Vero y su grupo de colaboradores previamente. Para obtenerlos, realizaron aislamientos de patógenos a partir de fruta con síntomas de podredumbre azul a salida de cámara de la cooperativa Jumecal, correspondientes a diferentes productores de la zona de Melilla. Los frutos fueron desinfectados superficialmente y se procedió a sembrar pequeños trozos de la zona de avance de las podredumbres en medio Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid) adicionado con sulfato de estreptomina (5 ppm), los cuales se incubaron a 25 °C hasta aparición de micelio. La identificación hasta nivel de género se realizó mediante observación de características culturales y morfológicas de cada aislamiento. A partir de los aislamientos terverticilados, del género *Penicillium* se realizaron 53 aislamientos monospóricos en PDA, los cuales se mantuvieron en tubo de PDA inclinado a 4 °C hasta su uso.

Se utilizó también la cepa de *P crustosum* de colección CBS 313.48.

3.2. Desarrollo de método *in silico* para la identificación de los aislamientos

En primer lugar, se desarrolló *in silico* un método de diferenciación de las tres especies: *P. expansum*, *P. solitum* y *P. crustosum* que pueden ser causantes del moho azul en manzana (Frisvad & Samson, 2004; Samson et al., 2004; Scholtz & Korsten, 2016). El método se basó en el corte con enzimas de restricción (RFLP) de dos regiones génicas: parte del gen de la beta tubulina y la región ITS1-ITS2 del ADN nuclear.

En todos los casos posibles se utilizaron secuencias de cepas tipo o de colección almacenadas en la base de datos GenBank (Clark, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell, & Sayers, 2016) del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 se utilizaron las siguientes secuencias: FJ463031, AY373907.1 y AY373932.1 correspondientes a las cepas *P. expansum* NRRL 976, *P. crustosum* FRR 1669 y *P. solitum* FRR 937. Para el gen de la beta tubulina se utilizaron secuencias depositadas en GenBank (Clark et al., 2016) de tamaño similar o mayor a las obtenidas en este trabajo (aproximadamente 1000 pb). Las secuencias seleccionadas fueron las siguientes:

JN872741.1, FJ012872.1 y JN112030.1 correspondientes a las cepas *P. expansum* 3740, *P. solitum* PTB 150, y *P. crustosum* IBT 21518 respectivamente.

Se alinearon las secuencias seleccionadas utilizando el programa MEGA5 (Tamura et al., 2011) y se recortaron de forma de que tuvieran el mismo tamaño. Luego, mediante la utilización del programa Webcutter 2.0 (Heiman, 1997) se obtuvieron perfiles de restricción con diferentes enzimas y se realizó el análisis, seleccionando enzimas que permitieran diferenciar las tres especies. Habiendo seleccionado la enzima se determinó el perfil electroforético esperado en cada caso utilizando el programa NEBcutter (Vincze, Posfai, & Roberts, 2003) suponiendo que se utilizaba un gel de agarosa al 1%.

3.3. Análisis de las cepas uruguayas utilizando el método desarrollado

Basados en estos resultados, se realizaron análisis de las dos regiones para todos los aislamientos uruguayos obtenidos. Para ello se realizó la extracción de ADN de los aislamientos, la amplificación de las dos regiones y el corte con las enzimas seleccionadas.

3.3.1. Extracción de ADN

Para extraer ADN de las muestras los aislamientos fueron inoculados en 5 ml de medio YES (2% extracto de levadura, 15% sacarosa) e incubadas a 25 °C durante aproximadamente 5 días, de forma de obtener micelio sin esporulación. Luego del tiempo de incubación se recuperó el micelio, se secó con papel estéril y una porción se trasvasó a un microtubo estéril de 2 ml. Se congeló con nitrógeno líquido y se molió con una varilla de vidrio. Al micelio pulverizado se le agregaron 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 250 mM, 2% SDS) y se agitó con vortex. Se incubaron las muestras 1 hora a 65 °C. Se añadieron 500 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos. Se traspasaron 300 µl de la fase acuosa cuidadosamente en un nuevo tubo y se adicionaron 300 µl de NaCl 1M y 300 µl de NaOAc 3M. Se homogenizó y luego se agregó un volumen de isopropanol frío invirtiéndose suavemente el tubo 3 veces para homogenizar. Se incubaron las muestras a -20 °C durante 2 horas aproximadamente. Se centrifugaron otra vez a 12000 rpm por 10 minutos, descartándose luego el sobrenadante. Se dejaron secar los microtubos en estufa a 35 °C hasta evaporación total del solvente. Se resuspendió el ADN obtenido en 50 µl de agua MQ estéril. Se agregó 1 µl de ARNasa (10

mg/ml) y se incubó 1 hora a 37°C. Se añadieron 500µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y luego se adicionaron 300µl de NaCl 1M y 300µl de NaOAc 3M. Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos para luego traspasar 300 µl de la fase acuosa cuidadosamente en un nuevo microtubo. Se agregó un volumen de isopropanol frío y se incubaron las muestras a -20 °C durante 2 horas aproximadamente. Se centrifugaron otra vez a 12000 rpm por 10 minutos, descartándose luego el sobrenadante. Se agregaron 100 µl de etanol 70%, se centrifugó en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se dejaron secar los microtubos en estufa a 35 °C durante aproximadamente 30 minutos. Se resuspendió el ADN obtenido en 50 µl de agua MQ. La presencia o ausencia de ADN se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa 0.8% conteniendo bromuro de etidio como indicador. El gel se reveló bajo una lámpara UV.

3.3.2. Reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction)

Tanto como para la amplificación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 como para la amplificación del gen de la beta tubulina se realizó una mezcla de reacción de 25 µl, con 12,5 µl de PCR master mix 2x (Fermentas), 1µl cada primer en concentración 25 µM, 1 µl de ADN y el resto de agua MQ.

Para la amplificación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 los primers utilizados fueron ITS1 (5´- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) e ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3´). Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos seguida de 35 ciclos (94 °C 1 minuto, 55 °C 2 minuto, 72 °C 2 minutos) terminando con una extensión durante 10 min a 75°C. Se incluyó un control con la mezcla de reacción sin ADN. El gen de la beta tubulina se amplificó con los primers Bt-T2M-Up y Bt-LEV-L01 (de Jong et al., 2001) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización durante 3 minutos a 95 °C seguida por 35 ciclos (95 °C 30 segundos, 60 °C 30 segundos, 72 °C 2 minutos), y una extensión durante 10 minutos a 72 °C. En ambos casos se incluyó un control con la mezcla de reacción sin ADN. Para ambas amplificaciones se utilizó un termociclador MultiGene Mini thermocycler (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA).

La presencia o ausencia de los productos de PCR se determinó mediante electroforesis. Se utilizó un gel de agarosa 0.8% conteniendo bromuro de etidio como indicador. El gel se reveló bajo una lámpara UV. Se utilizó un marcador molecular de 1Kb (Fermentas).

3.3.3. Análisis de perfiles de restricción (Restriction Fragment Length Polymorfism, RFLP)

Basados en los resultados *in silico*, se seleccionaron enzimas de restricción para la digestión de la región de ITS1-5.8SrADN-ITS2 y para la digestión del gen de la beta tubulina. Las digestiones para la identificación se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Los perfiles obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% conteniendo bromuro de etidio como indicador. El gel se reveló bajo una lámpara UV. Se utilizaron marcadores moleculares de 1Kb plus y de 50pb (Fermentas). Se utilizó una calculadora *on line* (Northwestern University, n.d.) para calcular los tamaños de los fragmentos de acuerdo a las distancias migradas.

3.4. Identificación de aislamientos por análisis de secuencias del gen de la β tubulina

Los amplicones correspondientes al gen de la β tubulina de varios aislamientos fueron secuenciados de forma bidireccional en la empresa Macrogen, Korea (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del Genbank mediante Blast (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990) de forma de determinar similitudes con secuencias allí depositadas.

