

Botrytis cinerea causing gray mold in blackberry fruit in Mexico

Botrytis cinerea causante del moho gris en frutos de zarzamora en México

José Terrones-Salgado, Daniel Nieto-Angel*, Cristian Nava-Díaz, Daniel Téliz-Ortiz, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; Rómulo García-Velasco, Centro Universitario UAEM Tenancingo. Km 1.5 Carretera Tenancingo-Villa Guerrero. Estado de México, CP 52400, México; Moisés Roberto Vallejo-Pérez, CONACyT-Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Álvaro Obregón No. 64, Colonia Centro, San Luis Potosí, San Luis Potosí, CP 78000, México; Prometeo Sánchez-García, Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230 México. *Autor para correspondencia: dnieto@colpos.mx.

Recibido: 01 de Junio, 2019.

Aceptado: 23 de Julio, 2019.

Terrones-Salgado J, Nieto-Angel D, Nava-Díaz C, Téliz-Ortiz D, García-Velasco R, Vallejo-Pérez MR and Sánchez-García P. 2019. *Botrytis cinerea* causing gray mold in blackberry fruit in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 365-382.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1906-1

Primera publicación DOI: 02 de Agosto, 2019.

First DOI publication: August 02, 2019.

Resumen. La zarzamora (*Rubus* sp.) es una frutilla atacada por el género *Botrytis*. En México se desconoce que especies están involucradas con el síntoma de moho gris. El objetivo de este estudio fue identificar las especies de *Botrytis* asociadas a zarzamora. En noviembre-diciembre de 2016, se realizaron muestreos en 17 áreas productoras de zarzamora en México. Se colectaron frutillas con síntomas de moho gris, de las cuales se aislaron y purificaron los aislamientos. Con la técnica de cultivo monospórico, se obtuvieron 211 aislamientos,

Abstract. Blackberry (*Rubus* sp.) is a fruit attacked by the fungus genera *Botrytis*. In Mexico, it is unknown which species are associated with the gray mold symptoms. This research aimed to identify the *Botrytis* species associated with blackberry. In November-December of 2016, sampling was carried out in 17 blackberry production regions in Mexico. Fruits with gray mold symptoms were collected, from which fungi were isolated and purified. Two hundred and eleven isolates were obtained using the monosporic method. Isolates clustered in 21 groups based on a multivariate analysis using morphometric, pathogenic and cultural data. For each group, one isolate was selected for molecular characterization. DNA was extracted using AP method, subsequently; polymerase chain reactions of internal transcribed spacer (ITS) were performed using the ITS1 and ITS4 primers. The PCR products were sequenced in both directions with the Sanger method. Based on morphometric, pathogenic and cultural data, and the analysis of ITS sequences, we conclude that the isolates corresponding to *Botrytis cinerea*.

los cuales formaron 21 grupos basado en un agrupamiento por similitud de las características morfológicas, patogénicas y culturales. De cada grupo se eligió un aislamiento y se identificó molecularmente. El ADN se extrajo con el método de Phosphatasa Alcalina (AP), posteriormente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región del espacio transcrito interno. (ITS) utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4. El producto de amplificación se secuenció en ambas direcciones con el método de Sanger. Se identificaron diferencias morfológicas, culturales y patogénicas entre los 21 grupos. Basado en la caracterización morfológica, cultural y patogénica, así como el análisis de secuencias de la región ITS se encontró que los aislamientos corresponden a *Botrytis cinerea*.

Palabras clave: PCR, análisis de secuencias, patogenicidad, caracterización.

La zarzamora (*Rubus* sp.) se cultiva en todo el mundo. En México para el año 2017 se reportaron 12, 433 ha sembradas con *Rubus* sp. con una producción de 266,764 t. Los principales estados productores en orden de importancia son Michoacán, Jalisco, Colima, Baja California y Estado de México (SAGARPA, 2018). Este cultivo es atacado por fitopatógenos y uno de los principales es el género *Botrytis*, agente causal de la enfermedad conocida como moho gris. Este género incluye cerca de 30 especies descritas (Elad *et al.*, 2014; Ponce de León *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009) y afecta hojas, tallos, flores y frutos en una amplia gama de cultivos, incluyendo frutas y frutillas como zarzamora, arándano, grosella, frambuesas, fresa y uvas (Droby *et al.*, 2009). La infección por el hongo ocurre en campo y permanece quiescente, durante la postcosecha la infección se activa y se desarrolla la enfermedad durante el almacenamiento, transporte o

Key words: PCR, sequences analysis, pathogenicity, characterization.

Blackberries (*Rubus* sp.) are planted throughout the globe. In Mexico, for the year 2017, there were reports of 12, 433 ha planted with *Rubus* sp. With a production of 266,764 t. The main producer states, in order of importance are Michoacán, Jalisco, Colima, Baja California and the State of Mexico (SAGARPA, 2018). This crop is attacked by phytopathogens, one of the main ones is the genus *Botrytis*, causal agent of the disease known as gray mold. This genus includes nearly 30 described species (Elad *et al.*, 2014; Ponce de León *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009) and it affects leaves, stem, flowers and fruits in a wide range of crops, including fruits and berries such as blackberries, cranberries, redcurrants, strawberries and grapes (Droby *et al.*, 2009). The infection from the fungus takes place in the field and remains quiescent; during postharvest, the infection becomes activated and it develops the disease during storage, transportation, or even in the market (Calvo *et al.*, 2014; Feliziani and Romanazzi, 2013), causing critical losses (Crisosto *et al.*, 2002; Ippolito and Nigro 2000; Teles *et al.*, 2014).

Infection by the fungus *Botrytis* spp. In blackberry plants manifest themselves as soft rotting in flowers, because they are the most susceptible; on the fruit, light maroon areas appear, which quickly increase in size until the fruit becomes dried and mummified, due mainly to the fruit having a limited shelf life (Droby *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012a). Three species of *Botrytis* have been identified in blackberry fruits: *B. patula* Sacc and Berl., (Sacc. and Berl.) (Holubová, 1974), *B. cinerea* Pers.: Fr., (Farr and Rossman, 2011) and *B. caroliniana* (X. P. Li and Schnabel) (Li *et al.*, 2012a).

incluso en el mercado (Calvo *et al.*, 2014; Feliziani y Romanazzi, 2013), ocasionando graves pérdidas (Crisosto *et al.*, 2002; Ippolito y Nigro 2000; Teles *et al.*, 2014).

La infección del hongo *Botrytis* spp. en plantas de zarzamora se manifiesta como pudrición suave en flores por ser las más susceptibles; en la fruta se observan zonas blandas de color marrón claro que aumentan rápidamente en tamaño hasta secar y momificar el fruto, esto se debe principalmente a que la fruta presenta una vida de anaquel reducida (Droby *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012a). Se han identificado tres especies de *Botrytis* en frutos de zarzamora: *B. patula* Sacc y Berl., (Sacc. y Berl.) (Holu-bová, 1974), *B. cinerea* Pers.: Fr., (Farr y Rossman, 2011) y *B. caroliniana* (X. P. Li y Schnabel) (Li *et al.*, 2012a).

Las especies de *Botrytis* se identifican con base en sus características morfológicas, morfométricas y culturales (Ellis, 1971; Jarvis, 1977), rango de hospedantes y condiciones de crecimiento, donde la morfología del micelio, tamaño y forma de conidios así como número, organización y tamaño de los esclerocios y especificidad de hospedantes son muy importantes para diferenciar especies (Li *et al.*, 2012a; Lorenzini y Zapparoli, 2014; Martínez *et al.*, 2003). El uso de herramientas moleculares se hace imprescindible para complementar la identificación morfológica, por lo que son utilizadas para identificar las especies de *Botrytis* (Lorenzini y Zapparoli, 2014; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b). El análisis de secuencias en la región del espacio transcrito interno (ITS) es un método eficiente y común para la identificación de hongos (Elmagid *et al.*, 2013) el cual confirma y refuerza la identificación morfológica y se ha utilizado con éxito para identificar a *Botrytis cinerea* (Aktaruzzaman *et al.*, 2014; Cheon y Jeon, 2013; Nieto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014).

