Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Agronomía

Análisis de sensibilidad de fungicidas utilizados en el combate de *Botrytis cinerea in vitro* e *in vivo* utilizando plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Tesis presentada para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con Énfasis en Fitotecnia

Gabriela Zárate Chinchilla

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2012

Análisis de sensibilidad de fungicidas utilizados en el combate de *Botrytis cinerea in vitro* e *in vivo* utilizando plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Gabriela Zárate Chinchilla

Dr. Eric Guevara Berger	DIRECTOR DE ESCUELA
M.Sc. Amy Wang Wong	DIRECTORA DE TESIS
Dr. Luis Felipe Arauz Cavallini	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
M.Sc. Oscar Castro Zúñiga	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Dra. Gerardina Umaña Rojas	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Gabriela Zárate Chinchilla	SUSTENTANTE

Dedicatoria

A la memoria de mis padres

Gerardo Zárate Ramírez y

Luzmira Chinchilla Castro

y mi hermano Adrián.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a Dios, por la vida y por permitirme concluir una meta más.

A Bayer CropScience por la oportunidad de asignarme este estudio y proporcionar los fungicidas utilizados.

Al Laboratorio de Fitopatología y Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fitoprotección, ambos del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos de la Universidad de Costa Rica, por brindar los recursos necesarios para la realización de este estudio.

A mi directora de tesis Amy Wang por su guía durante el proceso. A mis revisores Luis Felipe Arauz, Oscar Castro y Gerardina Umaña por sus valiosos aportes a este trabajo.

Un agradecimiento especial a Jorge Díaz por su colaboración en las giras y búsqueda de materiales durante de este trabajo y a Lucy Zavala por su cariño, bondad, consejos y todo lo que me ha enseñado para seguir adelante.

A mis amigos por sus palabras de aliento y a todas las personas que de alguna u otra forma formaron parte del desarrollo de este trabajo.

¡Muchas gracias!

Índice general

Dedicatoria iii
Agradecimientos iv
Índice general v
Índice de figuras vi
Índice de cuadros vii
Resumen viii
Introducción 1
Objetivo general 4
Objetivos específicos 4
Revisión bibliográfica 5
Resistencia a fungicidas 5
Fungicidas usados para el combate de *Botrytis cinerea* 6
Estudios sobre la resistencia de Botrytis en diversos países 9
Metodología 12
Localización 12
Recolección del hongo 12
Pruebas moleculares 12
Aislamiento del patógeno 14
Elaboración de la línea base de sensibilidad al fenhexamid 14
Evaluación de sensibilidad de *B. cinerea* a los productos comerciales 15
Evaluación de existencia de resistencia cruzada 15
Selección de cepas resistentes 16
Resultados y Discusión 18
Discusión general 40
Recomendaciones 41
Literatura citada 42
Anexo 1 50
Anexo 2 51

Índice de figuras

Figura 1. Condiciones de incubación de las plántulas de tomate con sus respectivos tratamientos……..16

Figura 2. Escala de severidad para evaluar los daños causados por *Botrytis cinerea* en plántulas de tomate……..……17

Figura 3. Imagen de la cuantificación de ADN genómico (en la primera línea) y del PCR (en la segunda línea) de los aislamientos considerados silvestres (1-Cascajal, 2-Calle Blancos) y los aislamientos considerados comerciales (3-San Martín, 4-Zarcero, 5-Tacares) correspondientes a *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinere*a), comparados contra el marcador molecular (M)……..……18

Figura 4. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a la línea base del fungicida fenhexamid en los aislamientos silvestres Cascajal y Calle Blancos en un periodo de cinco días……..……..….20

Figura 5. Muestra de crecimiento de conidios de *B. cinerea* en los tratamientos en plántulas de tomate……..32

Figura 6. Esporulación de *Botrytis cinerea* en palillos de bambú…….34

Figura 7. Organismos recuperados en el aislamiento de las plántulas de tomate enfermas: *Aspergillus* sp. (A y B) y *Paecilomyces* sp. (C)…….35

Índice de cuadros

Cuadro 1. Fungicidas registrados en Costa Rica en el cultivo de tomate para el combate de *Botrytis* sp…….……11

Cuadro 2. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida tebuconazol en aislamientos de *B. cinerea*……...22

Cuadro 3. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida pyraclostrobin en aislamientos de *B. cinerea*……23

Cuadro 4. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida iprodione en aislamientos de *B. cinerea*……24

Cuadro 5. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida pirimetanil en aislamientos de *B. cinerea*……..25

Cuadro 6. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida carbendazim en aislamientos de *B. cinerea*…….26

Cuadro 7. Factor de resistencia de los aislamientos de *B. cinerea* provenientes de áreas comerciales, respecto al aislamiento silvestre Cascajal…….29

Cuadro 8. Otros fungicidas a considerar para el combate de *Botrytis cinerea*…..37

Cuadro 9. Fungicidas para el combate de *Botrytis cinerea*, modo de acción y otros patógenos que combaten en el cultivo de tomate……..…….38

Resumen

Botrytis cinerea es un hongo necrotrófico conocido como moho gris, el cual ataca gran diversidad de cultivos y distintas partes de la planta. Además, posee diferentes vías para infectar los tejidos, de ahí que su combate a lo largo de los años ha sido de origen químico. Esto ha llevado a realizar estudios sobre su pérdida de sensibilidad a los fungicidas alrededor del mundo.

En este estudio se elaboró la línea base para el fungicida fenhexamid (aún sin registrar en el país), en dos aislamientos silvestres donde la concentración efectiva media fue de 0,17 y 0,31 ppm (no difirieron significativamente). Estos aislamientos se pueden utilizar como referencia para futuros estudios de pérdida de sensibilidad a este fungicida.

También se evaluó la sensibilidad de tres aislamientos comerciales de *B. cinerea* a los fungicidas carbendazim (Derosal 50 SC, BAYER), iprodione (Rovral Flo 50 SC, BAYER), pirimetanil (Scala 40 SC, BAYER), tebuconazol (Folicur 25 EW, BAYER) y pyraclostrobin (Regnum 25 EC, BASF), utilizando dosis de 0,0; 0,01; 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 50, 100, 200 y hasta 3000 ppm. Usando los parámetros de eficiencia de fungicidas *in vitro*, se encontró que los tres aislamientos comerciales han perdido sensibilidad al carbendazim, donde la concentración efectiva media (CE_{50}) que se obtuvo fue de 551,20; 1907,28 y 3149,25 ppm. Respecto a los demás fungicidas, estos aislamientos tienen una resistencia de baja a moderada.

Al estimar el factor de resistencia de estos aislamientos comerciales se encontró que los valores más altos corresponden al carbendazim (resistentes F.R.[1] >6000), uno de los aislamientos comerciales puede considerarse resistente al pirimetanil (F.R. 10,93), con el iprodione los tres aislamientos se clasifican como resistentes (F.R.: 2,13; 3,08; 5,85), y con el tebuconazol y el pyraclostrobin todos los aislamientos se mostraron sensibles.

Con estos resultados se puede decir que no es recomendable utilizar el carbendazim para el combate de *B. cinerea*. En el caso del pirimetanil y del

[1] Factor de resistencia.

iprodione, es recomendable utilizarlos dentro de un programa anti resistencia, ya que de acuerdo al F.R., se considera que el patógeno es resistente a estas moléculas, sin embargo, la CE_{50} indica que el hongo posee de baja a moderada resistencia.

Por último, se hizo la prueba *in vivo* de selección de cepas resistentes del patógeno utilizando el 25, 50, 75 y 100% de la dosis recomendada del fungicida fenhexamid. Se recuperaron conidios en las sub dosis de 25 y 50% con índices de incidencia y severidad mínimos. No se logró concluir que estas esporas sean resistentes ya que la sub dosificación puede facilitar que se dé un escape de la población del patógeno a la acción del fungicida, además, se requieren más estudios con mayor cantidad de aislamientos y de diferentes zonas, así como un seguimiento en el tiempo para poder observar cambios significativos de la exposición del hongo al fungicida.

Finalmente, se propone un esquema de rotación de fungicidas para el combate de *B. cinerea* en tomate tanto a nivel de campo como en invernadero, donde se hace énfasis en valorar las condiciones climáticas que favorezcan el desarrollo del patógeno, en estimar la incidencia y severidad de la enfermedad a través del monitoreo e inclusive si es posible, considerar la opción de utilizar algún organismo antagonista como agente de combate biológico, esto con el fin de no depender estrictamente de un manejo químico calendarizado.

Introducción

El género *Botrytis* comprende varias especies. Sin embargo, la más conocida y reportada como fitopatógeno en gran cantidad de cultivos y diversos climas es *B. cinerea* (Collado et al. 2000, Mirzaei et al. 2008). En nuestro país, el Servicio Fitosanitario del Estado (2009) realizó una compilación de enfermedades en cultivos agrícolas donde se indica que *B. cinerea*, conocido como moho gris, ataca diversos cultivos como ornamentales, arveja, ayote, berenjena, café, lirio, cebolla, chile, cítricos, fresa y tomate, entre muchos otros, por lo que no se le considera como un patógeno selectivo.

Este hongo pertenece a la clase Hyphomycetes del orden de los Moniliales, donde su estado teleomórfico se conoce como *Botryotinia fuckeliana*. Se reproduce de forma asexual y produce sus conidios en los extremos de los conidióforos ramificados y es considerado como un parásito necrotrófico, ya que para infectar el tejido de la planta previamente provoca su muerte (Ribera 2007).

En cuanto a los síntomas, estos pueden mostrarse de diferentes formas según el tejido de la planta que esté siendo atacado por el hongo, por ejemplo, pueden haber pudriciones blandas y posteriormente aparecen las masas grises de conidios ya sea en hojas, tallos o inclusive en frutos (Williamson et al. 2007). En el caso del tomate, este se ve afectado por el hongo más comúnmente a nivel de tallos y flores, donde los síntomas se observan como lesiones de aspecto acuoso, generalmente asociadas a tejido muerto, que posteriormente se tornan de color café grisáceo, desarrollando esporas de color gris (Sandoval 2004). Williamson et al. (2007) indican que cuando el tomate ha sido producido en invernadero, la actividad de poda ocasiona que los mayores daños por el patógeno se observen a nivel de tallo y que con el tiempo llega a descomponerlo.

Para que se dé la germinación de las esporas se requiere que haya una humedad relativa superior al 95% y temperaturas entre los 15 y 25°C (ya que arriba o debajo de éstas la esporulación puede ser limitada o nula), siendo 20ºC la temperatura óptima (Latorre et al. 2002, Davidson y Krysinska-Kaczmarek 2007). Se debe tomar en cuenta que la presencia de luz no es determinante ya que se

puede dar la esporulación aún en condiciones de oscuridad (Williamson et al. 2007).

Con respecto a su capacidad de sobrevivencia, se dice que puede permanecer como micelio o conidios en restos de cosecha, desarrollando esclerocios dentro de tejidos senescentes o maduros, que le permiten estar en reposo hasta que el ambiente propicie su crecimiento y posterior ataque al hospedero, o también se activa por la senescencia de los tejidos; incluso puede actuar como un patógeno secundario. Posteriormente, puede ser dispersado por medio de las gotas de agua y por las corrientes de aire (Collado et al. 2000, Williamson et al. 2007).

Dentro de las estrategias que *B. cinerea* posee para causar infección se encuentran: penetrar a través de heridas o aberturas naturales, la producción de enzimas para atravesar la cutícula (cutinasa), enzimas hidrolíticas extracelulares (endo y exopoligalacturonasas, pectin-metil-esterasa, pectin-liasas), enzimas degradadoras de la membrana celular (proteasas) o de la pared celular, producción de toxinas que favorecen la muerte celular, inclusive la producción de enzimas que detoxifican los diferentes tipos de fitoalexinas producidos por la planta en su defensa contra el hongo (Benito et al. 2000).