Con las secuencias del gen de la β tubulina de los aislamientos M2P3, P11, P46, PL34, R40 y secuencias de la misma región de las especies más cercanas obtenidas en el análisis anterior, se construyó un árbol filogenético. A su vez, se incluyó la secuencia correspondiente a la cepa tipo *Penicillium brevicompactum* IBT18329 como grupo externo. Las distancias evolutivas se calcularon mediante el método de Jukes–Cantor y el árbol filogenético fue obtenido mediante Neighbor-Joining. Todas las posiciones conteniendo gaps o datos faltantes fueron eliminadas de forma previa al análisis, en comparaciones de a pares (pairwise deletion option). La estabilidad de los grupos fue alcanzada con 1000 repeticiones (bootstrap). Todos los análisis fueron realizados en el programa MEGA5 (Tamura et al., 2011).

3.5. Caracterización de las cepas de acuerdo a su agresividad en manzana

Se prepararon suspensiones de conidias de 21 cepas con una concentración de 10^4 conidias/ml. Para preparar las mismas, se siembran previamente todas las cepas en tubos de PDA inclinado y se incuban a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 hs. Se agrega suero fisiológico con tween 0,1% hasta la mitad del tubo y se agita el tubo con la mano. Se traspasa 1 ml de la fase acuosa a un microtubo. Se realiza conteo de conidias utilizando cámara de Neubauer, para luego realizar diluciones hasta obtener el número de conidias deseadas. Para el ensayo de agresividad, en primer lugar se desinfectaron superficialmente las manzanas utilizando etanol 70%. Se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se realizaron heridas de unos 3 mm de profundidad utilizando un pequeño clavo previamente desinfectado. Se realizaron 3 heridas en cada manzana y se utilizaron 3 manzanas para cada cepa. Nuevamente se dejaron secar, para posteriormente inocular las manzanas con las suspensiones de conidias. Se incubaron en cámara fría entre 0 y $1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente se determinó el diámetro de la pudrición producida en cada herida a los 2 meses. Los datos se sometieron a análisis de varianza y las diferencias entre medias de los respectivos tratamientos se determinaron mediante el test de Tukey con un nivel de significación del 5% ($\alpha = 0.05$) utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

3.6. Caracterización de las cepas de acuerdo a su sensibilidad al tiabendazol (TBZ) y fludioxonil (FL).

3.6.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La CIM de los fungicidas FL y TBZ fue evaluada para los aislamientos de *Penicillium* mediante siembra en placas de PDA con concentraciones crecientes de fungicida. Las placas se prepararon con Potato Dextrose Agar (Oxoid), al que previamente se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C , se termostató a 45°C y luego se agregaron las cantidades adecuadas de fungicida para alcanzar las concentraciones deseadas: 1, 2, 16, 64 y 128 ppm para el fungicida TBZ y 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ppm en el caso del FL. La siembra se realizó depositando en las distintas placas $1\mu\text{L}$ de una suspensión de 10^5 conidias/ml proveniente de cada cultivo monospórico. Se sembraron entre 4 y 8 muestras por placa. Para todos los ensayos se sembraron de la misma manera controles en placas sólo con PDA. Las placas fueron incubadas a 25°C por 48 horas. Se determinó la CIM como la menor concentración de cada fungicida a la cual no se observó crecimiento de una determinada cepa

3.6.2. Determinación de la Concentración Efectiva Cincuenta (CE50)

Para la CE50 del fungicida fludioxonil se prepararon placas de PDA con concentraciones crecientes de fungicida. Al igual que para la CIM, primero se esterilizó el medio y luego se adicionó el fungicida en cantidades apropiadas. Se utilizaron placas con concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 0.75 ppm para las cepas que se encontraron sensibles según la CIM y placas con concentraciones de 5, 10, 15, 20 ppm para las cepas con CIM mayores a 16 ppm. Se sembraron discos de micelio de 5mm aproximadamente (entre 2 y 3 muestras por placa). Se incubaron durante 5 días en estufa 25°C en la oscuridad. Luego se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial comparando el crecimiento a cada concentración con el control correspondiente. Se transformaron dichos porcentajes al valor probit (para linealizar los datos) y se graficó ese valor en función del Logaritmo de la concentración del fungicida. La dosis efectiva cincuenta se obtuvo a partir de esos gráficos.

3.6.3. Determinación de la sensibilidad en fruto para fludioxonil

Para las cepas que presentaron baja sensibilidad al FL se determinó la sensibilidad también en fruto. Se realizaron dos tratamientos: manzanas con y sin fungicida. Se utilizaron 15 manzanas por tratamiento. En ambos casos las manzanas, se desinfectaron previamente con alcohol 70% y luego se dejaron secar. Se hicieron 5 perforaciones en cada manzana utilizando un pequeño clavo previamente desinfectado. Para el primer tratamiento se sumergieron 2 minutos aproximadamente en un baño con FL en condición de uso (80-100 g/hL de fungicida 50%). Se dejaron secar. El segundo tratamiento consistió en las manzanas sin fungicida. Finalmente se inocularon, para ambos tratamientos, las suspensiones de 10^4 conidias/ml. Se almacenaron las manzanas inoculadas durante un mes y medio en bandejas en cámara fría. Finalmente se observó el crecimiento y aparición de síntomas para cada aislamiento. Los resultados se analizaron utilizando modelos lineales generalizados asumiendo distribución de Poisson, con transformación log, según el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

3.7. Caracterización de las cepas mediante el estudio de mutaciones en el gen de la β -tubulina causantes de baja sensibilidad al tiabendazol

Las cepas que mostraron resistencia al tiabendazol fueron analizadas molecularmente para determinar el tipo de mutación causante de la resistencia a TBZ. Para ello se amplificó la región de la β -tubulina, utilizando el método detallado anteriormente en la sección de identificación. Los amplicones obtenidos fueron enviados para su secuenciación en ambos sentidos a la empresa MacroGen Korea (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Como control se amplificó y secuenció la misma región de una cepa de *P. expansum* (P11) sensible. Las secuencias recibidas fueron analizadas y depuradas según la calidad de las mismas. Para cada cepa se obtuvo una secuencia consenso mediante alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas a partir del primer forward y el reverse utilizando el programa MEGA5 (Tamura et al., 2011). Las secuencias obtenidas se compararon entre sí y con la cepa sensible utilizando el mismo programa. A su vez, las secuencias se alinearon con la secuencia FJ457081.1 del GenBank para definir la zona del gen a analizar (Cabañas, Castellá, et al., 2009).

4. Resultados

4.1. Desarrollo del método *in silico* para identificar los aislamientos

A partir del análisis *in silico* de las secuencias seleccionadas se decidió utilizar a la enzima de restricción HinfI para la digestión de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 para diferenciar a *P. expansum* de *P. solitum* y *P. crustosum*. Se seleccionó la enzima de restricción HhaI para la digestión de la región amplificada de parte del gen de la β -tubulina para distinguir *P. solitum* de *P. expansum* y *P. crustosum*. Luego de definir las enzimas para el corte de cada región, se determinó el perfil electroforético esperado en cada caso utilizando el programa NEBcutter (Vincze et al., 2003) (Figura 1).

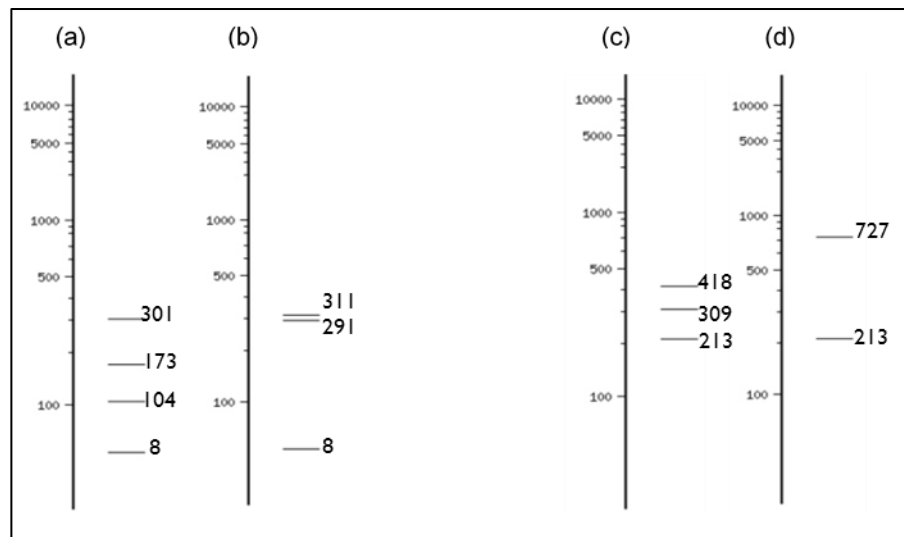


Figura 1. Se observan los perfiles electroforéticos esperados del corte de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 con la enzima Hinf I para *P. expansum* (a) y para *P. crustosum* y *P. solitum* (b). Los perfiles electroforéticos esperados luego del corte con la enzima HhaI de parte del gen de la beta tubulina se observan en (c) para *P. solitum* y para *P. expansum* y *P. crustosum* en (d).