The *Botrytis* species were identified based on its morphological, morphometric and cultural characteristics (Ellis, 1971; Jarvis, 1977), range of hosts and growth conditions, where the morphology of the mycelium, size and shape of the conidia, as well as the number, organization and size of the sclerotia and specificity of hosts are very important when differentiating species (Li *et al.*, 2012a; Lorenzini and Zapparoli, 2014; Martínez *et al.*, 2003). The use of molecular tools becomes crucial to complement morphological identification, and are therefore used to identify species of *Botrytis* (Lorenzini and Zapparoli, 2014; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b). The analysis of sequences in the region of the internal transcribed spacer (ITS) is an efficient and common method to identify fungi (Elmagid *et al.*, 2013); it confirms and reinforces the morphological identification and has been successfully used to identify *Botrytis cinerea* (Aktaruzzaman *et al.*, 2014; Cheon and Jeon, 2013; Nieto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014).

In this context, the aim of this research was to carry out morphological, pathogenic, cultural and molecular identification of *Botrytis* spp. isolations in blackberry crops.

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples and isolations of *Botrytis* sp. In the months of November and December of 2016, and based on a randomized collection of samples (Steel *et al.*, 1997), blackberry fruits with symptoms of gray mold were gathered from commercial plantations in 17 municipalities distributed throughout five states in Mexico (Table 1). Each fruit was placed in an individual polyethylene bag, which were then sealed and transported in a cold ice cooler to the lab, where

En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue realizar la identificación morfológica, patogénica, cultural y molecular de aislamientos de *Botrytis* spp. en el cultivo de zarzamora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras y aislamiento de *Botrytis* sp.

En los meses de noviembre y diciembre de 2016 y con base en un muestreo al azar (Steel *et al.*, 1997) se colectaron frutos de zarzamora con síntomas de moho gris en plantaciones comerciales de 17 municipios distribuidos en cinco estados de México (Cuadro 1). Cada fruto se colocó en una bolsa de polietileno individual, se sellaron y se transportaron en frío en una hielera al laboratorio donde se almacenaron a 4 °C (Li *et al.*, 2012a). Posteriormente, las frutillas se colocaron en bolsas de polietileno que contenían toallas de papel estériles humedecidas a temperatura de 20 ± 1 °C y una humedad relativa cercana al 100% (técnica de cámara húmeda) para estimular su esporulación, una vez esporulados los conidios se rasparon, sin tocar la fruta utilizando una aguja de disección estéril, se suspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se ajustaron a una concentración de conidios de 1 × 10⁶ esporas mL⁻¹ (Li *et al.*, 2012a). Posteriormente 200 µL de las suspensiones fueron sembradas en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) (Bioxon, PDA, 39 g L⁻¹ de agua) modificado con ácido láctico (0.1 % v / v) en cajas Petri, que fueron selladas con Parafilm (Sigma-Aldrich) e incubadas a 20 ± 1 °C, en oscuridad, durante 36 h. Los conidios germinados se purificaron mediante el método de conidio monospórico en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Li *et al.*, 2012a)

Pruebas de patogenicidad. Los 211 cultivos monospóricos de *Botrytis* sp. se inocularon en frutos

they were stored at 4 °C (Li *et al.*, 2012a). Later, the berries were placed in polyethylene bags containing moist sterilized paper towels at a temperature of 20 °C ± 1 and a relative humidity of nearly 100% (humid chamber technique) to stimulate its sporulation. Once sporulated, the conidia were scraped without touching the fruit and using a sterilized dissecting needle, they were suspended in 1 mL of sterilized distilled water and adjusted to a conidial concentration of 1 × 10⁶ spores mL⁻¹ (Li *et al.*, 2012a). Next, 200 µL of the suspensions were planted in a PDA (Potato Dextrose Agar) culture medium (Bioxon, PDA, 39 g L⁻¹ water) modified with lactic acid (0.1% v / v) in Petri dishes, which were sealed with Parafilm (Sigma-Aldrich) and incubated at 20 ± 1 °C in the dark for 36 h. The germinated conidia were purified using the monosporic conidia method in Petri dishes with a PDA culture medium (Li *et al.*, 2012a).

Pathogenicity tests. The 211 *Botrytis* sp. monosporic cultures were inoculated in Tupi variety blackberry fruits in a stage of physiological maturity, which were washed with tap water and disinfested in sodium hypochlorite at 2% for 3 min, then rinsed twice with sterilized distilled water and the excess moisture was eliminated. The inoculation procedure consisted in creating a lesion (using a sterilized dissection needle at a depth of 3 mm) and without a needle placing a 20 µL aliquot of a conidial suspension at a concentration of 1 × 10⁵ spores mL⁻¹ on the fruits; for each isolation, two control fruits were used, on which 20 µL of sterilized distilled water were placed (Saito *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2014). The inoculated fruits and the controls were placed in 15 × 15 cm plastic containers containing dampened sterilized paper towels, sealed to increase relative humidity and incubated at 20 ± 1 °C in the dark under a totally randomized experimental design, inoculating

Cuadro 1. *Botrytis cinerea* aislado e identificado a partir de frutillas de zarzamora en 17 plantaciones localizadas en cinco estados de México.
Table 1. *Botrytis cinerea*, isolated and identified from blackberry fruits in 17 plantations located in five states in Mexico.

Estado	Origen (municipio, año)	Altitud (m)	Coordenadas geográficas		Clima	Número de Aislamientos	Especie de Botrytis	Clave	Número de acceso del GenBank ITS1 e ITS4
			X	Y					
Colima	Comala, 2016	600	19.3216	103.753	(A)C(w1)	12	<i>B. cinerea</i>	BP3	MG838558
	Cuahtémoc, 2016	940	19.3335	103.5893	Aw1	12	<i>B. cinerea</i>	BP5	MG838559
	Minatitlán, 2016	872	19.3867	104.0571	Aw2	10	<i>B. cinerea</i>	HAR3	MG838552
Jalisco	Mazamitla, 2016	2500	19.9234	103.0078	C(w1)	10	<i>B. cinerea</i>	2.5	MG838554
	Tuxpan, 2016	1487	19.5585	103.3936	(A)C(wo)	10	<i>B. cinerea</i>	3.1	MG838555
	Zapopan, 2016	1567	20.6724	103.416	C(w1)	6	<i>B. cinerea</i>	4.1	MG838561
México	Zapopan, 2016	1567	20.6732	103.4132	(A)C(wo)	6	<i>B. cinerea</i>	4.4	MG838564
	Texcoco, 2016	2257	19.4548	98.9096	BS1kw	10	<i>B. cinerea</i>	1.6	MG838557
	Tenancingo, 2016	2020	18.9636	99.603	C(w2)	8	<i>B. cinerea</i>	T1	MG838565
	Tenancingo, 2016	2020	18.9654	99.5711	C(w2)	7	<i>B. cinerea</i>	T6	MG838560
	Los Reyes, 2016	1536	19.5898	102.4548	(A)C(w1)	10	<i>B. cinerea</i>	5.6	MG838567
Michoacán	Los Reyes, 2016	1536	19.5916	102.4604	(A)C(w1)	10	<i>B. cinerea</i>	1.5	MG838570
	Peribán, 2016	1640	19.5196	102.4237	(A)C(w1)	15	<i>B. cinerea</i>	MF21	MG838571
	Zamora, 2016	1580	19.9887	102.3039	(A)C(w1)	10	<i>B. cinerea</i>	4.8	MG838562
	Ziracuaretiro, 2016	1380	19.4157	101.9035	(A)C(wo)	20	<i>B. cinerea</i>	ZF10	MG838556
	Zitácuaro, 2016	1942	19.4332	100.3588	(A)C(wo)	15	<i>B. cinerea</i>	MF12	MG838572
Morelos	Hueyapan, 2016	2340	18.8874	98.6954	C(w2)	10	<i>B. cinerea</i>	HC19	MG838563
	Ocuituco, 2016	1933	18.8776	98.77393	(A)C(w2)	10	<i>B. cinerea</i>	OS5	MG838568
	Tetela del volcán, 2016	2066	18.8935	98.7197	C(w2)	10	<i>B. cinerea</i>	OS10	MG838569
Tlaxcala	Tlaxiaco, 2016	1750	19.3883	104.0442	Aw2	5	<i>B. cinerea</i>	HAR4	MG838553
	Tlaxiaco, 2016	1750	18.8135	98.7507	(A)C(w1)	5	<i>B. cinerea</i>	HC25	MG838566

de zarzamora variedad Tupi en estado de madurez fisiológica, los cuales se lavaron con agua corriente y se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 2% por 3 min, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y el exceso de humedad fue eliminado. El procedimiento de inoculación consistió en la realización de una herida (con aguja de disección estéril a 3 mm de profundidad) y sin herida, al colocar un alícuota de 20 µL de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^5 esporas mL⁻¹ sobre las frutas, por cada aislamiento se utilizaron dos frutos testigos donde se colocó 20 µL de agua destilada estéril (Saito *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2014). Los frutos inoculados y los testigos se colocaron en recipientes de plástico de 15 × 15 cm que contenían toallas de papel estériles humedecidas con agua destilada estéril sellados para aumentar la humedad relativa y se incubaron a 20 ± 1 °C en oscuridad bajo un diseño experimental completamente al azar inoculando un fruto por aislamiento con cuatro repeticiones con sus respectivos testigos, donde cada aislamiento monospórico fue considerado como un tratamiento. Se midió el diámetro de la lesión cada 24 h finalizando a las 72 h después de la inoculación (hdi). Posteriormente, se realizaron reaislamientos en medio de cultivo PDA para verificar la patogenicidad de los aislamientos inoculados y completar los postulados de Koch, el experimento se realizó dos veces. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias (Diferencia Mínima Significativa) utilizando el programa SAS V.9.1 para Windows.