En el caso del cultivo de tomate, *Botrytis* es capaz de descomponer metabolitos secundarios producidos por esta planta como la α-tomatina, que tiene propiedades anti fúngicas y se produce en las hojas, pero disminuye su concentración cuando se da la maduración de frutos. Su función en la planta es inhibir el crecimiento del micelio de este patógeno pero no la germinación de conidios. Sin embargo, *B. cinerea* descompone la α-tomatina en tomatidina, facilitando así su entrada en los tejidos, antes que disminuya su concentración (van Barlen et al. 2007), de ahí que no sea determinante el estado fenológico de la planta porque el hongo siempre tendrá herramientas para provocar la infección en el tejido.

Otra explicación del por qué *Botrytis* causa infección en las plantas de tomate, es que este patógeno puede funcionar como un antagonista en la activación de señales entre el ácido jasmónico y el ácido salicílico (funcionan contra patógenos necrotróficos y patógenos biotróficos respectivamente) , donde

el hongo produce un exopolisacárido, que actúa como un inductor de la vía del ácido salicílico y de esta forma es un antagonista de la vía de señalización del ácido jasmónico, permitiendo así que el hongo se desarrolle en el tomate (El Oirdi et al. 2011).

Conociendo los mecanismos de los que dispone este patógeno sobre su hospedero, se puede entender por qué el hongo puede evadir la acción de los fungicidas, especialmente cuando las aplicaciones de un mismo ingrediente activo son sucesivas, en ausencia de una apropiada rotación de los fungicidas. Es por esto que con la introducción de un nuevo ingrediente activo, se busca otra herramienta para combatir al hongo y una alternativa más de control químico.

Objetivo general

Proponer un plan de rotación de fungicidas para el combate de *Botrytis cinerea* en tomate, basado en la sensibilidad del patógeno a los diferentes fungicidas disponibles en el mercado.

Objetivos específicos

- Elaborar una línea base para el nuevo ingrediente activo fenhexamid.

- Determinar *in vitro* la sensibilidad de los diferentes fungicidas comerciales utilizados para el combate de *B. cinerea* en tomate mediante la evaluación del crecimiento del micelio (diámetro de colonia).

- Realizar la selección de cepas resistentes *in vivo* de *Botrytis cinerea* al fenhexamid utilizando plántulas de tomate como hospedero.

- Proponer un esquema de rotación de fungicidas para el combate de *B. cinerea* en tomate.

Revisión bibliográfica

Resistencia a fungicidas

La resistencia a fungicidas es la pérdida de sensibilidad de la población de un patógeno a partir de cambios genéticos ocasionados por la presión de selección consecuencia del uso continuo de un mismo fungicida o fungicidas con el mismo mecanismo de acción (Brent y Hollomon 2007a, Arauz 2011).

La presión de selección que se ejerce sobre la población del patógeno puede ser disruptiva (o monogénica) o de tipo direccional. La primera indica que existe una sub población resistente que con el tiempo se vuelve dominante (esta se hace notar cuando el aumento de la dosis de fungicida se vuelve ineficaz); en el caso de la selección direccional la pérdida de sensibilidad tiene un comportamiento gradual, por lo que se requiere una mayor cantidad de tiempo para que se presente la resistencia al fungicida (Arauz 2011).

En el tema de resistencia a fungicidas existe lo que se conoce como resistencia cruzada, la cual se manifiesta cuando el uso de fungicidas con el mismo mecanismo de acción provoca que se desarrolle resistencia a otro fungicida (Arauz 2011). Por otro lado, la resistencia cruzada negativa se da cuando un factor de resistencia genera resistencia a un fungicida, pero al mismo tiempo aumenta la sensibilidad a otro fungicida (Dekker 1995). Además, existe la resistencia múltiple, la cual se manifiesta en mutaciones a partir de la selección que causa la exposición a fungicidas con diferente mecanismo de acción, el caso más conocido es la resistencia de *B. cinerea* a los benzimidazoles y dicarboxamidas (Brent y Hollomon 2007a).

Se dice que los factores que influyen en la velocidad en que se desarrolle la resistencia en la población de un patógeno a un fungicida son: la base genética de resistencia (monogénica o poligénica); la adaptabilidad de las cepas resistentes en presencia o ausencia del fungicida; la naturaleza del patógeno y de la enfermedad (como la alta esporulación de patógenos que infectan partes aéreas de la planta); y la presión de selección hecha por el fungicida, ya sea por la dosis aplicada así como su frecuencia de aplicación (Dekker 1995).

En el caso de *Botrytis cinerea*, el FRAC (Fungicide Resistance Action Committee 2010) incluye a este hongo dentro de una lista de organismos fitopatógenos con un alto riesgo de resistencia a fungicidas en diferentes cultivos, ya sea a nivel de laboratorio o de campo, donde recomiendan que deben emplearse estrategias para el manejo de la resistencia del mismo. Algunas características que hacen que sea clasificado en la categoría de alto riesgo son la producción diferentes tipos de enzimas, diversidad de hospedantes, la alta producción de conidios y formación de estructuras de resistencia.

El tema de resistencia a fungicidas no es nuevo. Staub y Sozzi (1984) señalan desde hace más de dos décadas los motivos por lo que es necesario realizar el monitoreo de resistencia: primero, se deben realizar estudios durante la introducción de un nuevo fungicida mediante la obtención de la línea base; segundo, analizar los productos que han fallado en el control de la enfermedad y que puedan generar resistencia al patógeno luego de su introducción al mercado; tercero, darle seguimiento a la resistencia una vez aplicadas las estrategias de anti resistencia a fungicidas y por último, determinar si se estabilizó la resistencia entre un año y otro o en caso que se retire el fungicida del mercado. Esto funciona para estudiar el comportamiento de la población del patógeno en el tiempo y así poder implementar las medidas necesarias para evitar la pérdida de sensibilidad.

Fungicidas usados para el combate de *Botrytis cinerea*

A lo largo de los años, los fungicidas usados comúnmente contra este patógeno han sido de los grupos de los benzimidazoles y dicarboxamidas, sin embargo, muy cerca de su introducción al mercado en los años setenta y ochenta, se encontró la resistencia del hongo a la acción de estos (Wang et al. 1986, Raposo et al. 1996, Vallejo et al. 2003). A continuación se explica cómo funcionan los fungicidas utilizados en este estudio.

En el grupo de los benzimidazoles se encuentra el carbendazim, el cual afecta la división celular, específicamente en el ensamblaje de la β-tubulina en la mitosis. Este fungicida es sistémico, de acción protectora y curativa, y es absorbido por la planta de forma foliar y por la raíz, moviéndose principalmente a

través del xilema. Junto a otros fungicidas de este grupo fue desarrollado a finales de los años sesenta, siendo de los primeros fungicidas sistémicos de amplio espectro. A bajas concentraciones inhiben el crecimiento de las hifas y distorsiona los tubos germinativos de *B. cinerea*, pero no previene la germinación de los conidios (EDIFARM 2008, FRAC[2] 2007, Leroux 2007). Se ha encontrado que existe resistencia cruzada dentro del grupo de benzimidazoles, y su resistencia se atribuye a la mutación en un gen, donde un cambio ligero en la tubulina conlleva a la reducción de la afinidad al carbendazim, y el FRAC lo clasifica en la categoría de alto riesgo de resistencia (Davidse e Ishii 1995, Delp 1995, FRAC 2012).

En el grupo de las dicarboxamidas se encuentra el ingrediente activo iprodione, el cual funciona por contacto con acción protectante y curativa, inhibe la germinación de esporas y el crecimiento del micelio; afecta la proteína histidina quinasa en la transducción de la señal osmótica (Tomlin 2009). Este fungicida se introdujo al mercado a inicios de los años setenta; sin embargo, a finales de esa década se encontró que *B. cinerea* desarrolló resistencia a dicho grupo de fungicidas, además, se reportó posteriormente la resistencia cruzada entre el grupo de las dicarboxamidas, por lo que el FRAC lo clasifica en la categoría de riesgo de resistencia de medio a alto. Se menciona que no hay resistencia cruzada entre benzimidazoles y dicarboxamidas, pero si esta existe fue porque inicialmente se usaron los benzimidazoles, ya que los aislamientos de *B. cinerea* resistentes a este grupo pueden permanecer en el tiempo de forma estable y adaptable en el ambiente aun cuando se descontinúe su uso. Sin embargo, se dice que no es común encontrar aislamientos resistentes a ambos grupos de fungicidas y para detectarlo se requieren realizar frecuencias de resistencia (Katan 1982, Pommer y Lorenz 1995, Yourman et al. 1999, FRAC 2012).

El fungicida pirimetanil forma parte del grupo químico de las anilinopirimidinas, el cual se caracteriza por inhibir la síntesis de aminoácidos y proteínas, específicamente en la biosíntesis de la metionina. A nivel *in vitro* inhibe la elongación del tubo germinativo, al aplicarlo en la planta su modo de acción es de contacto con acción translaminar, donde inhibe la secreción de enzimas hidrolíticas que forman parte del proceso de infección (Leroux 2007, Tomlin 2009).

[2] Fungicide Resistance Action Committee.

Datos del FRAC indican que *Botrytis* es resistente a este fungicida y le dan la categoría media de riesgo de resistencia, además que se reporta resistencia cruzada con los fungicidas cyprodinil y mepanipyrim (no registrados en el país[3]), que pertenecen al grupo de anilinopirimidinas, más no hay resistencia cruzada con benzimidazoles y dicarboxamidas (Petsikos et al. 2003, Ulmer 2003, FRAC 2012).

El fungicida pyraclostrobin pertenece al grupo de inhibidores de quinol (estrobirulinas), en el grupo químico de los metoxiacrilatos. Al contacto con la planta, tiende a mantenerse sobre o dentro de la cutícula, luego tiene un movimiento translaminar en las hojas inclusive a través del sistema vascular. Su mecanismo de acción consiste en interferir con la respiración en la producción de energía en las células, a través del bloqueo de electrones al sitio de oxidación del quinol en el complejo del citrocromo III bc1, impidiendo la formación de ATP. Según el FRAC, se encuentra clasificado como un fungicida de alto riesgo de resistencia, con resistencia cruzada entre el grupo de fungicidas QoI (inhibidores de quinol) (Agrios 2005, FRAC 2012).

Dentro de los fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol, los inhibidores de la desmetilación (DMI por sus siglas en inglés) se encuentra el grupo de los triazoles donde se ubica el tebuconazol. Este fungicida actúa sobre el sitio 14α de la desmetilación, en la planta penetra en la cutícula y posteriormente un compuesto puede ser translocado por vía apoplasto o simplasto, pero esta última es con menor frecuencia. Para efectos de estudio, se menciona que este ingrediente activo es efectivo contra *Botrytis cinerea* en el cultivo de uva (Kuck et al. 1995, Arauz 2011). En el tema de resistencia, De Waard (1994) señala que para detectar la resistencia a los fungicidas DMI es necesario contar con estudios previos de sensibilidad, ya que su desarrollo es muy lento. Actualmente el FRAC lo ubica en la categoría media de riesgo de resistencia (FRAC 2012).