De acuerdo al análisis, luego de la digestión de la región ITS se obtiene desde la región 3' 4 bandas de 173, 104, 8 y 301 pb en el caso de *P. expansum*, y de 3 bandas de 291, 8 y 311 pb en los casos de *P. solitum* y *P. crustosum*. En el caso de la región de la beta tubulina estudiada, luego de la restricción se obtendrían desde la región 3' dos bandas de 213 y 727 pb en el caso de *P. expansum* o *P. crustosum* y 3 bandas de 213, 418 y 309 pb en el caso de *P. solitum*.

4.2. Análisis de los aislamientos uruguayos utilizando el método desarrollado

Los resultados de la extracción de ADN según el protocolo indicado, se visualizó en geles de agarosa al 0,8% para todos los aislamientos. En la figura 2 se pueden observar los resultados para algunos de los aislamientos (Figura 2).

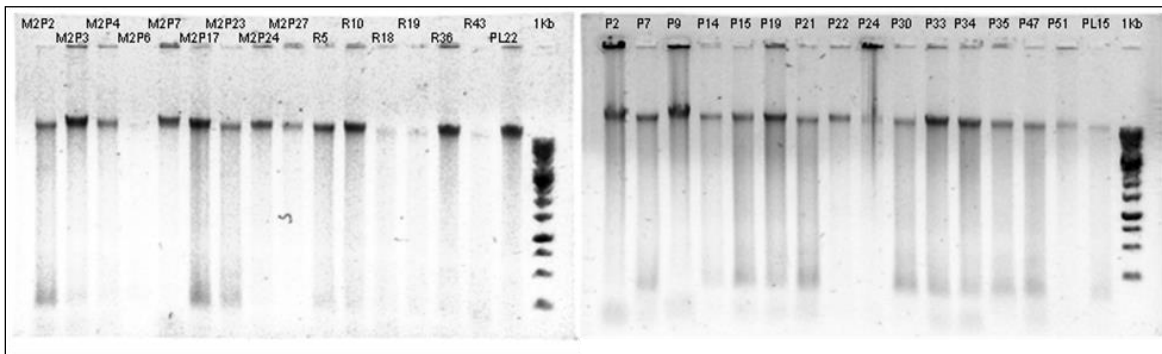


Figura 2. Extracciones de ADN de los aislamientos de *Penicillium* spp. visualizadas en geles de agarosa 0,8%. Se indica en cada carril la cepa analizada. Se utilizaron marcadores de peso molecular de 1kb (Fermentas).

Luego de las reacciones de PCR, se obtuvo para todos los aislamientos un amplicón de aproximadamente 600 pb correspondiente a la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 y de 1000pb correspondiente a la parte del gen de la beta tubulina amplificada, utilizando los primers y las condiciones de amplificación detalladas anteriormente. En la figura 3 se observan los resultados de algunos de los aislamientos.

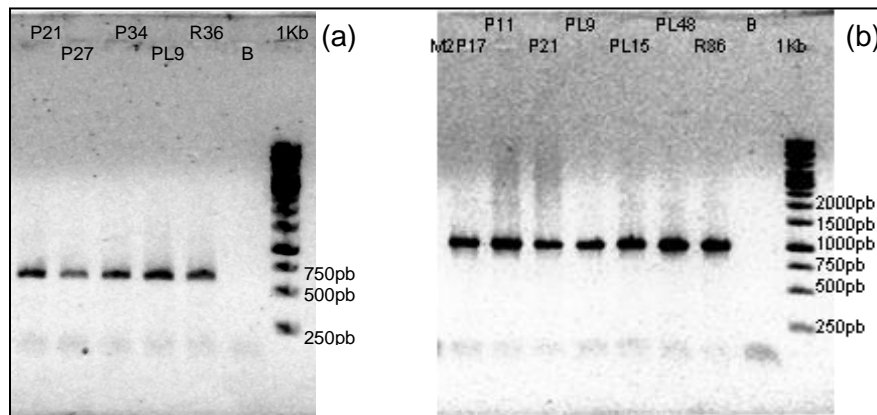


Figura 3. (a) PCR de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 del ADN nuclear. (b) PCR de parte del gen que codifica a la beta tubulina y que incluye los codones 180 y 200.

De acuerdo a los resultados obtenidos *in silico* es posible diferenciar por el método desarrollado, a las tres especies de *Penicillium* capaces de producir síntomas de moho azul en manzanas según Samson et al. (2004); Frisvad y Samson, (2004); Scholtz y Korsten, (2016). De esta forma, se sometieron experimentalmente al análisis a las 53 cepas aisladas en este trabajo. Los resultados evidencian que todas las cepas mostraron los perfiles esperados para *P. expansum*, a excepción de una de ellas (M2P3) cuyos perfiles de restricción en ambas regiones podrían coincidir con *P. solitum* (Anexo I).

Las Figuras 4 y 5 muestran algunos de los perfiles obtenidos para los aislamientos para cada una de las regiones amplificadas. Los cortes de la región ITS1-ITS2 dieron como resultado una banda doble de 310 pb para la cepa M2P3 y *P. crustosum* y tres bandas para el resto de las cepas de 310, 195 y 110 pb. En el caso de la restricción de la beta tubulina para la cepa M2P3 se obtuvieron 3 bandas de tamaños 250, 334 y 428pb y para el resto de las cepas dos bandas de 250 y 765 pb.

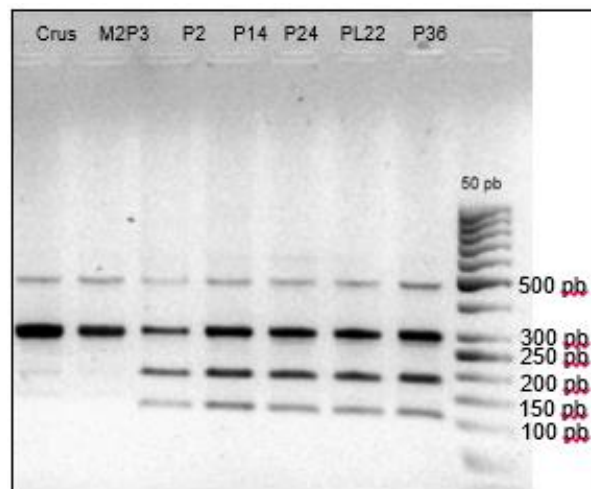


Figura 4. RFLP de la región ITS1-ITS2 del ADN nuclear utilizando la enzima de restricción Hinf I. Carril 1-7: *P. crustosum* CBS 313.48, M2P3, P2, P14, P24, PL22, P36; carril 8: marcador de peso molecular 50 kb (Fermentas).

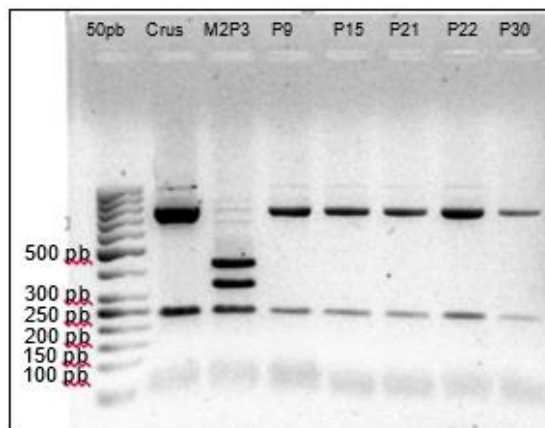


Figura 5. RFLP de parte del gen de la beta tubulina utilizando la enzima de restricción Hha I, carril 1: marcador de peso molecular 50pb, carril 2-7: *P. crustosum* colección, M2P3, P9, P15, P21, P22, P30.