Caracterización morfométrica, morfológica y cultural. Las variables determinadas a los aislamientos fueron tasa de crecimiento calculada con el crecimiento a las 48 h menos el crecimiento de las 24 h (Zhou *et al.*, 2014), forma de crecimiento y coloración de micelio, días a esporulación, días a formación de esclerocios, número de esclerocios,

one fruit per isolation with four repetitions with their respective controls, where each monosporic isolation was considered as a treatment. The diameter of the lesion was measured every 24 h, ending at 72 h after inoculation (hai). Afterwards, reisolations were carried out in PDA culture to verify the pathogenicity of the inoculated isolations and complete Koch's postulates; the experiment was carried out twice. An analysis of variance was carried out, as well as a comparison of averages (Least Significant Difference) using the program SAS V.9.1 for Windows.

Morphometric, morphological and cultural characterization. The variables determined to the isolations were growth rate – calculated with growth at 48 h minus the growth of 24 h (Zhou *et al.*, 2014), growth shape and color of mycelium, days to sporulation, days to formation of sclerotia, number of sclerotia, shape and color of sclerotia (Martínez *et al.*, 2003, Tanovic *et al.*, 2009, Tanovic *et al.*, 2014). The sclerotia, conidia and conidiophores were measured (n=50) (Li *et al.*, 2012) using an OLYMPUS BX 41 compound microscope with an OLIMPUS U-CMAD3 T2, U-TV1X-2 T2 camera (Tokyo, Japan) and the morphometry was carried out using the program ImageJ (Schindelin *et al.*, 2015). The information obtained from the pathogenic, morphological and morphometric characterization was used to carry out a cluster by similarity or by morphotype for the identification of groups and selection of the representative isolations to carry out the molecular characterization.

Molecular identification. DNA extraction was carried out using the Alkaline phosphatase (AP) method (Ruiz *et al.*, 2014, Sambrook and Russel, 2001). The regions of the internal transcribed spacer (ITS) were amplified using primers ITS1

forma y color de esclerocios (Martínez *et al.*, 2003, Tanovic *et al.*, 2009, Tanovic *et al.*, 2014). Los esclerocios, conidios y conidióforos fueron medidos (n=50) (Li *et al.*, 2012) en un microscopio compuesto OLYMPUS BX 41 con cámara OLIMPUS U-CMAD3 T2, U-TV1X-2 T2 (Tokio, Japón) y la morfometría se realizó con el programa ImageJ (Schindelin *et al.*, 2015). La información obtenida de la caracterización patogénica, morfológica y cultural se utilizó para realizar un agrupamiento por similitud o morfotipos para la identificación de grupos y selección de los aislamientos representativos para realizar la caracterización molecular.

Identificación molecular. Se realizó la extracción de ADN mediante el método Phosphatasa Alcalina (AP) (Ruiz *et al.*, 2014, Sambrook y Russel, 2001). Se amplificaron las regiones del espacio transcrito interno (Internal Transcribed Spacer) utilizando los iniciadores ITS1 / ITS4 (Gardes y Bruns 1993; Staats *et al.*, 2005; White *et al.*, 1990) combinado con el programa de termociclado propuestos por White *et al.* (1990). Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones con el método de Sanger en la empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com>, Corea). Las secuencias resultantes se analizaron por DNASTAR (2001) y Sequencher (2014), y la alineación se realizó con Clustal W en MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias se compararon usando el algoritmo BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se depositaron en el GenBank.

RESULTADOS

En frutos de zarzamora se observaron síntomas de pudrición blanda de color marrón a negra, sobre las cuales creció abundante micelio, conidióforos y conidios que en conjunto forman el moho gris

/ ITS4 (Gardes and Bruns 1993; Staats *et al.*, 2005; White *et al.*, 1990) in combination with the thermocycling program proposed by White *et al.* (1990). TE amplified products were sequenced in both directions using the Sanger method in the company Macrogen (<http://dna.macrogen.com>, Korea). The resulting sequences were analyzed using DNASTAR (2001) and Sequencher (2014), and the alignment was carried out with Clustal W in MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). The sequences were compared using the BLAST algorithm of the NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and deposited in the GenBank.

RESULTS

In blackberry fruits, symptoms of soft rotting were observed, colored maroon to black, over which abundant mycelia, conidiophores and conidia grew, altogether forming gray mold (Figure 1A and 1B). Two hundred eleven isolations of *Botrytis* sp. were obtained, isolated from blackberry fruits from different regions in Mexico. The pathogenicity tests confirmed that 100% of the isolations inoculated produced symptoms of gray mold 48 hours after inoculation (hai) on inoculated fruits, with or without lesions, and control fruits displayed no symptoms or signs of the fungus. When performing the morphometric, morphological and cultural characterization, the 211 isolations were identified as *Botrytis cinerea* (Ellis, 1971; Jarvis, 1977; Martínez *et al.*, 2003). The production areas studied were: Colima, State of Mexico, Jalisco, Michoacán and Morelos, from where 34, 25, 32, 80 y 40 isolations were taken, respectively (Table 1). Clustering by similarity helped identify 21 groups, from which a representative isolation of each was taken; the pathogenic, morphological and molecular description is described below.

(Figura 1A y 1B). Se obtuvieron 21 aislamientos de *Botrytis* sp. aislados de frutos de zarzamora de distintas regiones de México. Las pruebas de patogenicidad confirmaron que el 100% de los aislamientos inoculados produjeron síntomas de moho gris 48 horas después de la inoculación (hdi), en frutos inoculados sin herida como para frutos inoculados con herida, en los frutos testigo no se observaron síntomas o signos del hongo. Al realizar la caracterización morfométrica, morfológica y cultural los 21 aislamientos fueron identificados como *Botrytis cinerea* (Ellis, 1971; Jarvis, 1977; Martínez *et al.*, 2003). Las zonas productoras estudiadas fueron: Colima, Estado de México, Jalisco, Michoacán y Morelos, de los cuales se obtuvieron 34, 25, 32, 80 y 40 aislamientos, respectivamente (Cuadro 1). El agrupamiento por similitud permitió identificar 21 grupos, de los cuales se seleccionó un aislamiento representativo de cada uno, la descripción patogénica, morfológica y molecular se menciona a continuación.