Otro fungicida que funciona para el combate de *Botrytis* es fenhexamid, que pertenece al grupo químico hidroxinanilida dentro de los inhibidores de la síntesis del esterol clase III. Este ingrediente activo actúa sobre la enzima 3-

[3] Consulta de insumos registrados en el SFE 2012.

ketoreductasa en la posición C4 en la desmetilación del ergosterol inhibiendo la elongación del tubo germinativo y el crecimiento de micelio; funciona como un protectante y no es translocado en la planta. Se menciona que tiene un desarrollo de riesgo de resistencia entre bajo y moderado, por lo que se requiere un manejo adecuado para evitar su resistencia (Tomlin 2009, FRAC 2012).

Estudios sobre la resistencia de Botrytis en diversos países

En China, Zhang et al. (2010) encontraron tres tipos de resistencia a benzimidazoles, las cuales las atribuyen a una mutación puntual en los genes que codifican para la β-tubulina, que resulta en una frecuencia alterada de aminoácidos en el punto de unión. También, que estas mutaciones pueden tener efectos pleiotrópicos sobre el crecimiento de hongos, ya sea a altas o bajas temperaturas. Por ejemplo, encontraron que los aislamientos mantenidos durante 10 días en platos enmendados con una dosis de 1mg/L de carbendazim, uno de los tres aislamientos resistentes no presentó crecimiento de micelio a 10°C y ninguno creció a los 34°C, pero entre los 16 y 28°C todos lograron el mismo crecimiento.

Kretschmer et al. (2009) mencionan que en Francia y Alemania vigilan la resistencia de *B. cinerea* en los viñedos comerciales tratados con fungicidas, a partir de una migración de Francia hacia Alemania de cepas de este hongo con resistencia múltiple (dos de ellas con resistencia a anilinopirimidinas), ya que con el tiempo, han observado aumentos en las poblaciones de tres fenotipos de *B. cinerea* con resistencia múltiple. El primer fenotipo de las cepas aisladas se dice que es resistente a fludioxonil, ciprodinil y tolnaftate, el segundo fenotipo mostró resistencia a fenhexamid, tolnaftate, cicloheximida y ciprodinil; el último fenotipo mostró los más altos niveles y amplios espectros de resistencia contra los fungicidas utilizados, entre estos fenhexamid, carbendazim, boscalid, iprodione y tebuconazol.

En España, Vallejo et al. (2003) encontraron tres fenotipos resistentes a benzimidazoles (al benomil y al carbendazim en diferentes grados) y una leve resistencia a dicarboxamidas en el cultivo de fresa.

Por otro lado, en viñedos de Alemania y Francia se han obtenido aislamientos del hongo con diferentes niveles de resistencia a una hidroxianilida, específicamente a fenhexamid, el cual inhibe a la enzima 3-ketoreductasa durante la desmetilación del C-4 en la biosíntesis del ergosterol. Esos niveles de resistencia se atribuyen a cambios en la secuencia del gen que codifica la enzima 3-ketoreductasa, donde se demostró que al introducir un alelo de resistencia en el sitio de expresión de dicha enzima en cepas sensibles al fungicida por medio de un plásmido, se llega a expresar la resistencia al fenhexamid (Fillinger et al. 2008).

En Israel la resistencia encontrada entre los aislamientos de *B. cinerea* en tomate fue mayor para dicarboxamidas, benzimidazoles, muy bajas cantidades para pirimetanil, y raramente para fenhexamid. La resistencia de los aislamientos fue mayor en aquellas muestras tomadas de invernaderos en comparación con muestras tomadas a campo abierto, de esta forma, al ser un ambiente cerrado la selección hacia esporas resistentes es mayor (International Symposium on Tomato Disease 2009).

En Uruguay se evaluó la sensibilidad a 169 aislamientos de este hongo en arándanos, tomates, fresas, uvas, rosas y eucalipto. El 72% de los aislamientos presentó resistencia al carbendazim (concentración mínima inhibitoria-CMI-mayor a 128 ppm), con el iprodione en un 65% la CMI fue menor o igual a 2 ppm y un 25% mayor a 16 ppm, y con el pirimetanil el 68% la CMI fue menor a 1 ppm y un 30% mayor a 8 ppm (Gepp et al. 2012).

En nuestro país, los productos registrados en el Servicio Fitosanitario del Estado para el combate de *Botrytis* spp. en tomate se pueden ver en el cuadro 1. Además, otros ingredientes activos que se encuentran registrados para el combate de este patógeno son el imazalil y el tiabendazol que tienen uso post cosecha.

Cuadro 1. Fungicidas registrados en Costa Rica en el cultivo de tomate para el combate de *Botrytis* sp.

Grupo químico	Ingrediente activo	Nombre comercial registrado
Benzimidazoles	carbendazim	Curacarb 50 SC, Rodazim 50 SC
	benomil	Agrocom Benomil 50 WP, Agrozamoranos Benomil 50 WP, As Myl 50 WP, Benlate 50 WP, CAFESA Benomil 50 WP, CASAGRI Benomil 50 WP
	metil tiofanato	Cycosin 50 SC, Tiofanil 50 SC
Dicarboxamidas	iprodione	Ippon 50 SC
Anilinopirimidinas	pirimetanil	Scala 40 SC

(Servicio Fitosanitario del Estado 2012).

En Costa Rica no hay estudios sobre el comportamiento de la resistencia de *B. cinerea* hacia fungicidas, de ahí que se realiza este estudio con el fin de conocer la efectividad actual de algunos de los fungicidas mencionados en el combate de este patógeno.

Metodología

Localización

El trabajo se divide en dos procesos, *in vitro* e *in vivo*, donde ambos se llevaron a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica.

Recolección del hongo

Se recolectó el hongo *Botrytis cinerea* en frutos de frambuesas silvestres (*Rubus idaeus*) provenientes de Cascajal de Coronado y flores de orquídeas de Calle Blancos de Goicoechea, ambos sin haber estado expuestos a la acción de fungicidas, que posteriormente se denominaron aislamientos silvestres. Así mismo, se obtuvo hongo de flores de tomate de las zonas productoras de San Martín de Heredia, Zarcero y Tacares de Grecia, que se designaron como aislamientos comerciales.

Una vez recolectadas las frambuesas, las flores de orquídeas y de tomate, se colocaron en condiciones de cámara húmeda, que consistió en recipientes plásticos con papel toalla húmeda en su interior y sobre ésta, un trozo de papel aluminio para evitar que el material vegetal entre en contacto con el papel toalla húmedo. Este sistema se mantuvo a 22ºC entre dos y cinco días. Posteriormente, del tejido enfermo se extrajeron los conidios de *B. cinerea*.

Pruebas moleculares

Para confirmar que los aislamientos silvestres y comerciales obtenidos correspondían a *Botrytis cinerea*, se realizó la identificación molecular en el Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fitoprotección del CIPROC, para lo cual se extrajo ADN a partir de micelio fresco de aislamientos de *B.*

cinerea, utilizando el método CTAB (Trout et al. 1997) con algunas modificaciones como la adición de β-mercaptoetanol.

A partir del ADN extraído de cada uno de los aislamientos, se realizó el proceso de reacción en cadena de la polimerasa conocido como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction) con cebadores ITS4 e ITS5, que cubren la secuencia parcial del ARN del gen ribosomal 18S, el espaciador interno transcrito 1, el ARN del gen ribosomal 5.8S, el espaciador interno transcrito 2 y la secuencia parcial del ARN del gen ribosomal 28S.

La PCR se realizó en un volumen total de 25 µl. Para cada reacción se utilizó una concentración final de 1x, 12,25 µl de H_2O ultra pura (tomada del sistema de agua ultra pura marca MILLIPORE, modelo Milli-Q PLUS), 2,5 µl Dream Buffer (10X) (FERMENTAS), 2,5 µl de dNTP (2mM) (FERMENTAS), 1,25 µl de cada cebador (10 µM) (Invitrogen), 0,25 µl de Dream TAQ ADN polimerasa (FERMENTAS) y 2 µl de ADN. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca Eppendorf AG modelo 22331 Hamburg y el perfil térmico de la reacción fue: desnaturalización inicial a 96ºC durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 96ºC durante 1 minuto, anillamiento a 56ºC por 1 minuto, extensión a 72ºC por 2 minutos, seguidos de una extensión final de 72ºC durante 10 minutos.

Los resultados fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8%), donde el tamaño de producto de PCR obtenido se estimó comparándolo con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb). La secuenciación se realizó al producto purificado de PCR a una concentración de 50 ng/µl y los resultados de la secuenciación (bilaterales) se alinearon utilizando el programa BioEdit (Hall 1999). Los alineamientos se compararon por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Banco de Genes del “Nacional Center for Biotechnology Information” (NCBI), el cual indica el porcentaje en que coincide el aislamiento en estudio con la secuencia predeterminada del patógeno en la base de datos.

Trabajo *In vitro*

Aislamiento del patógeno

Los conidios de *B. cinerea* que crecieron sobre el tejido enfermo, fueron transferidos con ayuda de una aguja de disección a platos Petri con medio de cultivo PDA (250g papa, 10g de dextrosa y 20 g de agar por litro) más 1 mL/L ácido láctico al 50%. De estos platos se extrajeron los discos de micelio con un sacabocados (1 cm de diámetro) para la evaluación de sensibilidad a los fungicidas. La edad de los discos de micelio fue de 4 días.

Por otro lado, se hizo una suspensión de conidios de 10^3 esporas/mL solamente de los aislamientos silvestres, de la que se tomaron 100 µl y se colocó en platos Petri con medio agar-agua, y se mantuvieron en incubadora marca YIH DER modelo LE-509D a 20°C durante 6 horas (dos repeticiones por aislamiento). Una vez cumplido este tiempo, se tomó una espora germinada del medio agar-agua y se colocó en el medio de cultivo de papa-dextrosa-agar con ácido láctico al 50% (1 mL/L) para hacer un total 10 cultivos monospóricos por cada aislamiento, seleccionando de cada uno de ellos, el cultivo con el mejor crecimiento y sanidad para ser utilizados en las evaluaciones posteriores.

Elaboración de la línea base de sensibilidad al fenhexamid

Para este procedimiento, se utilizaron cultivos monospóricos de los aislamientos silvestres, ambos con edad de 4 días. Las concentraciones del fungicida fenhexamid que se utilizaron fueron de 0; 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0 ppm (4 repeticiones por tratamiento). Una vez que el medio de cultivo se enmendó con fungicida, se colocó en el plato Petri un disco de micelio proveniente del cultivo monospórico y se mantuvo a 20ºC en oscuridad. Cuando los tratamientos con 0 ppm cubrieron la totalidad del medio de cultivo, se procedió con la medición del diámetro de colonia para todos los tratamientos.

Evaluación de sensibilidad de *B. cinerea* a los productos comerciales

Se evaluó la sensibilidad de *B. cinerea* a los productos comerciales Derosal 50 SC (carbendazim), Rovral Flo 50 SC (iprodione), Scala 40 SC (pirimetanil), Regnum 25 EC (pyraclostrobin) y Folicur 25 EW (tebuconazol).

Se prepararon soluciones madre de cada uno de los fungicidas, y luego se realizaron las diluciones (con agua destilada estéril) necesarias para obtener las concentraciones finales a evaluar (en medio PDA), las cuales fueron de 0,0; 0,01; 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 50, 100 y 200 ppm (4 repeticiones por tratamiento). En el caso del fungicida Derosal 50 SC se aumentaron concentraciones a los platos Petri que contenían aislamientos comerciales con el fin de encontrar un valor preciso de concentración efectiva media (CE_{50}), las cuales fueron de 150 a 650 ppm para el aislamiento San Martín, de 1300 a 1900 ppm para el aislamiento Tacares y de 2200 a 3000 ppm para el aislamiento Zarcero.