En todos los casos se obtuvieron bandas de mayor tamaño que el esperado, debido a que para el análisis *in silico* se utilizan secuencias depositadas en las bases de datos, las cuales siempre son menores que el amplicón completo obtenido por PCR. En general, cuando se secuencia un producto de PCR, la calidad de secuencia obtenida en los extremos no es buena y por lo tanto los mismos se suprimen cuando la misma es depositada. En particular, para la beta tubulina, se utilizaron secuencias de 940 pares de bases para el análisis *in silico*, siendo los amplicones obtenidos un poco mayores a 1000 pares de bases. En el caso de los perfiles obtenidos para la región ITS, se observa que la restricción en todos los casos fue incompleta ya que la banda de mayor peso molecular corresponde al amplicón obtenido (entre 500 y 600 pb). Además, en los geles no se observa la banda pequeña de 8 pares de bases, esperada en ambos perfiles, lo cual era previsible. A su vez, las dos bandas de 291 y 311 pb esperadas para *P. solitum* y *P. crustosum* aparecen solapadas. De cualquier modo los perfiles obtenidos son claramente diferentes.

4.3. Identificación de aislamientos por análisis de secuencias del gen de la β tubulina

La Figura 6 muestra el árbol filogenético que corrobora la identificación de acuerdo al análisis RFLP de las cepas seleccionadas. Se incluyeron en el árbol secuencias correspondientes a las especies más cercanas obtenidas en el análisis con Blast (Altschul et al., 1990).

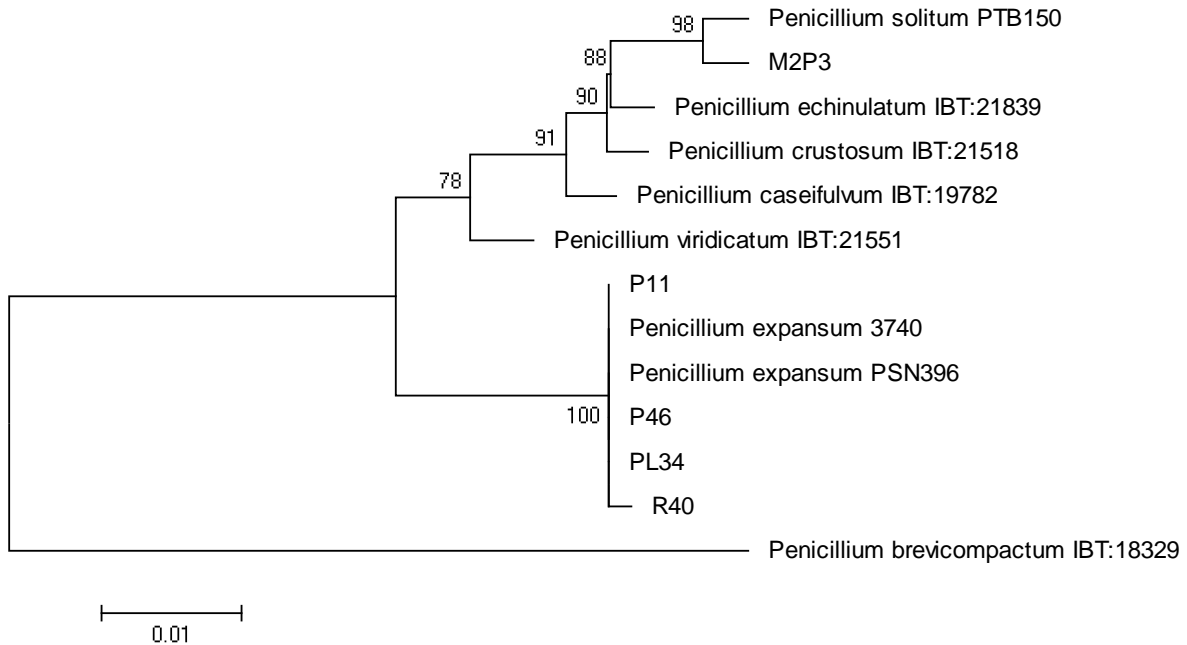


Figura 6. Árbol filogenético que muestra la ubicación de las cepas M2P3, P11, P46, PL34, R40 entre especies del género *Penicillium*. Se muestra el árbol consenso obtenido de 1000 réplicas derivado del análisis de parte del gen de la β tubulina. Los valores de bootstrap se muestran sobre cada nodo.

4.4. Caracterización de las cepas de acuerdo a su agresividad en manzana

Los resultados del ensayo de agresividad en manzana (medida como el diámetro de pudrición luego de 2 meses de almacenamiento a 0°C) de 20 cepas de *P. expansum* analizadas se muestran en la figura 7. Se observan 3 grupos (a, ab y b) de acuerdo al análisis realizado, pudiéndose concluir que la cepa P35 que conforma el grupo 'a' es significativamente menos agresiva que las cepas pertenecientes al grupo b (P14, 1PL38, R10, PL35, P34, R5, PL9, P51, M2P2, P22, P11, P15). (Anexo I).

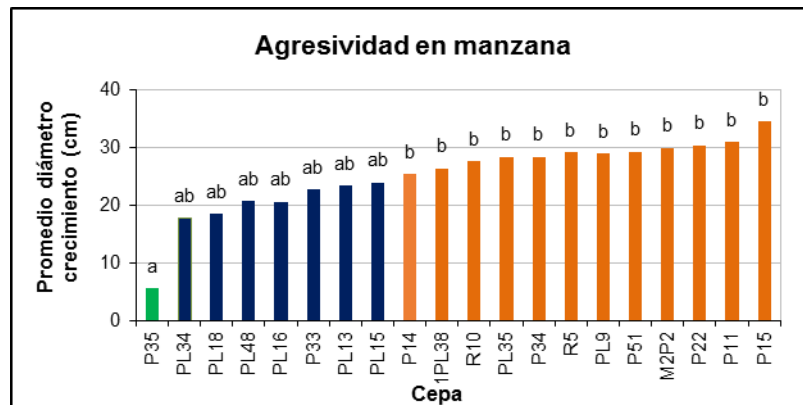


Figura 7. Diámetro de la pudrición causada por diferentes cepas de *P. expansum* en manzanas almacenadas a 0-1°C durante 1 mes. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha= 0.05$).

Las manzanas inoculadas con la cepa M2P3, identificada como *P. solitum*, no mostraron síntomas de enfermedad luego del período de análisis.

4.5. Caracterización de las cepas de acuerdo a la sensibilidad a TBZ y FL

4.5.1. Determinación de la CIM

La distribución de los valores de CIM de TBZ para las cepas estudiadas se pueden observar en la Figura 8. En este caso, la sensibilidad de *Penicillium* no resultó homogénea, ya que el 34% de los aislamientos presentó una CIM mayor de 128ppm mientras que el 66% restante resultó sensible con valores de CIM menores de 1 ppm, no detectándose resistencias intermedias.

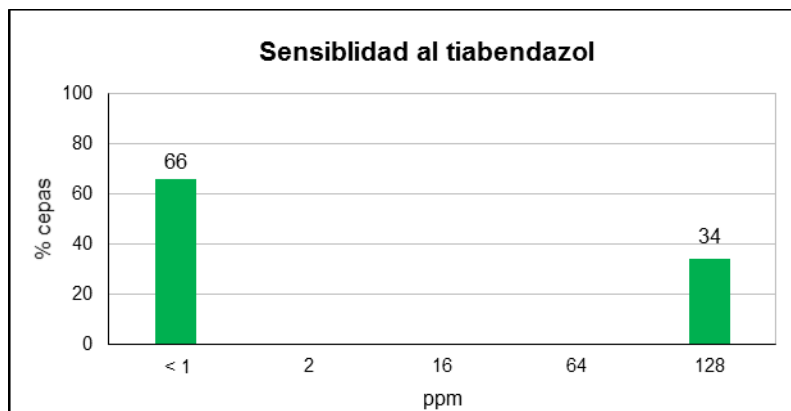


Figura 8. Resultados de CIM para TBZ de los aislamientos de *Penicillium spp.*

En el caso del FL se puede observar que la mayoría de los aislamientos presentan una CIM menor a 0.5ppm (Figura 9). Se destaca que la cepa de *P. expansum*, P11, y la cepa identificada como *P. solitum*, M2P3, presentan una CIM mayor a 16 ppm.