Pruebas de patogenicidad. De los 21 aislamientos inoculados el 100% fue patogénico en ambos métodos de inoculación, cuando no se realizó herida, los frutos inoculados presentaron síntomas típicos de la enfermedad 48 hdi (Figura 1C), se encontraron diferencias significativas ($F = 2762.38$, $p < 0.0001$) el diámetro de la lesión varió de 4.2 a 15.9 mm., a las 72 hdi el diámetro de lesión varió de 8.6 a 23.1 mm ($F = 8289.98$, $p < 0.0001$). En frutos con herida inoculados, los síntomas típicos se manifestaron 48 hdi existiendo diferencias significativas ($F = 3551.21$, $p < 0.0001$) en el diámetro de lesión el cual osciló de 7.3 a 19.6 mm. A las 72 hdi se mantuvo el comportamiento de los aislamientos, el diámetro de lesión varió de 11.2 a 24.8 mm ($F = 4287.86$, $p < 0.0001$) en todos los casos el aislamiento MF12 fue el más agresivo ya que indujo mayor diámetro de lesión en comparación con

Pathogenicity tests. Out of the 21 isolations inoculated, 100% was pathogenic in both inoculation methods. When no lesions were created, the inoculated fruits presented typical symptoms of the disease 48 hai (Figure 1C); significant differences were found ($F = 2762.38$, $p < 0.0001$); the diameter of the lesion varied between 4.2 and 15.9 mm., and at 72 hai the diameter of the lesion varied between 8.6 and 23.1 mm ($F = 8289.98$, $p < 0.0001$). In inoculated fruits with lesions, the typical symptoms manifested 48 hai, with significant differences ($F = 3551.21$, $p < 0.0001$) in the diameter of the lesion, which ranged between 7.3 and 19.6 mm. At 72 hai, the behavior of the isolations stabilized; the diameter of the lesion varied between 11.2 and 24.8 mm ($F = 4287.86$, $p < 0.0001$). In all cases, isolation MF12 was the most aggressive, since it produced the largest lesion diameter in comparison with isolation OS10, which presented the smallest lesion diameters (Table 2). Control fruits presented no symptoms or signs of the fungus (Figure 1C).

Morphometric, morphological and cultural characterization. The values of the mycelial growth rate varied between 0.7 cm d⁻¹ and 1.5 cm d⁻¹ where isolations 1.6 and 4.4 grew at a slower rate, while isolation MF21 was the quickest to grow (Table 3). The way of growth varied - 80.95% of isolations formed superficial mycelia and 19.05% formed aerial mycelia - as did the color, where 42.86% displayed a light gray color, 38.09% presented a gray color and 19.05%, dark gray, (Figure 1 D-G).

All isolations (100%) formed sclerotia, although isolations MF21 and 4.8 were more precocious, since they formed them 4 days after planting (dap), whereas isolation 4.1 took 11 dah. The shape of the sclerotia varied: 66.67% were irregular and 33.33% were round (Figure 1 H-J). The number of sclerotia formed in the Petri dish was 26 (isolation

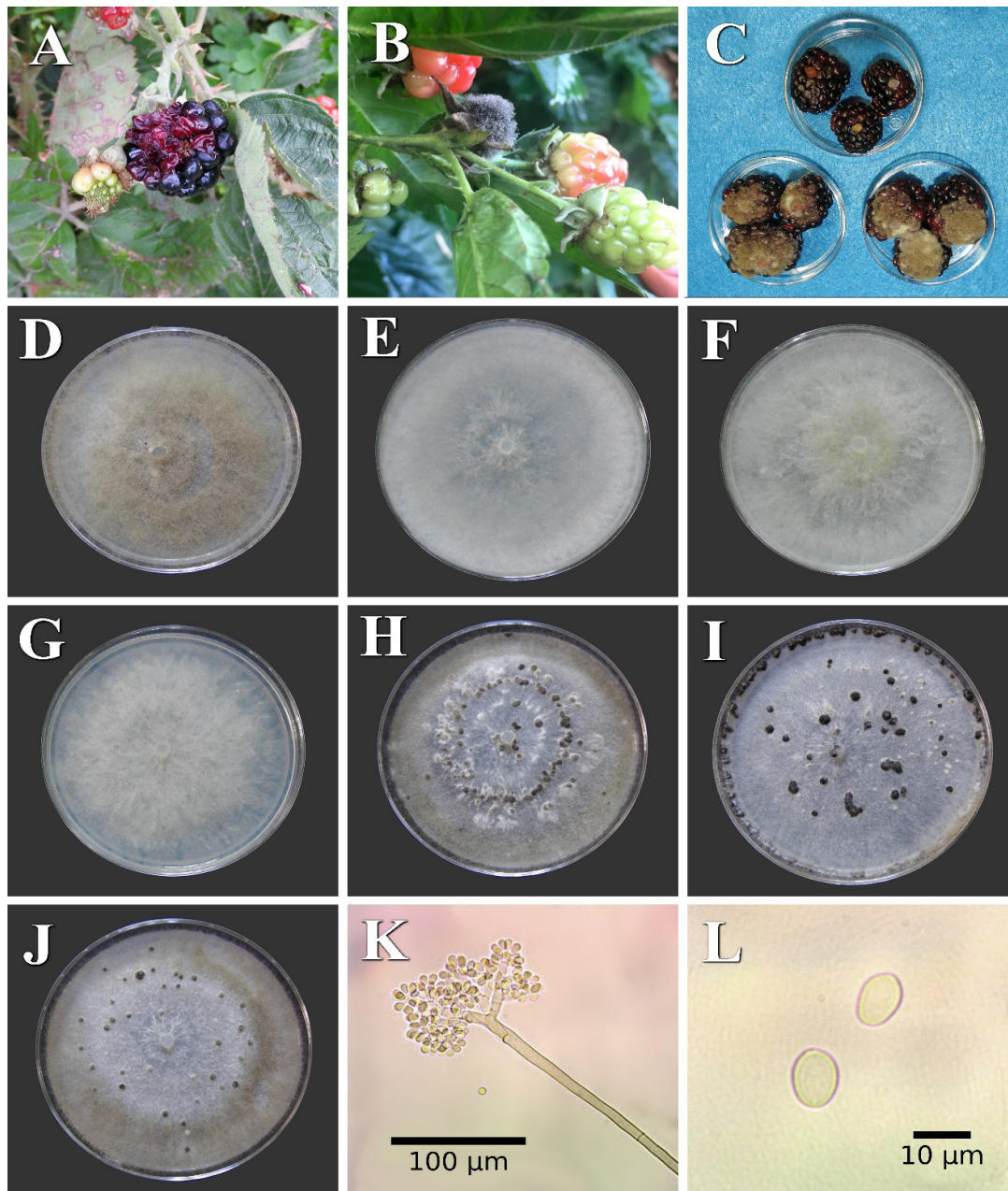


Figura 1. Características morfológicas de *B. cinerea* A. Fruto de zarzamora con síntomas en campo. B. Fruto de zarzamora con signos en campo. C. Parte superior, frutos de zarzamora inoculados con agua destilada estéril, parte inferior frutos enfermos inoculados con *B. cinerea*. D, E, F y G. Diferentes formas de crecimiento y coloración de micelio. H, I y J. Forma, color, número y disposición en el medio de cultivo PDA de esclerocios. K. Conidióforo con conidios. L. Conidios.

Figure 1. Morphological characteristics of *B. cinerea* A. Blackberry fruit with symptoms in the field. B. Blackberry fruit with signs in the field. C. Top section, blackberry fruits inoculated with sterilized distilled water, bottom section diseased fruits inoculated with *B. cinerea*. D, E, F and G. Different growth forms and color of mycelium. H, I and J. Shape, color, number and disposition in the PDA growth medium of sclerotia. K. Conidiophore with conidia. L. Conidia.

el aislamiento OS10 el cual presentó los menores diámetros de lesión (Cuadro 2). En los frutos testigo no se observaron síntomas o signos del hongo (Figura 1C).

Caracterización morfológica, morfológica y cultural. Los valores de la tasa de crecimiento del micelio varió de 0.7 cm d⁻¹ a 1.5 cm d⁻¹ donde los aislamientos 1.6 y 4.4 crecieron más lento mientras que el aislamiento MF21 fue el más rápido en crecer (Cuadro 3). La forma de crecimiento varió, el 80.95% de los aislamientos formaron

ZF10) to 333 (isolation MF21) (Table 3) and the largest sclerotia were formed by isolation 1.6, sized 2.5-(3.1)-4 × 2.0-(2.5)- 3.5 mm and isolation HC19 formed the smallest, sized 0.9-(1.2)-1.3 × 0.6-(0.9)-1.1 mm (Table 3).

All isolations sporulated, and isolations MF21 and HC19 were the most aggressive, sporulating 9 dap, in comparison with isolation 1.5, which took place 20 dap. Conidia observed were erect, septated, branched maroon to olive in color, and the largest ones were formed by isolation HC19 with a size of 1175-1694 × 8-17 μm, whereas the

Cuadro 2. Diámetro de lesión (mm) ocasionado por *B. cinerea* en frutos de zarzamora 48 y 72 horas después de la inoculación (hdi).

Table 2. Diameter of lesion (mm) caused by *B. cinerea* in blackberry fruits 48 and 72 hours after inoculation (hai).