Evaluación de existencia de resistencia cruzada

Para este procedimiento, se evaluó el fungicida fenhexamid en los aislamientos comerciales, utilizando las concentraciones empleadas en la elaboración de la línea base. Posteriormente, se calculó el factor de resistencia (concentración de la cepa de campo entre la concentración de la cepa silvestre) de los aislamientos comerciales contra el aislamiento silvestre Cascajal para cada uno de los fungicidas de este estudio.

Trabajo *in vivo*

Selección de cepas resistentes

Se realizó una prueba preliminar para definir la concentración de fenhexamid en la que *B. cinerea* crece luego de la aplicación del fungicida. Para esto, se tomaron plántulas de tomate con dos hojas verdaderas desarrolladas (4 repeticiones de 12 plantas), usando como sustrato suelo pasteurizado con granza (60% suelo, 40% granza), donde cada repetición se colocó dentro de una bolsa plástica en cámara húmeda. Para evitar el contacto directo de las plántulas con la bolsa, cada repetición tenía cuatro palillos de bambú previamente autoclavados. Posteriormente, los tratamientos se mantuvieron en condiciones de 10 horas luz/14 horas oscuridad a 20ºC (figura 1) en la incubadora mencionada anteriormente.

Figura 1. Condiciones de incubación de las plántulas de tomate con sus respectivos tratamientos.

Los tratamientos consistían de las concentraciones 25, 50, 75 y 100% de la dosis recomendada en campo para fenhexamid y agua ultra pura estéril para el testigo. Todos los tratamientos fueron asperjados utilizando un aerógrafo marca Goni modelo 315. Luego de 24 horas de aplicado el fungicida se asperjó sobre las plantas el inóculo proveniente del aislamiento monospórico de Cascajal a una concentración $1x10^6$ esporas/mL.

Luego de la inoculación, se hizo la evaluación 11 días después, donde se contabilizó la cantidad de plantas con lesiones causadas por *B. cinerea* y su severidad. Para esto último, se utilizó la siguiente escala de severidad con los siguientes porcentajes de daño: 0 es una planta sana, 1:10% de daño, 2: 20% de daño, 3:40% de daño, 4: 60% de daño y 5: ≥80% de daño (figura 2).

Figura 2. Escala de severidad para evaluar los daños causados por *Botrytis cinerea* en plántulas de tomate.

Una vez que se determinó la concentración en la que creció el patógeno luego de la aplicación del fungicida, se tomaron los conidios que crecieron sobre las lesiones con una aguja de disección y se pusieron en medio PDA. Con estos conidios se inoculó un nuevo grupo de plántulas de tomate en la concentración en que crecieron previamente.

Todo el material vegetal, palillos de bambú y medio de cultivo que estuvo en contacto con el inóculo, fueron autoclavados antes de ser desechados, esto para evitar el riesgo de liberación de esporas resistentes.

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis estadístico de separación de medias al factor de resistencia y la concentración media efectiva para inhibir el 50% del crecimiento del hongo utilizando el programa estadístico InfoStat, versión 2010e.

Resultados y Discusión

Pruebas moleculares

El ADN genómico se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa, donde en la figura 3 (parte superior) se observó una banda mayor en los aislamientos 1, 3 y 4 y una de menor tamaño en los aislamientos 2 y 5. Esto indica que hubo mayor cantidad de ADN genómico en unos aislamientos que en otros, probablemente debido a una deficiente trituración del micelio (afectando la liberación de los ácidos nucleicos), por una pérdida de precipitado de ADN o por la presencia de impurezas como proteínas. Al comparar los productos de PCR de cada uno de los aislamientos utilizando los cebadores ITS4 e ITS5, se obtuvo un tamaño de banda cercano a los 700 pares de bases, tal como se aprecia en la siguiente figura.

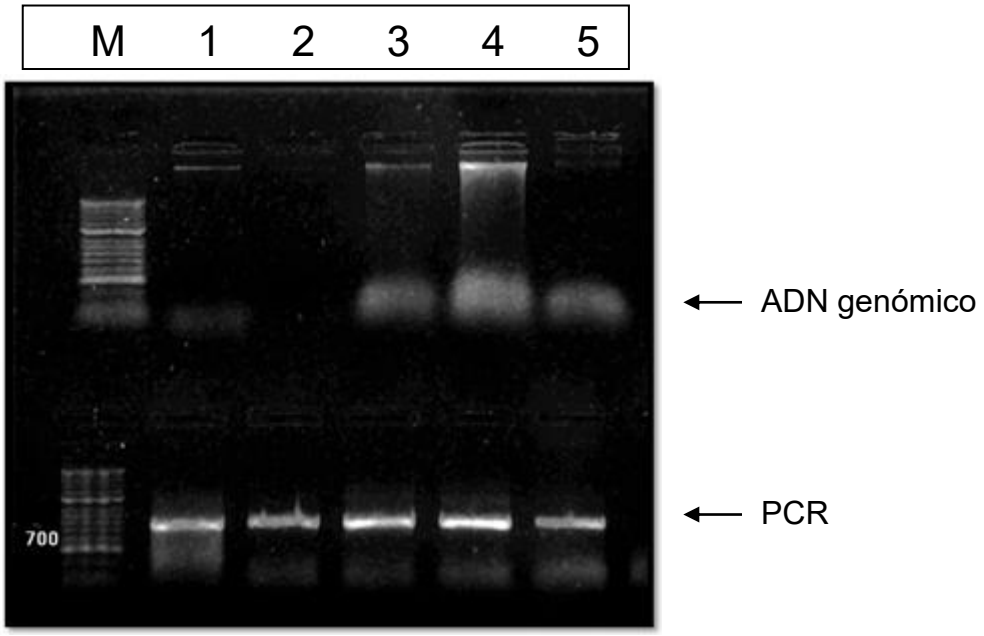


Figura 3. Imagen de la cuantificación de ADN genómico (en la primera línea) y del PCR (en la segunda línea) de los aislamientos considerados silvestres (1-Cascajal, 2-Calle Blancos) y los aislamientos considerados comerciales (3-San Martín, 4-Zarcero, 5-Tacares) correspondientes a *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*), comparados contra el marcador molecular (M).

A partir de la secuenciación del producto de PCR se obtuvo un alineamiento correspondiente a las secuencias bilaterales de cada una de las muestras: la cantidad de pares de bases obtenidas de la secuenciación de los aislamientos considerados silvestres Cascajal y Calle Blancos fue de 537 pb y 505 pb respectivamente, y de la secuenciación de los aislamientos comerciales San Martín, Zarcero y Tacares fue de 537 pb, 512 pb y 508 pb respectivamente. Al realizar el alineamiento de todos los aislamientos de *B. cinerea*, no se observó variabilidad genética entre los mismos (anexo 1).

Posteriormente, al hacer la comparación de los alineamientos de cada aislamiento en el programa BLAST, se obtuvo que al analizar un total de 537 pb (alineamientos de mayor tamaño) había 100% de similitud con *Botryotinia fuckeliana*, el cual es el estado teleomórfico de *Botrytis cinerea* (estado anamórfico), lo cual ocurrió con el mismo resultado para los aislamientos restantes. Esto quiere decir que tanto los aislamientos silvestres como comerciales correspondieron ser el patógeno *B. cinerea*.

Elaboración de la línea base de sensibilidad al fenhexamid

Los valores de la concentración efectiva que se obtuvieron en la elaboración de la línea base para inhibir el 50% de crecimiento de los aislamientos silvestres fueron de 0,17 ppm para el aislamiento Cascajal y 0,31 ppm para el aislamiento Calle Blancos. Estos valores no difirieron estadísticamente de forma significativa entre sí. El porcentaje de reducción de ambos aislamientos se puede observar en la figura 4.

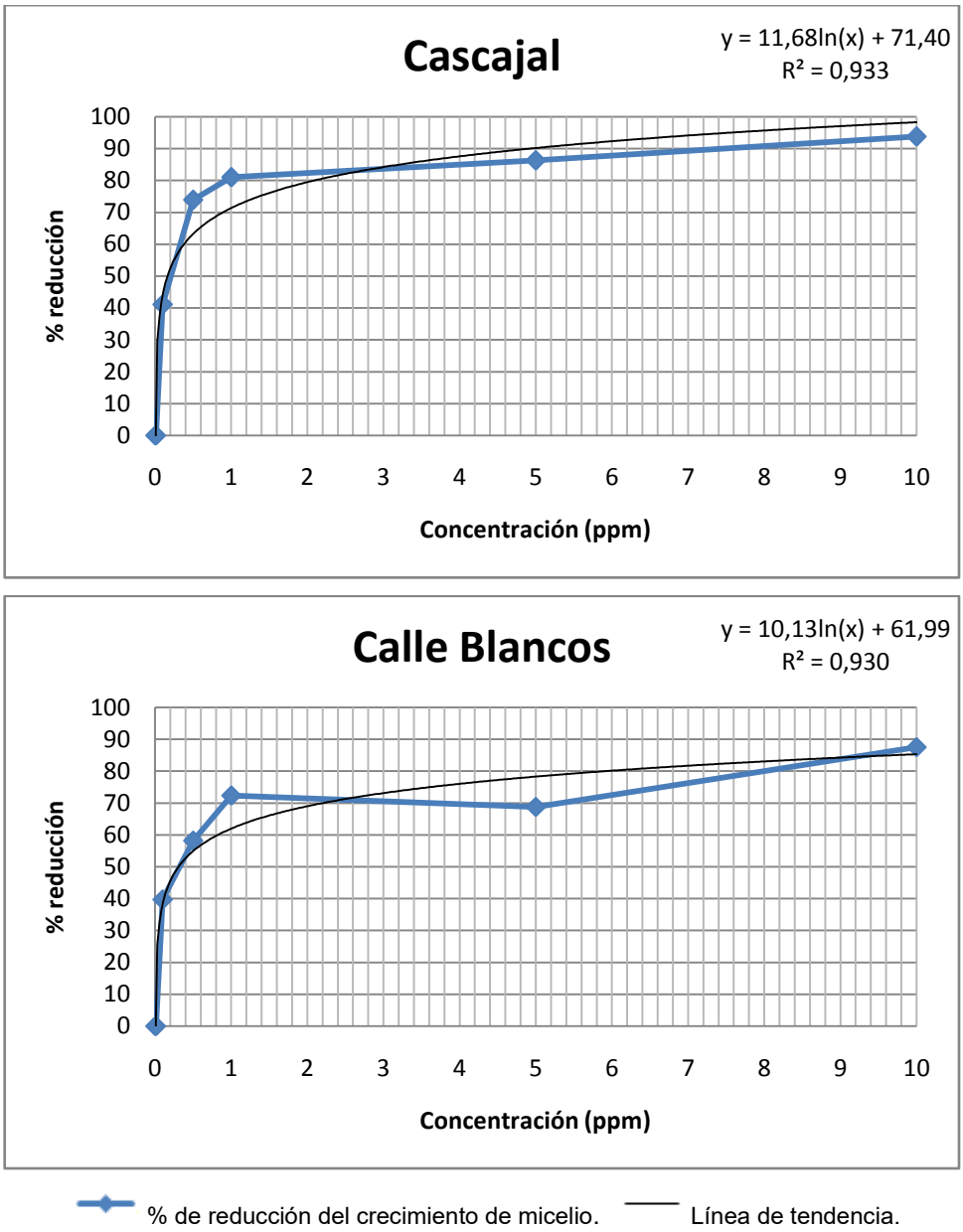


Figura 4. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a la línea base del fungicida fenhexamid en los aislamientos silvestres Cascajal y Calle Blancos en un periodo de cinco días.