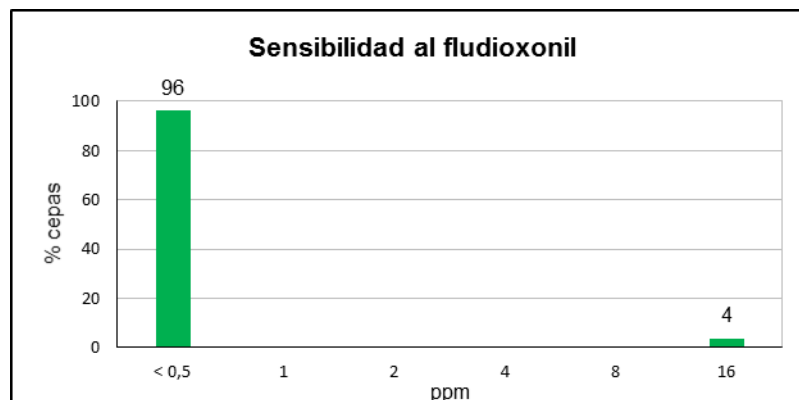


Figura 9. Resultados de CIM para fludioxonil de las cepas de *Penicillium spp.*

4.5.2. Determinación de la CE50 para el FL

Los valores de CE50 para el fludioxonil pueden observarse en la figura 10. La mayoría de los aislamientos presentaron CE50 entre 0,01 y 0,1 mg/L. Se destaca que la cepa P11, de menor sensibilidad de acuerdo a su CIM, presentó una CE50 superior al resto (0,93 mg/L).

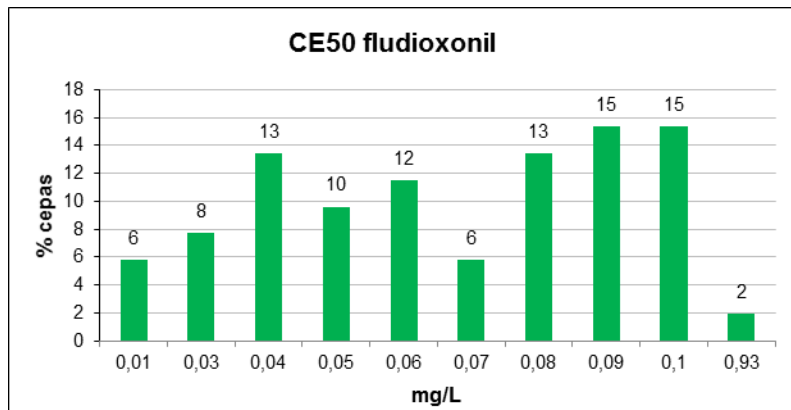


Figura 10. Resultados de la CE50 para fludioxonil de los aislamientos de *Penicillium spp.*

4.5.3. Determinación de sensibilidad en fruto para fludioxonil

Con los aislamientos que mostraron baja sensibilidad al FL *in vitro*, P11 y M2P3, se estudió la sensibilidad al fungicida en manzana. Se utilizó además la cepa PL9, que mostró ser sensible al fungicida *in vitro* (Figura 11).



Figura 11. Se muestran algunas de las manzanas inoculadas con las 3 cepas ensayadas: P11, M2P3 y PL9. Se puede observar el crecimiento de cada una luego de un mes y medio de almacenamiento en cámara fría.

El tratamiento con fungicida resultó significativo (Anexo II), es decir que se observó diferencia de aparición de síntomas entre las manzanas sumergidas en FL y las manzanas sin el fungicida. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las cepas, es decir que según el ensayo realizado todas las cepas resultaron sensibles al FL en condiciones de uso.

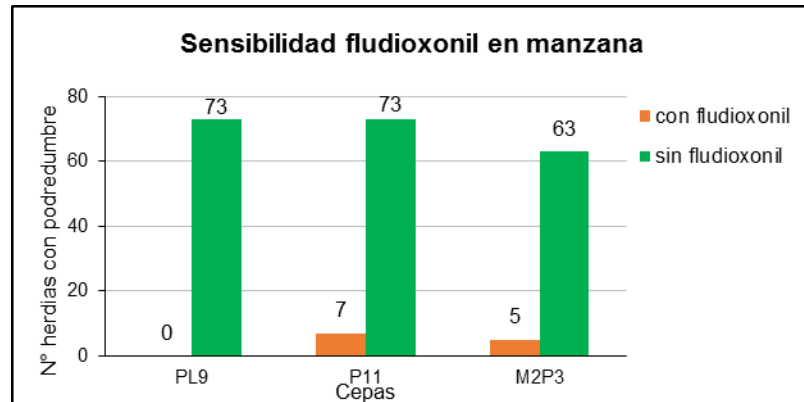


Figura 12. Para cada una de las cepas ensayadas, PL9, P11 y M2P3, se muestra para los dos tratamientos (con y sin fludioxonil) el número de heridas con podredumbre luego de un mes y medio de almacenamiento en cámara fría.

4.6. Caracterización de las cepas mediante el estudio de mutaciones en el gen de la β -tubulina causantes de baja sensibilidad al tiabendazol

A las cepas que presentaron baja sensibilidad al TBZ y una caracterizada como resistente al mismo (P11) se les amplificó la región del gen de la beta tubulina que abarcó 1000 pares de bases aproximadamente. El análisis realizado incluyó 624 pares de bases, región donde se encontrarían las mutaciones naturales que confieren resistencia al TBZ de acuerdo a Cabañas et al. (2009). Las secuencias se alinearon con la secuencia NRRL976 (GenBank FJ457081.1) que corresponde a 191 aminoácidos del gen, comenzando en el codón 167, y posee un intrón de 51 pares de bases (Anexo III).

Cepa	Codón 167	Codón 198	Codón 240	Tipo genético (Cabañas et al., 2009)
P11	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
P12	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
P14	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
P15	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
P19	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
P42	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
P46	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
PL9	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
PL13	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
PL34	TTC (Phe)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	I
M2P2	TTC (Phe)	GTG (Val)	TTC (Phe)	VIII
P21	TTC (Phe)	GTG (Val)	TTC (Phe)	VIII
PL15	TTC (Phe)	GTG (Val)	TTC (Phe)	VIII
R5	TTC (Phe)	GTG (Val)	TTC (Phe)	VIII
R36	TTC (Phe)	GTG (Val)	TTC (Phe)	VIII
R43	TTC (Phe)	GTG (Val)	TTC (Phe)	VIII
PL48	TTC (Phe)	GCG (Ala)	CTC (Leu)	X
R40	TAC (Tyr)	GAG (Glu)	CTC (Leu)	NR

Tabla 1. Mutaciones de la región estudiada de la beta tubulina para las cepas analizadas. NR: tipo no reportado por Cabañas et al., 2009.

En la tabla 1 se pueden observar para cada cepa estudiada identificada como *P. expansum*, las secuencias y correspondientes aminoácidos en los casos en que se encontraron mutaciones. Además se caracterizaron las cepas de acuerdo al tipo genético según Cabañas et al. (2009). De acuerdo a dicha clasificación, se observaron 3 tipos de secuencias en las cepas resistentes correspondientes con los tipos genéticos I, VIII y X. El tipo genético I, que presentan 9 de las cepas resistentes a tiabendazol, no presenta mutación, y coincide con el genotipo de la cepa sensible (P11). Las mutaciones más frecuentes correspondieron al tipo VIII definido por Cabañas et al. (2009) que involucran un cambio en el codón 198 de ácido glutámico por valina y otro cambio en el codón 240 de leucina por fenilalanina, los cuales se dan en forma conjunta. Para una de las cepas, R40, no pudo asignarse la clasificación de Cabañas et al. (2009) ya que presentaba una mutación diferente a las definidas dicho trabajo, al presentar un cambio en el codón 167 de tirosina en lugar de fenilalanina.

En la figura 13 se observa el alineamiento de la secuencia de la proteína de los diferentes tipos definidos por Cabañas et al. (2009), la cepa R40 y la cepa M2P3 identificada como *P. solitum*. Se observan cambios en el codón 198, en el codón 240 y en el codón 285 que coinciden con los tipos definidos por Cabañas et al. (2009) X, VIII y III respectivamente. Además se observan cambios en los codones 279 y 335 no reportados por dichos autores, en los cuales se observa un cambio de serina por glutamina y asparagina por serina respectivamente.