Aislamiento	Diámetro (mm) (48 hdi)		Diámetro (mm) (72 hdi)	
	Con herida	Sin herida	Con herida	Sin herida
MF21	19.6 a ^z	15.9 a	24.8 a	23.1 a
4.8	16.1 b	13.2 d	20.9 b	18.1 bc
ZF10	16.1 b	13.4 c	20.1 c	18.1 b
MF12	15.9 b	13.7 b	19.9 d	17.9 cd
5.6	15.9 b	13.2 d	19.7 e	17.9 d
1.5	15.6 c	13.2 d	19.7 e	17.6 e
2.5	13.6 d	10.8 e	18.6 f	16.7 f
3.1	13.6 d	10.7 f	18.6 f	16.7 f
4.4	13.5 d	10.5 g	18.5 f	16.6 f
4.1	13.5 d	10.7 f	18.5 f	16.7 f
BP3	12.4 e	9.2 h	17.1 g	14.6 g
HAR3	12.4 e	9.3 h	16.9 g	14.3 i
BP5	12.2 f	9.2 h	16.9 g	14.4 h
T6	11.9 g	8.9 i	15.8 i	13.0 k
1.6	11.9 g	8.8 j	15.9 h	13.1 j
T1	11.8 g	9.0 i	16.0 h	13.2 j
HC25	9.9 h	6.9 k	13.6 j	11.1 m
OS5	9.9 h	6.9 k	13.3 k	10.9 m
HC19	9.9 h	6.9 k	13.6 j	11.2 l
HAR4	9.9 h	7.0 k	13.4 k	11.1 m
OS10	7.3 i	4.2 l	11.2 l	8.6 n
Testigo	0 j	0 m	0 m	0 o

^z Los valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales (*= p≤0.05) según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) / ^z Mean values followed by the same letters in the same column are statistically equal (*= p≤0.05) according to the Least Significance Difference (LSD) test.

Cuadro 3. Tasa de crecimiento y características morfológicas y morfométricas de 21 aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de frutos de zarzamora.
Table 3. Growth rate and morphological and morphometric characteristics of 21 isolations of *B. cinerea* obtained from blackberry fruits.

Aislamiento <i>B. cinerea</i>	Crecimiento (cm d ⁻¹)	Color micelio	Esclerocios			No. por caja	Conidios		
			Forma ^x	Tamaño (mm) ^z	Tamaño Conidioforo (µm)		Forma ^y	Tamaño (µm) ^z	
MF21	1.5	Gris oscuro	I	1.3-(1.6)-1.9 × 0.9-(1.3)-1.6	1163-1795 × 8-17	333	E	6.4-(9.4)-12.2 × 5.3-(7.0)-8.6	
ZF10	1.3	Gris claro	I	1.8-(2.3)-3.2 × 1.3-(1.7)-2.5	957-1393 × 7-16	26	R	7.4-(10.2)-12.7 × 5.7-(8.8)-11.2	
HC25	1.3	Gris claro	I	1.6-(2.3)-3.4 × 1.0-(1.7)-2.3	948-1404 × 7-16	37	A	7.0-(9.0)-11.6 × 5.2-(5.9)-6.9	
OS5	1.2	Gris claro	I	1.3-(1.8)-2.5 × 1.1-(1.4)-2.0	1073-1585 × 8-17	115	A	5.9-(8.5)-11.0 × 5.2-(6.8)-9.7	
OS10	1.2	Gris claro	I	1.1-(1.9)-2.4 × 0.9-(1.6)-2.7	1005-1593 × 8-17	47	A	5.6-(8.7)-10.3 × 5.2-(6.5)-8.0	
HAR4	1.2	Gris claro	I	1.3-(1.9)-2.5 × 0.8-(1.3)-1.8	859-1437 × 7-16	73	E	7.0-(8.5)-10.2 × 5.3-(6.6)-7.8	
1.5	1.1	Gris oscuro	R	1.2-(1.6)-1.9 × 0.9-(1.2)-1.4	941-1605 × 8-16	255	R	6.2-(8.5)-13.4 × 4.7-(6.6)-9.0	
HC19	1.1	Gris claro	I	0.9-(1.2)-1.3 × 0.6-(0.9)-1.1	1175-1694 × 8-17	73	E	6.2-(8.7)-10.7 × 5.9-(7.2)-8.6	
BP3	1.0	Gris claro	R	1.3-(1.9)-2.5 × 0.8-(1.3)-1.8	1023-1845 × 8-18	86	A	6.7-(8.1)-9.6 × 4.9-(6.3)-7.3	
T6	1.0	Gris	I	2.0-(2.8)-3.6 × 1.5-(2.0)-2.8	1051-1744 × 8-17	101	E	6.9-(8.5)-9.7 × 5.9-(6.8)-7.8	
HAR3	0.9	Gris claro	I	1.4-(1.7)-1.9 × 1.1-(1.2)-1.4	1156-1734 × 8-17	128	E	7.5-(8.8)-10.6 × 5.6-(7.1)-8.4	
MF12	0.9	Gris oscuro	I	1.6-(2.2)-3.8 × 1.3-(1.8)-2.3	1073-1606 × 8-17	112	E	6.7-(8.7)-10.8 × 5.4-(6.6)-8.5	
5.6	0.9	Gris claro	I	1.4-(1.8)-2.8 × 1.0-(1.4)-1.8	967-1531 × 8-16	219	E	8.8-(10.4)-13.8 × 6.5-(7.2)-7.9	
T1	0.9	Gris	R	1.9-(2.3)-3.3 × 1.2-(1.8)-2.5	919-1504 × 8-16	188	R	7.3-(9.0)-10.9 × 5.7-(6.6)-7.4	
4.1	0.9	Gris	I	1.3-(1.6)-2.1 × 1.1-(1.3)-1.7	1053-1682 × 8-17	281	E	6.6-(8.3)-10.8 × 5.5-(6.7)-8.2	
3.1	0.8	Gris	R	1.5-(2.0)-2.3 × 1.3-(1.5)-1.7	963-1701 × 8-17	70	E	7.1-(9.1)-11.9 × 5.6-(6.2)-7.0	
BP5	0.8	Gris	R	1.6-(2.1)-2.5 × 1.2-(1.5)-1.9	983-1593 × 8-16	113	R	6.4-(8.4)-9.9 × 5.5-(6.7)-7.8	
2.5	0.8	Gris	I	2.0-(2.4)-2.7 × 1.5-(2.1)-2.7	846-1492 × 6-15	49	E	6.9-(8.7)-12.1 × 5.4-(6.6)-7.6	
4.8	0.8	Gris oscuro	R	2.0-(2.2)-2.6 × 1.3-(1.5)-1.8	1083-1639 × 8-17	76	E	6.4-(9.4)-12.4 × 5.8-(6.7)-8.7	
4.4	0.7	Gris	R	1.5-(2.0)-2.7 × 1.3-(1.7)-2.3	1023-1740 × 8-17	190	E	6.4-(9.0)-11.4 × 6.3-(6.9)-7.27	
1.6	0.7	Gris	I	2.5-(3.1)-4.0 × 2.0-(2.5)-3.5	963-1569 × 8-17	143	E	7.2-(8.7)-11.6 × 5.6-(6.6)-8.3	

^x Código de forma de los esclerocios. R = redondo, I = Irregular / Sclerotia shape code. R = round, I = Irregular.

^y Código de forma de los conidios. A = almonada, E = elíptica, R = redonda / Conidia shape code. A = lemon-shaped, E = elliptical, R = round.

^z Largo × ancho, mínimo-(promedio)-máximo × mínimo-(promedio)-máximo / Length × width, minimum-(average)-maximum × minimum-(average)-maximum.

micelio superficial y 19.05% formó micelio aéreo, al igual que el color, donde el 42.86% presentó color gris claro, 38.09% exhibió una coloración gris y 19.05% color gris oscuro, (Figura 1 D-G).

El 100% de los aislamientos formaron esclerocios, los aislamientos MF21 y 4.8 fueron más precoces formándolos a los 4 días después de la siembra (dds). En comparación con el aislamiento 4.1 que tardó 11 dds. La forma de los esclerocios varió, 66.67% fueron irregulares y 33.33% redondos (Figura 1 H-J), el número de esclerocios formados por caja Petri fue de 26 (aislamiento ZF10) a 333 (aislamiento MF21) (Cuadro 3) y los esclerocios más grandes los formó el aislamiento 1.6 de un tamaño de 2.5-(3.1)-4 × 2.0-(2.5)- 3.5 mm y el aislamiento HC19 formó los más pequeños de un tamaño de 0.9-(1.2)-1.3 × 0.6-(0.9)-1.1 mm (Cuadro 3).