En estudios iniciales realizados por Bayer CropScience para la determinación de la línea base de fenhexamid, se utilizó un umbral de 0,2 ppm para la clasificación de los aislamientos según su sensibilidad, donde a través de cuatro años de estudio se encontró que entre 94 y 96% de los aislamientos analizados mostraron una concentración efectiva menor al 0,2 ppm, y no

encontraron grandes cambios en la sensibilidad, inclusive ocho años después de tratamientos continuos con este fungicida (Suty et al. 1999).

Otros estudios realizados por esta misma empresa en donde evaluaron el efecto del fungicida fenhexamid en el desarrollo de *Botrytis cinerea* a nivel *in vitro*, encontraron que para inhibir los tubos germinativos y el crecimiento de micelio se requieren dosis menores a 0,1 ppm. Por otro lado, para inhibir la germinación de conidios la dosis debe ser mayor a 10 ppm, y aunque la germinación puede que no se inhiba por completo, pueden ocurrir daños a nivel morfológico en los tubos germinativos, impidiendo así causar infecciones en su hospedero (Hänßler y Pontzen 1999).

En China se encontró que la concentración efectiva que inhibió el 50% del crecimiento del hongo fue de 0,36 ppm de fenhexamid (Zhang et al. 2007). Por otro lado, Weber y Hahn (2011) evaluaron este fungicida en aislamientos altamente sensibles provenientes de Alemania, donde el valor de CE_{50} fue de 0,14 ppm.

Con los datos obtenidos de CE_{50} de la inhibición del crecimiento de micelio en los aislamientos silvestres Cascajal y Calle Blancos, se puede observar que estos son similares a los valores de los estudios mencionados, por lo que estos resultados se pueden tomar como referencia en futuras pruebas de monitoreo de sensibilidad de *Botrytis cinerea* ante el fungicida fenhexamid, con el fin de estudiar la respuesta de sensibilidad del hongo a esta molécula a través del tiempo.

Evaluación de sensibilidad a los productos comerciales

Inicialmente, para poder determinar cuáles aislamientos pueden considerarse como silvestres para el estudio, se utilizó como referencia el ingrediente activo carbendazim por ser el fungicida con mayor antigüedad a nivel comercial. En ese momento se observó que los aislamientos Cascajal y Calle Blancos requerían dosis más bajas que los aislamientos San Martín, Zarcero y Tacares para inhibir el crecimiento del hongo, de ahí que fueron considerados como aislamientos silvestres.

A continuación, se describen los resultados obtenidos de cada ingrediente activo y posteriormente se discuten los valores obtenidos:

- Sensibilidad a Folicur 25EW (tebuconazol).

Con el ingrediente activo tebuconazol, se observó que el porcentaje de reducción del crecimiento de micelio fue mayor al 50% a dosis menores o iguales a 2 ppm, tanto en aislamientos silvestres como comerciales (cuadro 2).

En este caso, la efectividad del fungicida fue muy alta, ya que requirió de dosis muy bajas para inhibir el crecimiento del hongo. Una posible razón de esto es que en la lista de fungicidas autorizados por el Servicio Fitosanitario del Estado, éste no se encuentra registrado para ser utilizado en el cultivo de tomate. Es usado principalmente contra *Mycosphaerella fijiensis* en banano y, en menor medida, para otros patógenos en arroz y café. Sin embargo, se incluyó dentro del análisis por sugerencia de Bayer CropScience.

Cuadro 2. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida tebuconazol en aislamientos de *B. cinerea*.

tebuconazol (ppm i.a.)					
Aislamiento	Cascajal	Calle Blancos	San Martín	Zarcero	Tacares
CE_{50}	1,23c	0,54ab	0,41a	0,68b	2,08d

i.a.: ingrediente activo.
CE_{50}: concentración efectiva media.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0,05$) según prueba LSD Fisher.

- Sensibilidad a Regnum 25 EC (pyraclostrobin).

Con el pyraclostrobin se requirió una dosis mayor en los aislamientos considerados silvestres (entre 9 y 11 ppm) en comparación con los aislamientos considerados comerciales (entre 2 y 5 ppm) para poder inhibir el 50% del crecimiento micelial del hongo (cuadro 3).

Esta situación en particular, donde los aislamientos considerados silvestres mostraron una menor sensibilidad en comparación con los aislamientos comerciales, puede deberse a una resistencia natural de los aislamientos, por ejemplo Fernández-Ortuño et al. (2008) mencionan que se han detectado cinco tipos de sustituciones de aminoácidos en el citocromo *b*, ocasionando la resistencia a fungicidas tipo estrobirulinas. Inclusive, se dice que es posible detectar una de esas mutaciones en poblaciones nunca antes expuestas a estos fungicidas (Russell 2004). Otra posibilidad es la resistencia cruzada negativa, esto quiere decir que el factor de resistencia a un fungicida(s) al que están expuestos los aislamientos comerciales, a la vez causa sensibilidad a otro fungicida en esos mismos aislamientos, en este caso al pyraclostrobin.

Cuadro 3. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida pyraclostrobin en aislamientos de *B. cinerea*.

pyraclostrobin (ppm i.a.)					
Aislamiento	Cascajal	Calle Blancos	San Martín	Zarcero	Tacares
CE_{50}	9,0a	10,52a	2,85b	3,66b	4,94b

i.a.: ingrediente activo.
CE_{50}: concentración efectiva media.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0,05$) según prueba LSD Fisher.

- Sensibilidad a Rovral 50 WP (iprodione).

Con el fungicida iprodione, para los aislamientos silvestres dosis por debajo de 1 ppm provocaron el 50% de inhibición del crecimiento del hongo, mientras que para el mismo fin en los aislamientos comerciales se requirieron dosis entre 1 y 4 ppm (cuadro 4).

Tomando en cuenta que este ingrediente activo tiene un riesgo de resistencia de medio a alto y que en Costa Rica no solo está registrado en tomate para el combate del moho gris, sino también contra *Rhizoctonia solani* y *Alternaria* spp. (por lo que su uso en el cultivo dependerá de los patógenos presentes y de su severidad), los valores de CE_{50} obtenidos indican que la exposición de los

aislamientos comerciales ha sido baja y que el fungicida es efectivo en el combate del patógeno en estudio.

Cuadro 4. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida iprodione en aislamientos de *B. cinerea*.

iprodione (ppm i.a.)					
Aislamiento	Cascajal	Calle Blancos	San Martín	Zarcero	Tacares
CE_{50}	0,66a	0,85a	1,41ab	2,03b	3,87c

i.a.: ingrediente activo.
CE_{50}: concentración efectiva media.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0,05$) según prueba LSD Fisher.

- Sensibilidad a Scala 40 SC (pirimetanil).

Con el fungicida pirimetanil se encontró que la CE_{50} se encuentra entre 2 y 6 ppm para todos los aislamientos, tanto silvestres como comerciales, excepto para el aislamiento de San Martín, el cual requirió una dosis alrededor de los 39 ppm (cuadro 5).

En este caso, se puede decir que los aislamientos Zarcero, Cascajal, Tacares y Calle Blancos han tenido una baja exposición al fungicida en ese orden, pero en San Martín la exposición al mismo ha sido la más alta. Hay que tomar en cuenta que el sector de San Martín de Heredia donde se obtuvo el aislamiento, es una zona rodeada de laderas y sin otros cultivos hortícolas a los alrededores, lo que de alguna forma provoca que hayan pocas posibilidades de diversificación de la población del patógeno en el lugar, que aunado a una selección de esporas por parte del fungicida, haya sido más probable encontrar esporas menos sensibles en el aislamiento.

Cuadro 5. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida pirimetanil en aislamientos de *B. cinerea*.

pirimetanil (ppm i.a.)					
Aislamiento	Cascajal	Calle Blancos	San Martín	Zarcero	Tacares
CE_{50}	3,60ab	5,97b	39,48c	2,19a	3,56ab

i.a.: ingrediente activo.
CE_{50}: concentración efectiva media.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0,05$) según prueba LSD Fisher.

- Sensibilidad a Derosal 50SC (carbendazim).

Los aislamientos silvestres requirieron dosis cercanas a 0,1 ppm, mientras que en los aislamientos comerciales fueron necesarias dosis que oscilaron entre 550 ppm y más de 3000 ppm para poder inhibir el 50% del crecimiento del hongo. Es con este ingrediente activo que los aislamientos comerciales mostraron la mayor pérdida de sensibilidad (cuadro 6).

Con este fungicida no es extraño encontrar que los aislamientos comerciales muestren una alta pérdida de sensibilidad, no solo por tener tantos años en el mercado, sino también porque su uso se da en diversos cultivos contra diferentes patógenos, tal como se puede ver en la lista de productos registrados en el Centro de Consulta de Insumos del Servicio Fitosanitario del Estado. Solo con este ingrediente activo se observó que a nivel *in vitro* se debe superar la dosis recomendada en campo (665 ppm) para poder inhibir el 50% el crecimiento del hongo en los aislamientos Zarcero y Tacares.

Sin embargo, a pesar que las dosis inhibitorias utilizadas *in vitro* superaron las dosis recomendadas en campo, no necesariamente implica que el fungicida no controle del todo al patógeno en campo, ya que según De Waard (1994) la disminución o pérdida de sensibilidad al fungicida depende del nivel de resistencia y la frecuencia de cepas resistentes. Por eso en este caso, el ensayo *in vitro* para carbendazim sirve para dar una idea de la sensibilidad de estas cepas y es

necesario realizar pruebas de campo para valorar su verdadera eficacia en la actualidad.

Cuadro 6. Valores de la concentración efectiva media en la evaluación de sensibilidad al fungicida carbendazim en aislamientos de *B. cinerea*.

carbendazim (ppm i.a.)					
Aislamiento	Cascajal	Calle Blancos	San Martín	Zarcero	Tacares
CE_{50}	0,09a	0,09a	551,20b	3149,25c	1907,28d

i.a.: ingrediente activo.
CE_{50}: concentración efectiva media.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0,05$) según prueba LSD Fisher.

Hay que tomar en cuenta que a nivel *in vitro* hay parámetros para clasificar la sensibilidad o resistencia de los aislamientos que se conocen como eficiencia de fungicidas *in vitro*. Así, Zhang et al. (2010) los utilizaron para caracterizar la resistencia a benzimidazoles y los diferencian de la siguiente manera:

- Sensible: los aislamientos no pueden crecer a dosis de 1 ppm.
- Baja resistencia: los aislamientos pueden crecer en dosis de 5 ppm pero no a 10 ppm.
- Moderada resistencia: los aislamientos pueden crecer en dosis de 50 ppm pero no a 100 ppm.
- Alta resistencia: en este caso, los aislamientos tienen la capacidad de crecer a dosis de 200 ppm.

Tomando en cuenta estos parámetros, se puede decir en general que los aislamientos comerciales se clasifican entre sensibles y con baja resistencia, excepto por el aislamiento San Martín con el fungicida pirimetanil que se encuentra cercano a una resistencia moderada y con el carbendazim se clasifican con alta resistencia (anexo 2).

La comparación entre los valores de CE_{50} obtenidos con estudios realizados por otros investigadores, permite conocer la sensibilidad del patógeno ante la exposición de los fungicidas en los lugares donde son aplicados. Por ejemplo, un estudio de línea base para *Botrytis* en vegetales de invernadero en China presentó una CE_{50} de 0,19 ppm para tebuconazol (Zhang 2007), dato menor respecto a los valores de este estudio.

En el caso del pyraclostrobin, se encontraron dos informes, el de Chen et al. (2009) en Taiwán, en el cual con 100 ppm lograron inhibir en 50% el crecimiento de micelio del hongo, y el de Kim y Xiao (2010) que reportaron 5 ppm para el mismo fin en el estado de Washington, mientras que los valores de CE_{50} obtenidos en este ensayo se encuentran entre 2,85 y 10,52.