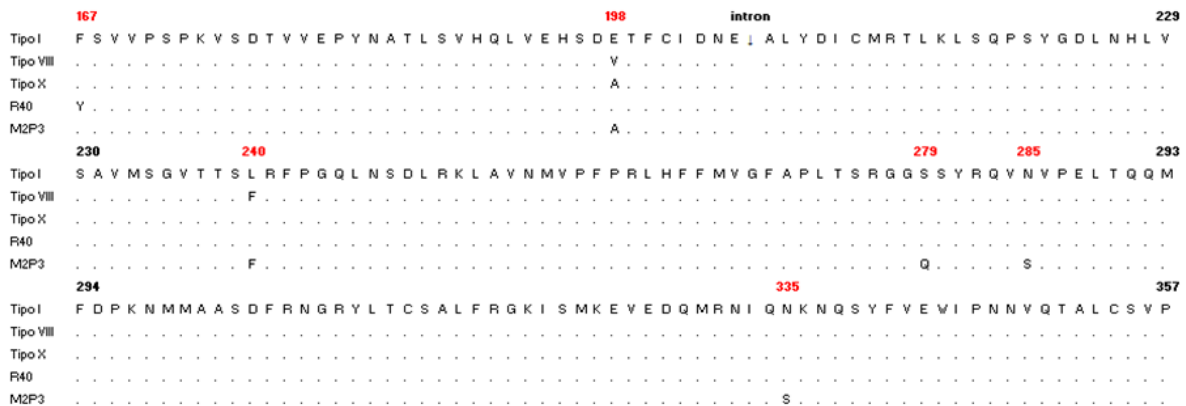


Figura 13. Secuencias de la proteína alineadas de los tipos de Cabañas et al, el aislamiento R40 y la cepa M2P3 identificada como *P. solitum*

5. Discusión

En el presente trabajo se identificaron y analizaron aislamientos terverticilados del género *Penicillium* aisladas de manzanas con síntomas de moho azul provenientes de una cámara fría de almacenamiento de varios productores de la zona de Melilla, Montevideo. Debido a que la identificación de los *Penicillium* terverticilados mediante métodos fenotípicos no es sencilla se suelen utilizar métodos moleculares que resultan más rápidos y objetivos. Por este motivo se desarrolló para la identificación a nivel de especie de las cepas un método molecular sencillo basado en el análisis con enzimas de restricción para diferenciar a *P. expansum*, *P. solitum* y *P. crustosum*, especies causantes de la enfermedad en manzana según Samson et al. (2004); Frisvad y Samson (2004) Scholtz y Korsten (2016). De esta forma todos los aislamientos, a excepción de uno, fueron identificados como *P. expansum*, especie reconocida como patógeno poscosecha de manzana de mayor impacto económico a nivel mundial (Jijakli & Lepoivre, 2004; Turechek, 2004). Es una especie micotoxigénica por su capacidad de producir patulina en varios sustratos incluido en manzana (Frizzell, Elliott, & Connolly, 2014). Esta micotoxina se encuentra regulada en jugos de manzana en nuestro país (MSP, MEF, MIEM, & MGAP, 2009) y es un indicador del uso de materia prima en mal estado en la producción de jugos.

Se identificó como *P. solitum* a la cepa restante aislada en este trabajo. Esta especie es conocida por ser menos agresiva y no producir micotoxinas. En Uruguay, Pianzzola et al. (2004) han reportado la presencia de esta especie como un patógeno de manzana de menor incidencia y baja agresividad.

Las cepas aisladas fueron caracterizadas de acuerdo a su agresividad en manzana a baja temperatura y a su sensibilidad a distintos fungicidas. El análisis de agresividad en manzanas en cámara fría de algunas cepas identificadas como *P. expansum* evidenció que las mismas causaban síntomas con distintos niveles de agresividad en esas condiciones. En cambio, *P. solitum* no produjo síntomas de pudrición en el mismo período. De forma similar, Louw y Korsten (2014), analizaron la agresividad de *P. expansum*, *P. crustosum* y *P. solitum* en manzanas provenientes de Sudáfrica y la Unión Europea describiendo a *P. expansum* como la especie más agresiva en cámara fría y a *P. solitum* como una de las especies no agresivas en dichas condiciones. *P. crustosum* mostró en dicho análisis una baja incidencia (10%), presentando en esos casos baja agresividad.

Se estudió la sensibilidad a dos fungicidas, tiabendazol y fludioxonil para todas las cepas. El tiabendazol es un fungicida registrado en nuestro país para el control poscosecha de moho azul, cuyo uso ha disminuido en los últimos años debido a la constatación por parte de los productores de resistencia en condiciones de uso. El fludioxonil es un fungicida recomendado en varios países, como EEUU (Gaskins et al., 2015) y Australia (APVMA, 2010), para el control de moho azul causado por *Penicillium* spp., haciéndose especial mención a *P. expansum* y *P. solitum* en Australia.

En el análisis de CIM para fludioxonil se observó una distribución bimodal, encontrándose dos cepas con sensibilidad disminuida, *P. expansum* P11 y *P. solitum* M2P3. En general, las cepas resistentes al fungicida pierden competitividad debido al aumento de la osmosensibilidad, siendo incapaces de soportar el stress osmótico (Kilani & Fillinger, 2016). La cepa P11 mostró niveles de agresividad en fruto similares a los de las otras cepas de *P. expansum* ensayadas, por lo cual se puede afirmar que el cambio que provocó una sensibilidad disminuida al fludioxonil no afectó su capacidad de crecimiento en manzana. No se pudo evaluar la cepa M2P3 en ese sentido, ya que se obtuvo un solo aislamiento de la especie y por lo tanto no se pueden establecer comparaciones. El fludioxonil no se utiliza en nuestro país en el control de patógenos poscosecha de manzana, por lo tanto, podríamos definir como sensibilidad basal para *P. expansum* la determinada para la mayoría de las cepas de este trabajo (CIM < 0.5 ppm). En base a ello se puede afirmar que existe una disminución de más de 32 veces en la sensibilidad de la cepa P11. Se han descrito cepas de *P. expansum* con sensibilidad disminuida al fludioxonil (Gaskins et al., 2015; Karaoglanidis et al., 2011), sin embargo no hemos encontrado citas que mencionen una menor sensibilidad en cepas de *P. solitum*, por lo cual este trabajo constituye el primer reporte al respecto. No se pudo determinar la sensibilidad basal a fludioxonil para cepas nativas de esa especie ya que solamente se obtuvo un aislamiento. Sería relevante realizar un estudio de sensibilidad tratando de aislar cepas nativas de esta especie.

La concentración efectiva 50 de fludioxonil de la mayoría de las cepas uruguayas estudiadas varió entre 0,01 y 0,1 mg/L. Para la cepa, P11 que mostró sensibilidad disminuida en el ensayo de CIM, la EC50 fue de 0,93 mg/L. Estos valores son mayores a los encontrados por Li y Xiao (2008), ya que en las 120 cepas que analizaron en su trabajo con manzanas provenientes de Washington, la CE50 varió entre 0,011 y 0,068 mg/L. También son mayores a los hallados por Karaoglanidis et al. (2011), que reportaron EC50 0,013 - 0,47 mg/L en los ensayos realizados con 236 cepas de *P. expansum*.

De todas formas, al analizar el comportamiento de las cepas que presentaron baja sensibilidad en los ensayos *in vitro* en presencia de fludioxonil en concentraciones de uso en manzana se comprobó que las mismas no eran resistentes a dicho tratamiento.

Para el tiabendazol la sensibilidad de *P. expansum* tampoco resultó homogénea, ya que el 34% de los aislamientos presentó una CIM mayor de 128ppm mientras que el 66% restante resultó altamente sensible con valores de CIM menores de 1 ppm, no detectándose resistencias intermedias. Este tipo de resistencia se conoce como resistencia cualitativa, y en general se debe a una mutación puntual que modifica el sitio blanco de acción del fungicida (Vero et al., 2009). La sensibilidad disminuida a tiabendazol de cepas nativas de *P. expansum* ya había sido observada por Pianzzola et al. (2004). El porcentaje de cepas resistentes observadas en el presente trabajo fue menor que la observada en el año 2004. Esto podría deberse a una menor presión de selección, ya que el uso de dicho fungicida a nivel de packing ha disminuido en los últimos años, producto de una disminución en su efectividad.