Todos los aislamientos esporularon, el MF21 y HC19 fueron los más agresivos al esporular 9 dds en comparación con el aislamiento 1.5 que ocurrió 20 dds. Se observaron conidióforos erectos, septados, ramificados, de color marrón a olivo y los más grandes fueron formados por el aislamiento HC19 con un tamaño de 1175-1694 × 8-17 µm mientras que los más cortos los formó el aislamiento 2.5 de 846-1492 × 6-15 µm (Figura 1K). El 61.90% de los aislamientos formó conidios elípticos, 19.05% alimonados y el 19.05% redondos, el 100% fueron hialinos a marrón claro (Figura 1L), los conidios de mayor tamaño fueron los formados por el aislamiento 5.6 de 8.8-(10.4)-13.8 × 6.5-(7.2)- 7.9 µm y los de menor tamaño los formó el aislamiento OS10 de 5.6-(8.7)-10.30 × 5.2-(6.5)- 8.0 µm (Cuadro 3).

Identificación molecular. Los números de acceso de las secuencias ITS obtenidas se mencionan en el Cuadro 1, los accesos de los aislamientos 2.5, 3.1, ZF10, 4.1, 4.8, HC19, 4.4, 5.6, 1.5, MF21 y MF12, presentaron una similitud del 100% con el número de acceso MG907605.1 de *B. cinerea*; los

shortest ones were formed by isolation 2.5 and measured 846-1492 × 6-15 µm (Figure 1K). Out of all the isolations, 61.90% formed elliptical conidia, 19.05 % lemon-shaped and 19.05 % round ones; 100% were hyaline to light maroon (Figure 1L), the largest conidia were formed by isolation 5.6 and measured 8.8-(10.4)-13.8 × 6.5-(7.2)- 7.9 µm, while the smaller conidia were formed by isolation OS10 and measured 5.6-(8.7)-10.30 × 5.2-(6.5)- 8.0 µm (Table 3).

Molecular identification. The access numbers of the ITS sequences obtained are shown in Table 1. Access numbers from isolations 2.5, 3.1, ZF10, 4.1, 4.8, HC19, 4.4, 5.6, 1.5, MF21 and MF12, presented a similarity of 100% with access number MG907605.1 of *B. cinerea*; isolations HAR3, HAR4, BP3, BP5 were similar (100%) to the deposit KX783612.1 of *B. cinerea* and isolations 1.6, T1 and HC25 presented a similarity of 100% with access number KX463512.1 of *B. cinerea*. Isolations OS5 and OS10 were similar to the same deposit, but by 99 % and isolation T6 was similar (97%) to access number KU992695.1 of *B. cinerea*.

DISCUSSION

The symptoms observed in this research were typical of gray mold, and similar to those reported by Li *et al.* (2012a) and Li *et al.*, (2012b). In the pathogenicity tests of this study, 100% of the inoculated isolations were ineffective, showing symptoms at 48 hai. Isolation MF21 developed the largest lesion diameter at 48 and 72 hai in both forms of inoculation, reaching the largest lesion diameter when the cut was made. The cuts in the blackberry fruit facilitate the entry of *B. cinerea*, since the fungus penetrates and uses mechanisms such as the formation of appressoria, the production

aislamientos HAR3, HAR4, BP3, BP5 fueron similares (100%) al depósito KX783612.1 de *B. cinerea* y los aislamientos 1.6, T1 y HC25 presentaron una similitud del 100% con el número de acceso KX463512.1 de *B. cinerea*, los aislamientos OS5 y OS10 fueron similares al mismo depósito pero en un 99% y el aislamiento T6 fue similar (97%) con el número de acceso KU992695.1 de *B. cinerea*.

DISCUSIÓN

Los síntomas observados en la presente investigación fueron típicos de moho gris siendo similares a los reportados por Li *et al.* (2012a) y Li *et al.*, (2012b). En las pruebas de patogenicidad en el presente estudio el 100% de los aislamientos inoculados fueron infectivos, mostrando síntomas a las 48 hdi. El aislamiento MF21 desarrolló el mayor diámetro de lesión a las 48 y 72 hdi en las dos formas de inoculación alcanzando el mayor diámetro de lesión cuando se realizó una herida, las heridas en la fruta de zarzamora facilitan la entrada de *B. cinerea* ya que el hongo penetra y utiliza mecanismos como la formación de apresorios, producción de fitotoxinas y secreción de enzimas degradantes de la pared celular (Choquer *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016), de acuerdo a los resultados la presencia de una herida induce mayor diámetro de la lesión, lo cual destaca la importancia de evitar daños físicos durante la cosecha y postcosecha para incrementar la vida de anaquel de la fruta.

Los aislamientos MF21 y ZF10 fueron los que presentaron mayor tasa de crecimiento en medio de cultivo PDA (Cuadro 3) esto se asoció a la agresividad cuando se inocularon en el hospedante, ya que ocasionaron lesiones grandes en poco tiempo, estos aislamientos provienen de parcelas del estado de Michoacán de la región de Peribán y Ziracuaretiro respectivamente, las cuales presentan antecedentes

of phytotoxins, and the secretion of enzymes that degrade the cell wall (Choquer *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016). According to the results, the presence of a lesion induces a greater diameter of the lesion, which highlights the importance of avoiding physical damage during harvest and postharvest to increase the fruit's shelf life.

The isolations MF21 and ZF10 presented a higher growth rate in PDA culture medium (Table 3). This was related with aggressiveness when they were inoculated in the host, since they caused large lesions in little time. These isolations come from fields in the state of Michoacán, specifically from the area of Peribán and Ziracuaretiro, respectively, which have a background of an intensive use of products, in comparison to isolation 1.6 from Texcoco, State of Mexico, which displayed a lower growth rate and aggressiveness, and which has received no fungicides. The mycelial growth data found in this investigation coincide with those reported by Li *et al.* (2012a).

The present study found different growth forms, as well as the color of the *B. cinerea* mycelium, which coincides with different investigations (Li *et al.*, 2012a; Lorenzini and Zapparoli, 2014; Ozer and Bayraktar, 2014; Tanovic *et al.* 2014; Zhou *et al.*, 2014;). The results of the present investigation expose the high morphological variability of the pathogen to develop in a culture medium, but also share similarities between the members of a state in particular. For example, the 5 isolations from the state of Morelos displayed light gray mycelia and those from Jalisco, gray ones. In addition, the most aggressive isolation was observed to form darker colored mycelia. This correlation between pigmentation and aggressiveness may possibly be due to the higher presence of melanin in *B. cinerea* conidia (Doss *et al.*, 2003).

The size, shape, color and the arrangement of the sclerotia in the culture medium is important

de una aplicación intensiva de productos, en comparación con el aislamiento 1.6 de Texcoco Edo. de México, que mostró una menor tasa de crecimiento y agresividad, a esta plantación de zarzamora no se han aplicado fungicidas. Los datos de crecimiento de micelio encontrados en la presente investigación coinciden con lo reportado por Li *et al.* (2012a).

En este estudio se encontraron diferentes formas de crecimiento así como la coloración del micelio de *B. cinerea* que coinciden con diferentes investigaciones (Li *et al.*, 2012a; Lorenzini y Zapparoli, 2014; Ozer y Bayraktar, 2014; Tanovic *et al.* 2014; Zhou *et al.*, 2014;). Los resultados de la presente investigación ponen de manifiesto la alta variabilidad morfológica del patógeno para desarrollarse en medio de cultivo pero al mismo tiempo comparten similitudes entre los miembros de un estado en particular, por ejemplo los 5 aislamientos del estado de Morelos presentaron micelio de color gris claro y los del estado de Jalisco color gris, además se observó que el aislamiento más agresivo formó micelio de coloración más oscuro, esta correlación entre pigmentación y agresividad posiblemente se explique por la mayor presencia de melanina en los conidios de *B. cinerea* (Doss *et al.*, 2003).