Con el iprodione se ha encontrado un rango de inhibición entre 0,043 ppm y 2,596 ppm en Carolina del Sur, los valores más bajo y alto de CE_{50} en este estado respectivamente (Chen et al. 2011), siendo esta última concentración cercana a los valores obtenidos en los aislamientos comerciales de Zarcero y Tacares.

En Grecia, la CE_{50} para pirimetanil usando cepas resistentes a benzimidazoles fue entre 0,03 y 0,19 ppm (Petsikos-Panayotarou et al. 2003). En España, Moyano et al. (2004) compararon la sensibilidad de aislamientos de *B. cinerea* al pirimetanil recolectados en el año 1992 (aislamientos nunca expuestos al fungicida) y el año 2000 (aislamientos resistentes), donde hallaron que la CE_{50} fue de 5±2,64 ppm en el año 1992 y para el año 2000 el CE_{50} fue de 4,25±2,14 ppm con lo que concluyen que no se acumuló resistencia luego de cuatro años de exposición al fungicida. Por otro lado, en este estudio se encontraron valores de CE_{50} en su mayoría menores a los reportados en España, con excepción del aislamiento comercial San Martín (CE_{50} de 39 ppm).

De nuevo en Grecia, en pruebas de sensibilidad utilizaron aislamientos de *Botrytis* resistentes a carbendazim, donde se encontró que la CE_{50} estuvo entre 300 y 400 ppm y estas cepas fueron sensibles a iprodione y tebuconazol (Thomidis et al. 2009). Un ejemplo más contundente es el presentado por Waghmare et al. (2011) donde la concentración mínima inhibitoria *in vitro* para *Botrytis* fue de 1000 ppm. Con base en estos datos y los encontrados en este

estudio, se puede decir que los aislamientos comerciales son altamente resistentes al carbendazim.

Las razones por las que varían las dosis de inhibición entre aislamientos puede deberse a varios factores, tales como la exposición del fungicida y/o la dosificación del producto por parte de los agricultores. Otro aspecto es el hecho de que cuando el agricultor tiene que alquilar terrenos para sembrar, puede suceder que roten los productores y/o los fungicidas, pero no el cultivo. Además, cada productor selecciona su paquete de agroquímicos a aplicar donde posiblemente la rotación de estos no sea su prioridad o no es de su conocimiento.

Otro motivo es la variabilidad que posee *B. cinerea* (por ejemplo su patogenicidad) (Alfonso et al. 2000), que puede intervenir en el comportamiento o respuesta a un agente externo, como en este caso, la exposición a fungicidas. Además, Chardonnet et al. (2000) indican que cuanto mayor es la frecuencia de hacer sub cultivos de los aislamientos se pueden ver mayores variaciones *in vitro*.

Esta variabilidad se puede observar en el comportamiento entre aislamientos silvestres y comerciales, por ejemplo, la exposición a diferentes moléculas como en el caso del tebuconazol e iprodione (valores bajos de CE_{50}) y el caso extremo con el carbendazim (valores más altos de CE_{50}), el efecto de la resistencia natural o resistencia cruzada negativa en el caso del pyraclostrobin (aislamientos silvestres menos sensibles que los comerciales) o la influencia de las características de la zona como pudo haber sucedido con el pirimetanil.

Por otro lado, al tomar un único aislamiento del patógeno de cada sitio, si bien se puede indicar si es sensible, con baja, moderada o alta resistencia a un fungicida, no es posible conocer con exactitud la sensibilidad real de la población de un sitio, ya que el aislamiento seleccionado puede pertenecer a un nivel de sensibilidad de la población del patógeno. De ahí que es necesario aumentar la cantidad de aislamientos de cada sitio de estudio.

Evaluación del factor de resistencia

Se procedió a calcular el factor de resistencia para los aislamientos comerciales respecto al aislamiento silvestre Cascajal (cuadro 8). Cada valor en el cuadro mencionado indica el número de veces que aumenta la concentración media del aislamiento comercial para poder inhibir el 50 % del crecimiento del hongo, en comparación con el aislamiento silvestre. Para poder considerar cuándo un factor de resistencia es alto o bajo, se tomó como referencia los límites utilizados por Leroux et al. (2010) para analizar la resistencia a fungicidas inhibidores de la respiración, donde si el factor de resistencia es menor a 0,5 es muy sensible, si está entre 0,5 y 2 se considera sensible, y mayor a 2 es resistente. Hay que hacer la salvedad que estos indicadores mencionados se utilizaron para definir el nivel de resistencia de los aislamientos silvestres y comerciales en función de seis fungicidas, donde todos ellos pertenecen a diferentes grupos químicos.

Cuadro 7. Factor de resistencia de los aislamientos de *B. cinerea* provenientes de áreas comerciales, respecto al aislamiento silvestre Cascajal.

		San Martín	Zarcero	Tacares
Fungicida	F.R. fenhexamid	s.d.*	11,34a	s.d.
	F.R. tebuconazol	0,34a	0,55a	1,70a
	F.R. pyraclostrobin	0,32a	0,41a	0,55a
	F.R. iprodione	2,13a	3,08a	5,85a
	F.R. pirimetanil	10,93a	0,61a	0,99a
	F.R. carbendazim	6100,67b	34856,12b	21109,92b

F.R.: Factor de resistencia.
*s.d.: Sin datos.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05) según prueba LSD Fisher.

En los aislamientos comerciales se encontró que el único factor de resistencia con diferencia significativa fue el fungicida Derosal (carbendazim). Como bien se sabe, desde los años sesenta se menciona la pérdida de sensibilidad a este fungicida, poco tiempo después de su introducción al mercado,

por lo que es evidente que su efectividad ha disminuido con el paso del tiempo (Brent y Hollomon 2007a, Brent y Hollomon 2007b).

Con respecto a los fungicidas tebuconazol, pyraclostrobin, iprodione y pirimetanil se encontró que no hay diferencias significativas para cada aislamiento, sin embargo, si se descarta el fungicida carbendazim de los resultados, y según los límites establecidos por Leroux, el aislamiento San Martín sería resistente a los fungicidas iprodione y pirimetanil; el aislamiento Zarcero a los fungicidas fenhexamid e iprodione; y el aislamiento Tacares al fungicida iprodione. A pesar que con estos resultados los aislamientos comerciales serían resistentes a los fungicidas carbendazim e iprodione, no se puede confirmar que existe resistencia cruzada, ya que la CE_{50} del iprodione indica que los aislamientos se clasifican entre sensibles y con baja resistencia. Para que exista resistencia cruzada es necesario que haya homogeneidad en estos resultados, además de incluir una mayor cantidad e aislamientos y que la frecuencia de resistencia también sea homogénea entre ellos.

Algunos ejemplos de factores de resistencia reportados en la literatura para estos fungicidas son:

- Tebuconazol: F.R. de 30 en el año 1993, cinco años después de su introducción al mercado (Brent y Hollomon 2007b), cuando en este ensayo no se llega a un F.R. de 2,0.
- Pyraclostrobin: F.R. entre 12 y 4193 al evaluar aislamientos resistentes a este fungicida (Kim y Xiao 2010), mientras que en este ensayo no se llega a 1 para ninguno de los aislamientos.
- Iprodione: F.R. resistencia de 60,4 en Carolina del Sur E.E.U.U., siendo este hallazgo el primer reporte de resistencia a este fungicida en este estado (Chen et al. 2011), y en esta evaluación el valor más alto fue de 5 en el aislamiento Tacares.
- Pirimetanil: F.R. entre 162 y 330 en una provincia de China, y los comparan con valores encontrados en Francia (20 a 125) y en España (9 a 91) (Sun et al. 2010), mientras que en este ensayo se encontró un F.R. de 10 en el aislamiento San Martín.

- Carbendazim: F.R. de 2,8 y 3,1 en aislamientos con resistencia múltiple 1 (cepas con niveles de resistencia a fludioxonil, cyprodinil y tolnalftate) y resistencia múltiple 3 (cepas con alto grado de resistencia a un amplio espectro de fungicidas) (Kretschmer et al. 2009), sin embargo, para obtener estos valores se interpreta que la CE_{50} de las cepas comerciales fue también bajo. Este debe ser un caso excepcional, ya que como se vio anteriormente, hay valores de CE_{50} muy altos y por ende resultan en factores de resistencia altos.
- Fenhexamid: con el aislamiento Zarcero se observó una diferencia con este fungicida, ya que este no se comportó de forma similar a los aislamientos silvestres y de ahí que se pudiera calcular su factor de resistencia, resultando en 11,34. En Grecia, Ziogas et al. (2003) reportan un factor de resistencia para fenhexamid entre 10 y 15 en aislamientos silvestres, por lo que el resultado hallado en este estudio no es ajeno a la realidad observada en otros lugares. Este comportamiento podría deberse a que la población del hongo está constantemente expuesta al uso de agroquímicos tanto a nivel comercial, como experimental. Una muestra de lo variable que puede ser la población del patógeno es lo encontrado por Zhang et al. (2007), donde evaluaron doscientos aislamientos de *Botrytis* y encontraron una frecuencia de resistencia natural al fenhexamid de 10%, tomando en cuenta que las poblaciones no habían sido expuestas a este fungicida.

A pesar que el valor de factor de resistencia encontrado en el aislamiento Zarcero con el fungicida fenhexamid puede considerarse bajo, no por eso debe considerarse sin importancia ya que por ejemplo, Weber (2010) reporta un factor de resistencia mayor a 2000 para este fungicida en aislamientos de *Botrytis* en localidades al norte de Alemania, donde estas cepas son consideradas con un alto grado de resistencia; otro ejemplo es el encontrado en China donde el factor de resistencia es de 1800 a partir de cepas con resistencia natural (Zhang et al. 2007). Estos datos indican que *B. cinerea* puede perder su sensibilidad a este fungicida al utilizarse en aplicaciones sucesivas por varios años, tomando en cuenta que esto puede ocurrir en un periodo de tiempo más corto en presencia de cepas con resistencia natural.

En cuanto a estudios realizados sobre resistencia cruzada por diversos autores, se indica que el fenhexamid, como único ingrediente activo perteneciente al grupo de hidroxianilinas, no posee resistencia cruzada con otros grupos químicos como benzimidazoles, dicarboxamidas, triazoles y anilinopirimidinas (Suty et al. 1999, Weber 2010). Además, con el pyraclostrobin no se reporta resistencia cruzada con pirimetanil, fenhexamid ni iprodione (Myresiotis et al. 2008). Con el pirimetanil no se reporta resistencia cruzada con iprodione o carbendazim (Petsikos-Panayotarou et al. 2003). Sin embargo, el reporte más común de resistencia cruzada es entre benzimidazoles y dicarboxamidas (Brent y Hollomon 2007a). Es importante tomar en cuenta estos reportes para poder decidir que fungicidas utilizar dentro de un programa químico para disminuir el riesgo de resistencia de *B. cinerea*.

Selección de cepas resistentes al fenhexamid

De las tres aplicaciones del fenhexamid y la posterior inoculación de *B. cinerea* en las plántulas de tomate, se obtuvo el crecimiento del patógeno luego de la primera inoculación (figura 10) en los tratamientos de 25 y 50% de la dosis recomendada de fenhexamid, mientras de que a 75 y 100% no se recuperaron conidios, de ahí que se hicieran las dos siguientes aplicaciones del fungicida a 25 y 50% de la dosis.

Figura 5. Muestra de crecimiento de conidios de *B. cinerea* en los tratamientos en plántulas de tomate.