La resistencia natural a los benzimidazoles suele estar dada por mutaciones puntuales en el gen que codifica para la beta tubulina, causando cambios en la secuencia aminoacídica del sitio de unión del fungicida. Varios autores han descrito las mutaciones encontradas en esa región. En el trabajo de Cabañas et al. (2009) se basan en un análisis con cepas identificadas como *P. expansum* donde definen 9 genotipos diferentes de acuerdo a las mutaciones encontradas. Al traducir las secuencias aminoacídicas los tipos se reducen a 4 diferentes: el tipo III presenta la mutación N285S, el tipo VIII las mutaciones L240F y E198V, el tipo IX presenta la mutación E198V y el tipo X la mutación E198A. En el presente trabajo se encontraron los tipos VIII y X definidos por Cabañas et al. (2009), además de un tipo no reportado por dichos autores que mostró la cepa R40. Yin y Xiao (2013) luego de analizar cepas de *P. expansum* resistentes a tiabendazol aisladas de manzanas, reportan dos tipos de mutaciones diferentes, E198V y F167Y. Esa última mutación es la que se encontró en la cepa resistente al TBZ R40 en el presente trabajo. Cabañas et al. (2009) definieron además como tipo I al correspondiente con la secuencia de la cepa NRRL976 (sensible al fungicida), el cual en nuestro relevamiento se observó en todas las cepas sensibles al TBZ y en la mayoría de las cepas resistentes. Estos resultados se corresponden con los descritos por Cabañas et al. (2009) y Sholberg et al. (2005). El hallazgo de cepas con resistencia pero que no presentan mutaciones en la región analizada del gen que codifica para la beta tubulina refuerza la conclusión que en esos casos la resistencia al fungicida está dada por mutaciones en otras regiones de ese gen e incluso en otras regiones génicas.

6. Conclusiones y perspectivas

El método molecular desarrollado mostró ser efectivo y rápido en la discriminación de *P. expansum*, *P. solitum*, *P. crustosum*, especies causantes del moho azul en manzana.

Con este método se identificaron las cepas aisladas encontrándose que el moho azul en manzanas almacenadas poscosecha en cámara fría en la zona estudiada es causado mayoritariamente por *P. expansum*. Se identificó también una única cepa como perteneciente a *P. solitum*, especie ya reportada en Uruguay como causante de la enfermedad.

La efectividad del fungicida fludioxonil se verificó para casi todos los aislamientos. Sin embargo el hallazgo de cepas de sensibilidad disminuida determina la importancia de realizar relevamientos de niveles de sensibilidad en caso de que se registre el fungicida en nuestro país para su uso contra moho azul en manzana. El conocimiento de los niveles basales de sensibilidad de las cepas locales, determinado en este trabajo, sería de suma importancia en dichos relevamientos.

La efectividad del fungicida tiabendazol en el control de esta enfermedad ha disminuido ya que se encontraron niveles variados de sensibilidad. La resistencia a dicho fungicida no sólo se explica por mutaciones en la zona estudiada del gen de la beta tubulina, por lo que debería ampliarse el análisis a la totalidad de este gen u otras regiones génicas para conocer las bases moleculares de la resistencia en la zona estudiada de nuestro país.

7. Bibliografía

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- APVMA. (2010). Trade advice notice on Fludioxonil in the product Scholar Fungicide.
- Avenot, H. F., & Michailides, T. J. (2015). Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. *Crop Protection*, 78(December), 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.09.012>
- Bandh, S. A., Kamili, A. N., & Ganai, B. A. (2012). Identification of some *Aspergillus* species isolated from Dal Lake, Kashmir by traditional approach of morphological observation and culture. *African Journal of Microbiology Research*, 6(29), 5824–5827. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.039>
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). Fungicide Resistance in Plant Management: How can it be managed? Retrieved from www.frac.info
- Cabañas, R., Abarca, M. L., Bragulat, M. R., & Cabañas, F. J. (2009). In vitro activity of imazalil against *Penicillium expansum*: Comparison of the CLSI M38-A broth microdilution method with traditional techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.025>
- Cabañas, R., Castellá, G., Abarca, M. L., Bragulat, M. R., & Cabañas, F. J. (2009). Thiabendazole resistance and mutations in the β -tubulin gene of *Penicillium expansum* strains isolated from apples and pears with blue mold decay. *FEMS Microbiology Letters*, 297(2), 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01670.x>
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D67–D72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>
- Colodner, A. (2011). Optimización de las técnicas de aplicación de productos fitosanitarios en la línea de empaque de manzanas (*Malus domestica*, Borkh). Università degli Studi di Bologna, Italia.
- de Jong, S. N., Lévesque, C. A., Verkley, G. J. M., Abeln, E. C. a., Rahe, J. E., & Braun, P. G. (2001). Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. *Mycological Research*, 105(6), 658–669. <https://doi.org/10.1017/S0953756201003926>
- Deising, H. B., Reimann, S., & Pascholati, S. F. (2008). Mechanisms and significance of

-
- fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 286–295.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200017>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- DIEA. (2016). Encuesta frutícola de hoja caduca. Retrieved from <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/estadisticas/produccion-vegetal/fruticultura/encuesta-fruticola-de-hoja-caduca-zafra-2016>
- Esterio, M., Auger, J., Ramos, C., & García, H. (2007). First Report of Fenhexamid Resistant Isolates of *Botrytis cinerea* on Grapevine in Chile. *Plant Disease*, 91(6), 768.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0768C>
- FAO. (2012). Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención. In *Save Food* (p. 421). <https://doi.org/10.3738/1982.2278.562>
- Fishel, F. M. (2009). Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC) Classification Scheme of Fungicides According to Mode of Action. University of Florida, IFAS Extension.
- FRAC: Fungicide Resistance Action Committee. (2013). Pathogen risk list. Retrieved from <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf>
- Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 2004(49), 1–173.
- Frizzell, C., Elliott, C. T., & Connolly, L. (2014). Effects of the mycotoxin patulin at the level of nuclear receptor transcriptional activity and steroidogenesis in vitro. *Toxicology Letters*, 229(2), 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.847>
- Gaskins, V. L., Vico, I., Yu, J., & Jurick II, W. M. (2015). First Report of *Penicillium expansum* Isolates With Reduced Sensitivity to Fludioxonil From a Commercial Packinghouse in Pennsylvania. *Plant Disease*, 99(8), 10–11.
- Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M. E., Romero, G., Silvera, E., González, P., ... Oscar, B. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 16(Mic), 97–107.
- Giacinti, M. A. (2003). Pensamiento estratégico en el negocio mundial de manzanas. *Agroalimentaria*, 540(Cp 8309).
- Heiman, M. (1997). Webcutter 2.0. Retrieved from <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>
- Jijakli, M. H., & Lepoivre, P. (2004). State of the Art and Challenges of Post-harvest Disease Management in Apples. In *Fruit and Vegetable Diseases* (pp. 59–94). Dordrecht: Kluwer

-
- Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/0-306-48575-3_3
- Karaoglanidis, G. S., Markoglou, A. N., Bardas, G. A., Doukas, E. G., Konstantinou, S., & Kalampokis, J. F. (2011). Sensitivity of *Penicillium expansum* field isolates to tebuconazole, iprodione, fludioxonil and cyprodinil and characterization of fitness parameters and patulin production. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.017>
- Kilani, J., & Fillinger, S. (2016). Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 7(December), 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02014>
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., ... Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58(9), 876–888. <https://doi.org/10.1002/ps.566>
- Li, H. X., & Xiao, C. L. (2008). Baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple in Washington State. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.022>
- Ma, Z., & Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24(10), 853–863. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>
- Malandrakis, A. A., Markoglou, A. N., Konstantinou, S., Doukas, E. G., Kalampokis, J. F., & Karaoglanidis, G. S. (2013). Molecular characterization, fitness and mycotoxin production of benzimidazole-resistant isolates of *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 162(3), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.014>
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). (2017). Consulta de productos fitosanitarios. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/profit/consultacultivoplaga.aspx>
- Mondino, P. (2003). Reducción del uso de plaguicidas: un elemento clave en la producción integrada. 175-182. En: *Producción Integrada en Uruguay. Claves de un sistema amigable con el medio ambiente que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad*. ISBN - 9974-7794-0-5. Montevideo 258p.
- MSP, MEF, MIEM, & MGAP. (2009). Reglamento Bromatológico Nacional.
- Northwestern University. (n.d.). Fragment Size Calculator. Retrieved from <http://biotools.nubic.northwestern.edu/SizeCalc.html>
- Pianzola, M. J., Moscatelli, M., & Vero, S. (2004). Isolates Associated with Blue Mold on Apple in Uruguay. *Plant Disease*, 88(1), 23–28. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.1.23>
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edition. Gaithersburg, Maryland
- Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijper, A. F. A., Houbraken, J. A. M. P., & Firsvad, J. C. (2004).