El tamaño de los esclerocios, la forma, el color y la disposición en el medio de cultivo es importante para la identificación morfológica de *B. cinerea* (Martínez *et al.*, 2003). Los aislamientos obtenidos producen esclerocios que coinciden en tamaño con los reportados por Erper *et al.* (2015) para *B. cinerea* en frijol y con los de arándanos y vid (Saito *et al.*, 2016). La forma redonda e irregular, color negro y distribución en el medio de cultivo de la presente investigación coincide con *B. cinerea* aislado de zarzamora (Li *et al.*, 2012a). El tiempo que tarda el hongo en formar sus esclerocios *in vitro* así como el número de estos por caja Petri nos da una idea de la sobrevivencia de los aislamientos en campo. Respecto al número de esclerocios por caja

for the morphological identification of *B. cinerea* (Martínez *et al.*, 2003). The isolations obtained produce sclerotia that coincide in size with those reported by Erper *et al.* (2015) for *B. cinerea* in beans and in cranberries and grapevines (Saito *et al.*, 2016). The round and irregular shape, the black color and the arrangement in the culture medium of the present investigation coincides with *B. cinerea* isolated from blackberries (Li *et al.*, 2012a). The time taken for the fungus to form its sclerotia *in vitro*, as well as their number per Petri dish, gives us an idea of the survival of the isolations on the field. Regarding the number of sclerotia per Petri dish, isolation MF21 formed a large amount in a short time span, in comparison with the other isolations; it produced the greatest lesion diameter and growth rate in relation with the others.

The sporulation of *B. cinerea in vitro* is broadly related with its aggressiveness, because the faster it forms its reproductive structures, it can be disseminated and cause epidemics (Carisse *et al.*, 2015). The shape and color of the conidia found in the present investigation are similar to those reported by Aktaruzzaman *et al.* (2017); Zhou *et al.* (2014); Lorenzini and Zapparoli (2014) and Xie *et al.* (2016). The size of the conidiophores differs with that reported for blackberry by Li *et al.* (2012a); despite being the same species and host, they reported larger conidiophores. The size of the conidia is the most important morphometric variable to set these species apart, which helped us identify *B. cinerea* isolated from blackberries. Findings in this investigation coincide with reports for *B. cinerea*, although in other hosts by Ozer and Bayraktar (2014), Rupp *et al.* (2017). However, they differ with those reported by Zhou *et al.* (2014) and Saito *et al.* (2016), since these authors reported larger-sized conidia. There is a similarity in biological characteristics between the individuals obtained in a particular state, which is to say that

Petri el aislamiento MF21 formó una alta cantidad en corto tiempo en comparación con los otros aislamientos, generó el mayor diámetro de lesión y tasa de crecimiento en relación con los demás.

La esporulación de *B. cinerea* *in vitro* tiene estrecha relación con la agresividad del mismo, ya que entre más rápido forme sus estructuras de reproducción se puede diseminar y ocasionar epidemias (Carisse *et al.*, 2015). La forma y el color de los conidios encontrados en la presente investigación son similares a los reportados por Aktaruzzman *et al.* (2017); Zhou *et al.* (2014); Lorenzini y Zapparoli (2014) y Xie *et al.* (2016). El tamaño de los conidióforos difiere con lo reportado para zarzamora por Li *et al.* (2012a), aunque es la misma especie y hospedante estos reportaron conidióforos más grandes. El tamaño de los conidios es la variable morfométrica más importante para diferenciar entre especies, lo cual nos permitió identificar a *B. cinerea* aislado de zarzamora, lo encontrado en la presente investigación coincide con lo reportado para *B. cinerea* pero en otros hospedantes por Ozer y Bayraktar (2014), Rupp *et al.* (2017), sin embargo difieren con los reportados por Zhou *et al.* (2014) y Saito *et al.* (2016) ya que estos informaron mayor tamaño de conidios. Existe similitud de las características biológicas entre los miembros obtenidos de un estado en particular, es decir, los aislamientos de origen geográfico cercano son similares, por ejemplo, la capacidad de inducir enfermedad, agresividad, el color del micelio, forma y morfometría de esclerocios, conidios y conidióforos, entre otras, cada estado comparte origen geográfico y clima el cual es similar en cada sitio de muestreo por estado de donde fueron obtenidos los aislamientos, (Cuadro 1), lo cual hace que existan similitudes biológicas, sin embargo, existen una variabilidad morfológica, morfométrica y patogénica por estados pero que están dentro del rango de lo reportado para *B. cinerea*, por ejemplo los aislamientos de

the isolations with nearby geographic origins are similar. For example, the ability to induce diseases, aggressiveness, the color of the mycelium, the shape and morphometry of the sclerotia, conidia and conidiophores, amongst others. Each state shares a geographic origin and weather, which is similar in every sampling site by state from which the isolations were obtained (Table 1), which leads to the existence of biological similarities. However, there is a morphological, morphometric and pathogenic variability by states, but these are within the range reported for *B. cinerea*. For instance, the isolations from Michoacán differ in the biological characteristics with isolations from the rest of the states.

B. cinerea has been reported to cause gray mold in blackberries in Australia, China, New Zealand, South Africa, Norway and the United States. According to records from the USDA (Farr and Rossman, 2011) and in the U.S., *B. cinerea* was reported only in species of *Rubus* in Alaska, California, North Carolina and Washington (Li *et al.*, 2012a), and in the present research, isolations were identified as *B. cinerea* causing gray mold in different states in Mexico.

CONCLUSIONS

All isolations were pathogenic; variability was identified in the pathogenic, morphological and cultural characteristics, which are within the range of reports for this species. The isolations of the fungus obtained from the blackberry fruit were identified as *Botrytis cinerea*, taking the morphological, morphometric and cultural characteristics into consideration, confirmed with the analysis of sequences in the area of the internal transcribed spacers (ITS), and therefore the pathogen is reported as the causal agent of

Michoacán difieren en las características biológicas de los aislamientos de los demás estados.

B. cinerea se ha reportado causando moho gris en zarzamora en Australia, China, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Noruega, Estados Unidos, de acuerdo con los registros del USDA (Farr y Rossman, 2011) y en los Estados Unidos, *B. cinerea* fue reportada solo en especies de *Rubus* en Alaska, California, Carolina del Norte y Washington (Li *et al.*, 2012a), y en la presente investigación los aislamientos se identificaron como *B. cinerea* causando el moho gris en diferentes estados de México.

CONCLUSIONES

Todos los aislamientos fueron patogénicos, se identificó variabilidad en las características patogénicas, morfológicas y culturales las cuales están dentro del rango de lo reportado para esta especie, los aislamientos del hongo obtenidos de la fruta de zarzamora en la presente investigación se identificaron como *Botrytis cinerea* tomando en cuenta las características morfológicas, morfométricas y culturales, confirmado con el análisis de secuencias de la región del espacio transcrito interno (ITS), por lo tanto se reporta a dicho patógeno como agente causal del moho gris en los estados de Colima, Estado de México, Jalisco, Michoacán y Morelos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 429090 otorgada al primer autor para realizar sus estudios de doctorado.

LITERATURA CITADA

Aktaruzzaman MD, Xu SJ, Kim JY and Kim BS. 2014. First Report of Postharvest Gray Mold Rot on Carrot Caused by *Botrytis cinerea* in Korea. Research in

gray mold in the states of Colima, State of Mexico, Jalisco, Michoacán and Morelos.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Science and Technology Council (CONACYT) for scholarship No. 429090 granted to the first author for his PhD studies.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Plant Disease 20(2):129-131. <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.2.129>
- Aktaruzzaman MD, Afroz T, Lee YG and Kim BS. 2017. *Botrytis cinerea* is the causal agent of post-harvest grey mould rot on green bean (*Phaseolus vulgaris*) in Korea. Australasian Plant Disease Notes 12: 32. DOI: 10.1007/s13314-017-0261-6
- Calvo GC, Viñas I, Elmer PAG, Usall J and Teixidó N. 2014. Suppression of *Botrytis cinerea* on necrotic grapevine tissues by early season applications of natural products and biocontrol agents. Pest Management Science 70(4): 595–602. <https://doi.org/10.1002/ps.3587>
- Carisse O, Tremblay DM and Lefebvre A. 2014. Comparison of *Botrytis cinerea* airborne inoculum progress curves from raspberry, strawberry and grape plantings. Plant Pathology 63:983–993. <https://doi.org/10.1111/ppa.12192>
- Cheon W and Jeon YH. 2013. First Report of Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on Greenhouse-Grown Zucchini in Korea. Plant Disease 97(8):1116. doi: 10.1094/PDIS-01-13-0005-PDN.
- Choquer M, Fournier E, Kunz C, Levis C, Pradier JM, Simon A and Viaud M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. FEMS Microbiology Letters 277: 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>
- Crisosto CH, Garner D and Crisosto G. 2002. Carbon dioxide-enriched atmospheres during cold storage limit losses from *Botrytis* but accelerate rachis browning of 'Redglobe' table grapes. Postharvest Biology and Technology 26: 181–189. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00013-3)
- DNASTAR. 2001. Lasergene expert sequence analysis software, User manual. Version 5. Wisconsin, USA: DNASTAR Inc. Madison.
- Doss RP, Deisenhofer J, Krug von Nidda HA, Soeldner AH and McGuire RP. 2003. Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. Phytochemistry 63: 687–691. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00323-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00323-6)
- Droby S, Wisniewski M, Macarisin D and Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? Postharvest Biology and Technology 52: 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>