No obstante, a pesar que se recuperaron conidios bajo dichas concentraciones, la incidencia se mantuvo en dos plantas en las dos primeras evaluaciones y luego una planta en la tercera evaluación en el tratamiento al 25%, mientras que al 50% solo hubo una planta enferma en las tres evaluaciones. La severidad se mantuvo en el grado uno de la escala para ambos tratamientos en las tres inoculaciones que se realizaron.

El crecimiento de conidios en las concentraciones mencionadas, pudo ser debido a que éstas no fueron efectivas para combatir el hongo y de ahí que sobreviva una parte de la población que se sometió a la acción del fungicida, por lo que es importante no utilizar sub dosificaciones, ya que la dosis se establece a través de una serie de estudios de eficacia biológica que comprueban que es la requerida para combatir el patógeno.

Hay que recordar que las evaluaciones de incidencia y severidad se realizaron a los 11 días posteriores a la inoculación, esto porque en pruebas preliminares se observó que se presentaban conidios en las plántulas a los 6 días de la inoculación. Este resultado es similar a pruebas realizadas por Davidson y Krysinska-Kaczmarek (2007) donde ocurrió esporulación a los 6-7 días de la inoculación de *Botrytis* mientras se mantuviera constante la humedad.

Un detalle a considerar es que cada vez que se aplicó el fungicida a las plántulas en sus diferentes concentraciones y posteriormente se inocularon con la suspensión de esporas, al momento de evaluar la incidencia y severidad se encontró que los palillos de bambú (utilizados para separar la bolsa plástica de las plántulas) se infectaron con los conidios de *Botrytis.* Esto quiere decir que el hongo mantuvo su viabilidad después de ser inoculado en los diferentes tratamientos, y no fue capaz de causar infección en las plántulas (figura 11).

Figura 6. Esporulación de *Botrytis cinerea* en palillos de bambú.

Estos resultados no necesariamente se pueden extrapolar a condiciones de campo. Un ejemplo de esto es un ensayo de campo realizado en 1973, donde se aplicaron dosis crecientes (entre 5 y 1000 ppm) de iprodione y vinclozolin para el combate de *B. cinerea* en uva. Luego de 2 años y más de 11 aplicaciones al año, no se lograron recuperar cepas resistentes. Sin embargo, en 1978 se encontraron las primeras cepas resistentes en diferentes viñedos en Europa y en 1981 la proporción de cepas resistentes se ubicó entre 60-80% en Alemania occidental (Pommer y Lorenz 1995).

En el caso específico con el fungicida fenhexamid, Ziogas et al. (2003) crearon cepas resistentes de *B. cinerea* a este fungicida a través de mutagénesis química, que luego utilizaron para inocular plántulas de pepino en invernadero. Posteriormente, realizaron la aplicación del fungicida, y encontraron que éste no fue efectivo para combatir la enfermedad. Sin embargo, observaron una disminución en la patogenicidad y en las características de adaptación del patógeno por lo que concluyen que el riesgo de resistencia es bajo a campo abierto, más aún cuando se alterne el uso de este fungicida, pero no descartan que se presente una situación como la que ocurrió con los fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol, los cuales sufren una presión de selección de tipo direccional (Brent y Hollomon 2007a).

Por tratarse de un ensayo en el laboratorio, se dificulta observar cambios abruptos en el comportamiento del patógeno en tan corto tiempo y como se ha

encontrado en la literatura, la resistencia a fungicidas puede presentarse a los dos años o más de la exposición continua del patógeno al fungicida.

Un detalle a aclarar, es que únicamente se logró realizar tres inoculaciones de *B. cinerea* en las plántulas de tomate por problemas en la sanidad del almácigo, los cuales se caracterizaron por una muerte descendente de las plántulas a los 15 días después de la siembra cuando aún no había desarrollado la primera hoja verdadera, los síntomas observados fueron deformación de los cotiledones y posteriormente necrosis, además de una pudre suave descendente en el tallo.

Las medidas empleadas para evitar la pérdida de plantas fueron: limpieza del área donde se encontraba ubicado, disminución del riego para evitar exceso de humedad, se cambió el sustrato y la semilla fue de reciente adquisición. No se realizaron aplicaciones de fungicidas ya que no se observaban signos sobre las plántulas y también para evitar entorpecer la infección del inóculo en la prueba.

Se realizó un aislamiento de las plantas enfermas (figura 12) donde se tomó una sección del tallo con zona de avance de la marchitez, del cual se recuperaron *Aspergillus* sp. y *Paecilomyces* sp.

A B C

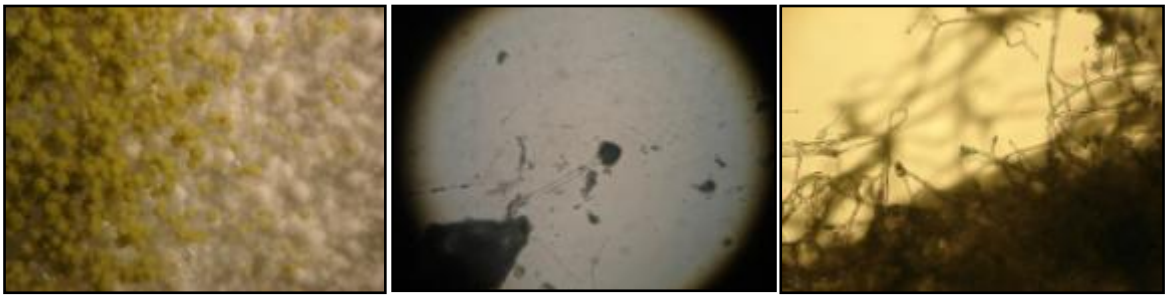


Figura 7. Organismos recuperados en el aislamiento de las plántulas de tomate enfermas: *Aspergillus* sp. (A y B) y *Paecilomyces* sp. (C).

Posible esquema de rotación de fungicidas

Para poder hacer un esquema de rotación de fungicidas para el combate de *Botrytis cinerea* en tomate, se debe tomar en cuenta las opciones reales de fungicidas que hay en el mercado nacional. Es por esto que se presentan referencias de la efectividad de ingredientes activos que no se evaluaron en este ensayo.

Por ejemplo, Derpmann et al. (2010) recolectaron un total de 123 aislamientos en cinco regiones de Alemania, donde encontraron que un 10% de ellos tenían resistencia al metil tiofanato al no ser inhibidos a la dosis de 300 ppm. Thomidis et al. (2009) encontraron en melocotón, valores de CE_{50} entre 200 y 300 ppm para *B. cinerea*. Se debe tomar en cuenta que según Zhang et al. (2010) a dosis mayores de 200 ppm las cepas se consideran altamente resistentes en benzimidazoles.

Con respecto al fungicida benomil, Stehmann y De Waard (1996) evaluaron un total de 121 aislamientos de *Botrytis* provenientes de Francia, Alemania, Israel y los Países Bajos, donde el 21% de esos aislamientos presentaron resistencia al benomil. En un estudio realizado por Diánez et al. (2002) en España, donde evaluaron 36 aislamientos de *B. cinerea* del cultivo de fresa, encontraron que el 86% presentó una resistencia muy alta a este fungicida, ya que obtuvieron valores de CE_{50} que superaron los 600 ppm.

Por otro lado, se debe tomar en cuenta que para hacer una correcta rotación de fungicidas se debe contar con moléculas con diferentes modos de acción, y no utilizar solo aquellos con acción en un sitio específico para evitar así una pronta pérdida de sensibilidad. Por ejemplo, Leroux (2007) indica que el fungicida clorotalonil afecta la germinación de conidios, y tiene menos efecto en el crecimiento de micelio, de ahí su uso como preventivo. El mancozeb es un fungicida de amplio espectro que funciona como un protector del follaje, que al ser un fungicida multisitio afecta procesos de la respiración y generación de energía en los hongos, por lo que las probabilidades de generar resistencia es muy bajo (EDIFARM 2008). En tomate, estos fungicidas se encuentran registrados ante el Servicio Fitosanitario del Estado contra *B. cinerea*, por lo que se pueden utilizar

para alternar entre fungicidas sistémicos o entre aquellos que posean riesgos de resistencia.

Otro fungicida es el sulfato de cobre pentahidratado el cual ataca un amplio espectro de patógenos (hongos y bacterias) y funciona como sistémico y de contacto[4], sin embargo, se debe tener precaución al utilizarlo ya que existe la posibilidad que las plantas presenten sensibilidad al cobre (Arauz 2011), por lo que es recomendable hacer pruebas preliminares para determinar posibles problemas de fitotoxicidad. Algunos nombres comerciales de estos fungicidas alternativos mencionados se encuentran en el cuadro 9.

Cuadro 8. Otros fungicidas a considerar para el combate de *Botrytis cinerea*.

Grupo químico	Ingrediente activo	Nombre comercial registrado
Benzonitrilo	clorotalonil	Bravo 72 SC, Bravo 82.5 WG, Clorotal 50 SC, Clortosip 72 SC, Daconil 50 SC, PBC Clorotalonil 75 WP, Piscis clorotalonil 50 SC
Inorgánico	sulfato de cobre pentahidratado	Bacton 5,5 SL, Hachero 6,6 SL
Ditiocarbamato	mancozeb	Dithane 75 WG

No se puede dejar por fuera otras enfermedades que afectan el cultivo de tomate, ya que hay fungicidas que combaten a más de un patógeno. Es por esto que hay que estudiar los posibles patógenos y las condiciones climáticas que pueden llegar a afectar el cultivo, para poder hacer una aplicación más efectiva que implique una correcta rotación de ingredientes activos; además, es recomendable conocer la información básica de cada producto comercial en su respectivo panfleto para hacer un uso más eficiente el ingrediente activo (cuadro 10).

[4] Ficha técnica de Hachero 6.6 SL.

Cuadro 9. Fungicidas para el combate de *Botrytis cinerea*, modo de acción y otros patógenos que combaten en el cultivo de tomate.

Ingrediente activo	Modo de acción	Instrucciones**	Otros patógenos que combaten en el cultivo de tomate*
carbendazim	Sistémico, protector y curativo	Aplicar cada 14 días, máximo 3 aplicaciones por ciclo de cultivo	*Colletotrichum* sp., *Cercospora* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*
benomil	Sistémico, curativo	Aplicar cada 8-21 días según condiciones ambientales, antes de la enfermedad o con los primeros síntomas	*Colletotrichum* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*
metil tiofanato	Sistémico	Aplicar cada 15-20 días según enfermedad y condiciones climáticas	*Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phytium* sp., *Rhizoctonia solani*
iprodione	Contacto	Aplicar cada 15 días, máximo 6 aplicaciones por ciclo de cultivo	*Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp.
pirimetanil	Contacto, acción translaminar	Aplicaciones cada 7-10 días. Máximo 2 aplicaciones según condiciones climáticas y presión del inóculo.	Ninguno
clorotalonil	Preventivo de contacto	Aplicar cada 7-10 días según la severidad de la enfermedad	*Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cercospora* sp., *Rhizoctonia solani*
mancozeb	Preventivo de contacto	Aplicar de forma preventiva o al inicio de los primeros síntomas. Aplicar cada 5-8 días	*Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*
sulfato de cobre pentahidratado	Sistémico, contacto y curativo	Aplicar a lo largo del ciclo cuando sea necesario	*Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phythium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, *Stemphylium solani*, *Erwinia* sp., *Xanthomonsa vesicatoria*

*Comparación entre la Lista de enfermedades de cultivos agrícolas y forestales de C.R. y el SFE.