-
- Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology*, 49, 175–200.
- Scholtz, I., & Korsten, L. (2016). Profile of *Penicillium* species in the pear supply chain. *Plant Pathology*, 65(7), 1126–1132. <https://doi.org/10.1111/ppa.12494>
- Sholberg, P. L., Harlton, C., Haag, P., Lévesque, C. A., O’Gorman, D., & Seifert, K. (2005). Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. that cause postharvest blue mold of apples using β -tubulin gene sequences. *Postharvest Biology and Technology*, 36(1), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.07.011>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Turechek, W. W. (2004). Apple Diseases and their Management. *Diseases of Fruits and Vegetables*, I, 1–108. https://doi.org/10.1007/1-4020-2607-2_5
- Vero, S., Garmendia, G., Alborés, S., & Masi, S. Di. (2009). Resistencia a fungicidas en la producción de manzana. In *Bases conceptuais da proteção do cultivo de macieira* (pp. 81–106).
- Vico I., Duduk N., Vasić M., Nikolić M. (2014). Identification of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold decay of apple fruit. *Pestic. Phytomed. (Belgrade)*, 29(4): 257–266.
- Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688–3691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>
- Wozniak A. (2003). Caracterización de los patógenos poscosecha de citrus y perspectivas para el control biológico de los mismos. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias Universidad de la República Montevideo. Uruguay.
- Yin Y. N., Xiao C. L. (2013). Molecular characterization and a multiplex allele-specific PCR method for detection of thiabendazole resistance in *Penicillium expansum* from apple. *Eur J Plant Pathol* 136:703–713.

Anexo I

En la siguiente tabla se resumen los resultados de identificación y caracterización de todas las cepas utilizadas en el presente trabajo. Se detalla: nombre de la cepa, especie de acuerdo a la identificación realizada, resultado del ensayo de CIM para tiabendazol (R: resistente, crecimiento 128ppm; S: sensible no muestra crecimiento en 1ppm), resultado del ensayo de CIM para fludioxonil (R: resistente, crecimiento en 16ppm; S: sensible no muestra crecimiento en 0,5 ppm), concentración efectiva 50 (mg/L), clasificación de acuerdo al ensayo de agresividad (se indica entre paréntesis el diámetro de crecimiento promedio en cm), s/a: sin analizar.

Cepa	Identificación	Sensibilidad TBZ	Sensibilidad FL	CE50 FL	Agresividad
M2P3	<i>P. solitum</i>	R	R	-	s/a
M2P2	<i>P. expansum</i>	R	S	0,09	B (30)
P12	<i>P. expansum</i>	R	S	0,08	s/a
P14	<i>P. expansum</i>	R	S	0,09	B (25)
P15	<i>P. expansum</i>	R	S	0,08	B (34)
P19	<i>P. expansum</i>	R	S	0,08	s/a
P21	<i>P. expansum</i>	R	S	0,08	s/a
P42	<i>P. expansum</i>	R	S	0,09	s/a
P46	<i>P. expansum</i>	R	S	0,10	s/a
PL13	<i>P. expansum</i>	R	S	0,09	AB (23)
PL15	<i>P. expansum</i>	R	S	0,04	AB (24)
PL34	<i>P. expansum</i>	R	S	0,05	AB (18)
PL48	<i>P. expansum</i>	R	S	0,07	AB (21)
PL9	<i>P. expansum</i>	R	S	0,06	B (29)
R36	<i>P. expansum</i>	R	S	0,05	s/a
R40	<i>P. expansum</i>	R	S	0,03	s/a
R43	<i>P. expansum</i>	R	S	0,06	s/a
R5	<i>P. expansum</i>	R	S	0,08	B (29)
1PL38	<i>P. expansum</i>	S	S	0,05	B (26)
M2P17	<i>P. expansum</i>	S	S	0,01	s/a
M2P23	<i>P. expansum</i>	S	S	0,07	s/a
M2P24	<i>P. expansum</i>	S	S	0,07	s/a

M2P27	<i>P. expansum</i>	S	S	0,03	s/a
M2P4	<i>P. expansum</i>	S	S	0,06	s/a
M2P6	<i>P. expansum</i>	S	S	0,04	s/a
M2P7	<i>P. expansum</i>	S	S	0,08	s/a
P11	<i>P. expansum</i>	S	R	0,93	B (31)
P2	<i>P. expansum</i>	S	S	0,10	s/a
P22	<i>P. expansum</i>	S	S	0,10	B (30)
P24	<i>P. expansum</i>	S	S	0,06	s/a
P27	<i>P. expansum</i>	S	S	0,10	s/a
P30	<i>P. expansum</i>	S	S	0,09	s/a
P33	<i>P. expansum</i>	S	S	0,09	AB (23)
P34	<i>P. expansum</i>	S	S	0,04	B (28)
P35	<i>P. expansum</i>	S	S	0,06	A (6)
P43	<i>P. expansum</i>	S	S	0,05	s/a
P44	<i>P. expansum</i>	S	S	0,08	s/a
P47	<i>P. expansum</i>	S	S	0,10	s/a
P48	<i>P. expansum</i>	S	S	0,04	s/a
P49	<i>P. expansum</i>	S	S	0,10	s/a
P51	<i>P. expansum</i>	S	S	0,10	B (29)
P7	<i>P. expansum</i>	S	S	0,09	s/a
P8	<i>P. expansum</i>	S	S	0,10	s/a
P9	<i>P. expansum</i>	S	S	0,04	s/a
PL12	<i>P. expansum</i>	S	S	0,04	s/a
PL16	<i>P. expansum</i>	S	S	0,04	AB (21)
PL18	<i>P. expansum</i>	S	S	0,01	AB (18)
PL22	<i>P. expansum</i>	S	S	0,05	s/a
PL35	<i>P. expansum</i>	S	S	0,06	B (28)
PL7	<i>P. expansum</i>	S	S	0,01	s/a
R10	<i>P. expansum</i>	S	S	0,09	B (28)
R18	<i>P. expansum</i>	S	S	0,03	s/a
R19	<i>P. expansum</i>	S	S	0,03	s/a

Anexo II

Análisis estadísticos de los resultados del ensayo de sensibilidad en fruto para fludioxonil. Se muestra el análisis realizado utilizando modelos lineales generalizados asumiendo distribución de Poisson, con transformación log, según el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

Regresión Poisson

Distribución: Poisson
Función de enlace: Log

Variable dependiente: Conteo Heridas
Número de observaciones: 90
Observaciones faltantes: 2
Iteraciones: 8 (max=20)
Tolerancia: 1E-9 (0,000000000)

Parámetros	Est.	E.E.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald Chi ²	p-valor
Constante	-1,40	0,31	-2,00	-0,80	21,01	<0,0001
Aislamiento_P11	0,16	0,16	-0,16	0,49	0,97	0,3245
Aislamiento_PL9	0,07	0,17	-0,26	0,40	0,18	0,6738
Tratamiento s/Fludioxonil	2,86	0,30	2,28	3,44	92,66	<0,0001

	Valor	gl
Log Likelihood	84,59	86
Deviance	58,87	86
Escala (fijada)	1,00	

Pruebas de hipótesis secuenciales

F.V.	gl	-2[L0-L1]	p-valor
Aislamiento	2	0,98	0,6117
Tratamiento	1	213,12	<0,0001