- Elad Y, *et al.* 2014. Lists of plant pathogens and plant diseases in Israel. <http://www.phytopathology.org.il/pws/page!10949>.
- Elmagid ABD, Garrido P. A, Hunger R, Lyles JL, Mansfield MA, Gugino BK, Smith DL, Melouk HA and Garzon CD. 2013. Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus *Sclerotinia*. *Journal of Microbiological Methods* 92(3): 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.020>
- Erper I, Celik H, Turkkan M and Kilicoglu MC. 2015. First report of *Botrytis cinerea* on golden berry. *Australasian Plant Disease Notes* 10(1): 24-25. <http://doi.org/10.1007/s13314-015-0175-0>
- Ellis MB. 1971. *Dematiaceous* hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 608 p.
- Farr DF and Rossman YA. 2011. Fungal databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved 19 May 2011, from /fungaldatabases/
- Feliziani E and Romanazzi G. 2013. Preharvest application of synthetic fungicides and alternative treatments to control postharvest decay of fruit. *Stewart Postharvest Review* 9(3): 1-6. DOI: 10.2212/spr.2013.3.4
- Gardes M and Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2): 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Holubová JV. 1974. A revision of the genus *Olpitrichum* Atk. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 9(4): 425–432.
- Ippolito A and Nigro F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* 19(8-10): 715–723. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00095-8)
- Jarvis WR. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species; taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph No. 15. Ottawa: Canadian Department of Agriculture. Ottawa. 195 p.
- Li X, Kerrigan J, Chai W and Schnabel G. 2012a. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104(3): 650–658. <https://doi.org/10.3852/11-218>
- Li X, Fernández OD, Chai W, Wang F and Schnabel G. 2012b. Identification and prevalence of *Botrytis* spp. from blackberry and strawberry fields of the Carolinas. *Plant Disease* 96(11): 1634–1637. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0128-RE>
- Lorenzini M and Zapparoli G. 2014. An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. *Plant Pathology* 63(6): 1326-1335. <https://doi.org/10.1111/ppa.12216>
- Martinez F, Blancard D, Lecomte P and Levis C. 2003. Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109(5): 479-488. <https://doi.org/10.1023/A:1024222206991>
- Nieto LEH, Aguilar PLA, Ayala EV, Nieto AD, Nieto AR, Leyva MSG and Tovar PJM. 2014. FIRST REPORT OF *Botrytis cinerea* CAUSING POSTHARVEST GRAY MOLD OF TEJOCOTE (*Crataegus mexicana*) FRUIT IN MEXICO. *Journal of Plant Pathology* 96(4)124.
- Ozer G and Bayraktar H. 2014. First report of *Botrytis cinerea* on cornelian cherry. *Australasian Plant Disease Notes* 9: 126. <https://doi.org/10.1007/s13314-014-0126-1>
- Ponce de León I, Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Betancor M and Vidal S. 2007. *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* 7: 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-52>
- Ruiz R, Hernández MJ, Ayala EV, Soto RL, Leyva MSG and Hernández RJ. 2014. Hongos asociados a cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdarifa* L.) deshidratados y almacenados en Guerrero, México. *Revista Mexicana de fitopatología*. 33 (1): 12-30. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61240687002>.
- Rupp S, Plesken C, Rumsey S, Dowling M, Schnabel G, Weber RWS and Hahn M. 2017. *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold on strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-based fungicide resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 83(9): 00269-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00269-17>
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. 2018. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>. (Consulta, mayo de 2018).
- Saito S, Margosan D, Michailides TJ and Xiao CL. 2016. *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. *Mycologia* 108(2): 330–343. <https://doi.org/10.3852/15-165>
- Sambrook J and Russel DW. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. In: Sambrook J, Russell DW (eds) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 631–632.
- SAS Versión .9.1 for Windows
- Sequencher. 2014. Sequence analysis software Version 5.3. Ann Arbor, MI, USA: Gene Codes Corporation.
- Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC and Eliceiri KW. 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development* 82(7-8): 518-529. <https://doi.org/10.1002/mrd.22489>
- Silva MA, Correa FR, Pinho DB, Pereira OL and Furtado GQ. 2016. First report of *Botrytis cinerea* on *Miconia cinnamomifolia* 11:26. *Australasian Plant Disease Notes*. DOI 10.1007/s13314-016-0215-4
- Smith MI, Dunez J, Phillips DH, Lelliott AR and Archer AS. 2009. *European handbook of plant diseases*. Wiley online library, UK. Blackwell, Oxford, p 583. doi: 10.1002/9781444314199
- Staats M, Baarlen PV, and Van KJAL. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22(2): 333–346. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>
- Steel RGD, Torrie JH and Dickey DA. 1997. *Principles and procedures of statistics a biometrical approach*. 3th Edition. McGraw-Hill. USA. 139-201; 286-290.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

- Tanovic B, Delibasic G, Milivojevic J and Nikolic M. 2009. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. Archives of Biological Sciences 61(3):419–429. DOI: 10.2298/ABS0903419T
- Tanovic B, Hrustic J, Mihajlovic M, Grahovac M and Delibasic G. 2014. *Botrytis cinerea* in raspberry in Serbia I: Morphological and molecular characterization. Journal Pesticides and Phytomedicine 29(4): 237–247. DOI: 10.2298/PIF1404237T
- Teles CS, Benedetti BC, Gubler WD and Crisosto CH. 2014. Prestorage application of high carbon dioxide combined with controlled atmosphere storage as a dual approach to control *Botrytis cinerea* in organic ‘Flame Seedless’ and ‘Crimson Seedless’ table grapes. Postharvest Biology and Technology 89: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.11.001>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., eds), Academic Press, San Diego: 315–322.
- Xie XW, Zhang ZX, Chai AL, Shi YX and Li BJ. 2016. Grey mould on leaf mustard caused by *Botrytis cinerea*, a new disease in China. Australasian Plant Disease Notes 11: 23. <http://doi.org/10.1007/s13314-016-0211-8>
- Yu L, Zhao R, Xu SG, Su Y, Gao D and Srzednicki. 2014. First Report of Gray Mold on *Amorphophallus muelleri* Caused by *Botrytis cinerea* in China. Plant Disease 98(5):692–692. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0855-PDN>
- Zhang J, Wu MD, Li GQ, Yang L, Yu L, Jiang DH, Huang HC and Zhuang WY. 2010a. *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. Mycologia 102(5): 1114–11267. <https://doi.org/10.3852/09-217>
- Zhang J, Zhang L, Li GQ, Yang L, Jiang DH, Zhuang WY and Huang HC. 2010b. *Botrytis sinoallii*: a new species of the grey mould pathogen on *Allium* crops in China. Mycoscience 51(6): 421–431. <https://doi.org/10.1007/S10267-010-0057-4>
- Zhang M, Wang XJ, Wu HY and Sun B. 2014. First Report of *Botrytis cinerea* Causing Fruit Rot of *Pyrus sinkiangensis* in China. Plant Disease 98(2):281–281. DOI: 10.1094/PDIS-06-13-0639-PDN
- Zhang J, Yang H, Yu QY, Wu MD, Yang L, Zhuang WY, Chen WD and Li GQ. 2016. *Botrytis pyriformis* sp. nov., a novel and likely saprophytic species of *Botrytis*. Mycologia 108(4): 682–696. <https://doi.org/10.3852/15-340>
- Zhou YJ, Zhang J, Wang XD, Yang L, Jiang DH, Li GQ, Hsiang T and Zhuang WY. 2014. Morphological and phylogenetic identification of *Botrytis sinoviticola*, a novel cryptic species causing gray mold disease of table grapes (*Vitis vinifera*) in China. Mycologia 106(1): 43–56. <https://doi.org/10.3852/13-032>