**Información tomada de los respectivos panfletos en EDIFARM 2008.

Ya que *Botrytis cinerea* es capaz de infectar las plantas de tomate previo a la floración y hasta la maduración de frutos, además de poseer una tasa de reproducción muy alta en corto tiempo, se propone el siguiente esquema de rotación de fungicidas para su combate en un manejo preventivo:

- ✓ Aplicación en campo:

- La aplicación de mancozeb protegería máximo por 8 días.
- El aplicar clorotalonil da una protección máxima de 10 días.
- Si las condiciones climáticas ideales para la esporulación son intermitentes (por ejemplo lluvias esporádicas), pero cabe la posibilidad que aumente la incidencia del patógeno en el cultivo, se puede aplicar el iprodione que puede proteger por 15 días haciendo un máximo de 6 aplicaciones, pero nunca seguidas, sino alternando con otras moléculas.
- En caso que persista una alta humedad relativa y se presente el ámbito de temperaturas en que se da la esporulación y la cantidad de inóculo sea importante, la aplicación de pirimetanil (por su acción translaminar) inhibiría la producción de las enzimas encargadas de facilitar la infección en la planta, protegería entre 7 y 10 días según las condiciones climáticas, pero hay que recordar que solo se recomienda hacer 2 aplicaciones durante el ciclo.

- ✓ Aplicación en invernadero:

- La aplicación de mancozeb protegería máximo por 8 días.
- El aplicar clorotalonil da una protección máxima de 10 días.
- En caso que la severidad alcance niveles importantes de daño, como agente curativo se puede aplicar el iprodione, ya que puede proteger por 15 días inhibiendo la germinación de esporas y el crecimiento de micelio y además, se puede usar hasta 6 veces (no continuas) en el ciclo solo si fuese necesario.

Discusión general

- El fungicida fenhexamid es efectivo contra *Botrytis*. Esto se comprobó con la elaboración de la línea base, inclusive con los datos obtenidos del factor de resistencia. Los resultados de la línea base de este fungicida pueden utilizarse como referencia para futuros monitoreos de resistencia.

- Debido a que los benzimidazoles (carbendazim, benomil, metil tiofanato) han presentado desde hace años problemas de resistencia, lo ideal es no usarlos o bien, utilizarlos la menor cantidad de veces en el ciclo de cultivo y en mezcla con un fungicida con bajo riesgo de resistencia y de un grupo químico diferente, para ampliar el tiempo de protección del cultivo y valorando su nivel de efectividad, ya que no necesariamente los resultados *in vitro* son una fiel descripción de la efectividad en campo.

- A pesar que el valor de factor de resistencia obtenido del fungicida iprodione en los tres aislamientos comerciales indica que se pueden considerar como resistentes, con los valores de CE_{50} se pueden clasificar entre sensibles y con baja resistencia, de ahí que se incluya dentro de la rotación de fungicidas.

- Las cepas recuperadas en el ensayo *in vivo* con fenhexamid pudo deberse a la sub dosificación del producto, por lo que no se puede concluir que estas sean resistentes. Además, para llegar a esa conclusión, debería realizarse una mayor cantidad de aislamientos y por un largo periodo de tiempo para poder observar cambios significativos entre el comportamiento del patógeno y la exposición al fungicida.

- Con el posible esquema de rotación de fungicidas propuesto, se pretende que se le dé importancia a las condiciones ambientales, el estado fenológico del cultivo, y la incidencia y severidad del patógeno, buscando así un manejo preventivo de *B. cinerea* y una mayor efectividad del fungicida aplicado.

Recomendaciones

- Para poder confirmar a futuro la posibilidad de resistencia cruzada entre fungicidas disponibles en el mercado, es necesario dar un seguimiento a las zonas de Zarcero, Tacares y San Martín de Heredia y si es posible aumentar la cantidad de aislamientos provenientes de estas localidades, para poder observar diferencias en el tiempo, en especial para darle un mejor seguimiento a los fungicidas de este estudio.

- Eventualmente, cuando se registre el fungicida fenhexamid en el país, éste será una herramienta más del programa de rotación en el combate de *B. cinerea*, utilizándose de forma preventiva como protectante.

- Dado que se demostró que el fungicida tebuconazol sí es efectivo contra *B. cinerea* a nivel *in vitro*, podrían realizarse pruebas de eficacia a nivel de campo en el cultivo de tomate y evaluar posteriormente su factibilidad para registrarlo ante el SFE, como una opción más de control químico en este cultivo.

- El fungicida pyraclostrobin puede ser otra opción contra el patógeno en estudio, sin embargo, es preferible realizar más pruebas de sensibilidad contra *B. cinerea*, ya que aunque los aislamientos en estudio se mostraron entre sensibles y con baja resistencia, este fungicida se utiliza en tomate contra *Alternaria solani*, por lo que el patógeno en estudio ya se encuentra bajo la presión del fungicida.

Literatura citada

AGRIOS G. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam, Holland. 922 p.

ALFONSO C., RAPOSO R., MELGAREJO P. 2000. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. Plant Pathology 49: 243-251.

ARAUZ L. 2011. Fitopatología: un enfoque agroecológico. 2da ed. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 472p.

BENITO E., ARRANZ M., ESLAVA A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista Iberoamericana de Micología 17:43-46.

BRENT K., HOLLOMON D. 2007a. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?. Fungicide Resistance Action Committee. Monograph No. 1(second, revised edition) 57 p.

BRENT K., HOLLOMON D. 2007b. Fungicide resistance: the assessment of risk. Fungicide Resistance Action Committee. Monograph No. 2 (second, revised edition). Aimprint. UK. 53 p.

CHARDONNET C., SAMS C., TRIGIANO R., CONNWAY W. 2000. Variability of the three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. Postharvest Pathology and Mycotoxins 90(7): 769-774.

CHEN L., CHUNG W.C., CHUNG W.H. 2009. Sensitivity of *Botrytis cinerea* of strawberry to Strobilurins (QoIs) in Taiwan. Plant Pathology. Bulletin 18: 89-99.

CHEN F., LIU X., LI X., SCHNABEL G. 2011. First report of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* on Blackberry from South Carolina. Plant Disease 95(11): 1481.

COLLADO I., ALEU J., HERNÁNDEZ-GALÁN R., DURÁN-PATRÓN R. 2000. *Botrytis species*: An intriguing source of metabolites with a wide range of

biological activities. Structure, chemistry and bioactivity of metabolites isolated from *Botrytis* species. Current Organic Chemistry 4(2):1261-1286.

DAVIDSE L., ISHII H. 1995. Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylcarbamates and N-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. Modern Selective Fungicides. Ed. H. Lyr. 2 ed. Gustav Fisher Verlag. New York, USA. 595p.

DAVIDSON J., KRYSINSKA-KACZMAREK R. 2007. Effects of inoculums concentration, temperature, plant age and interrupted wetness on infection of lentil (Lens culinaris) by *Botrytis* spp. conidia. Australasian Plant Pathology 36(4): 389-396.

DEKKER J. 1995. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. Modern Selective Fungicides. Ed. H. Lyr. 2 ed. Gustav Fisher Verlag. New York, USA. 595p.

DELP C. 1995. Benzimidazoles and related fungicides. Modern Selective Fungicides. Ed. H. Lyr. 2 ed. Gustav Fisher Verlag. New York, USA. 595p.

DERPMANN J., STEINER U., OERKE E., BUSCHHAUS H., DEHNE H. 2010. Occurrence of resistance to thiophanate-methyl in isolates of *Botrytis cinerea* from vineyards in Germany. Julius-Kühn-Archiv. 428: 491.

DE WAARD M. 1994. Resistance to fungicides which inhibits sterol 14α-demethylation, an historical perspective. Eds. Heany S., Slawson D., Hollomon D., Smith M., Russell P., Parry D. Fungicide Resistance. BCPC Monograph nº60. Farnham, Surrey, UK. 418p.

DIÁNEZ F., SANTOS M., BLANCO R., TELLO J. 2002. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (southwestern Spain). Phytoparasitica 30(5): 529-534.

EDIFARM. 2008. Vadeagro. Tomo I. 4ta edición. 782 p.

EL OIRDI M., EL RAHMAN T., RIGANO L., EL HADRAMI A., RODRÍGUEZ M., DAAYF F., VOJNOV A., BOUARAB K. 2011. *Botrytis cinere*a manipulates

the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. The Plant Cell 23(6): 2405-2421.

FERNANDEZ-ORTUÑO D., TORÉS J., DE VICENTE A., PÉREZ-GARCÍA A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in pathogenic fungi. International Microbiology 11(1):1-9.

FILLINGER S., LEROUX P., AUCLAIR C., BARREAU C., HAJJ C., DEBIEU D. 2008. Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 5(11): 3933-3940.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. 2007. Mode of Action of fungicides. Consultado 12 Mayo 2012. http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC%20MoA%20Poster%202011_final_HR.pdf

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. 2010. List of plant pathogenic organisms resistance to disease control agents. Consultado 06 Junio 2010. Disponible en: http://www.frac.info/frac/publication/anhang/List_of_resistant_plant_pathogens_Jan%202010.pdf

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. 2012. FRAC Code List 2012: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Consultado 12 Mayo 2012. Disponible en: http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC-Code-List2011-final.pdf

GEPP V., VERO S., CASSANELLO M., ROMERO G., SILVERA E. GONZÁLEZ P., REBELLATO J., FERREIRA Y., BENTANCUR O. 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. Agrociencia Uruguay 16(1): 97-107.

HALL T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

HÄNßLER G., PONTZEN R. 1999. Effect of fenhexamid on the development of *Botrytis cinerea*. Pflanzenschuts-Nachrichten Bayer 52(2): 158-176.

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOMATO DISEASE (2th, 2009, Kusadasi, Turkey) 2009. Resistance to Fungicides among *Botrytis cinerea* Isolates from tomato and other hosts in Israel. Eds. Saygili H., Sahin F., Aysan Y. Vol. 1.

KATAN T. 1982. Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide ("dicarboximide") fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. Plant Pathology 31(2):133-141.

KIM Y., XIAO C. 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cin*erea from stored apples in Washington State. Plant Disease 94(5): 604-6012.

KRETSCHMER M., LEROCH M., MOSBACH A., WALKER A., FILLINGER S., MERNKE D., SCHOONBEEK H., PRADIER J., LEROUX P., DE WAARD M., HAHN M. 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field population of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. Plos Pathogens 5(12): 1-14.

KUCK K., SCHEINPFLUG H., PONTZEN R. 1995. DMI Fungicides. Modern Selective Fungicides. Ed. H. Lyr. 2 ed., Gustav Fisher Verlag. New York, USA. 595p.

LATORRE B., RIOJA M., LILLO C. 2002. Efecto de la temperatura en el desarrollo de infección producida por *Botrytis cin*erea en flores y bayas de uva de mesa. Ciencia e Investigación Agraria 29(3): 145-151.

LEROUX P. 2007. Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. Eds. Y. Elad, Williamson B., Tudzynski P., Delen N. Dordrecht, The Netherlands. Springer. 404 p.

LEROUX P., GREDT M., LEROCH M., WALKER A. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. Applied and Environmental Microbiology 76(19): 6615-6630.

MIRZAEI S., MOHAMMADI GOLTAPEH E., SHAMS-BAKHSH M., SAFAIE N. 2008. Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. Journal of Phytopathology 156: 21–28.

MOYANO C., GÓMEZ V., MELGAREJO P. 2004. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetables crops in Spain. Journal of Phytopathology 152:484-490.

MYRESIOTIS C., BARDAS G., KARAOGLANIDIS G. 2008. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole- resistance strains by these fungicides. Plant Disease 92(10): 1427- 1431.

PETSIKOS-PANAYOTAROU N., MARKELLOU E., KALAMARAKIS A. 2003. In vitro and in vivo activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* isolates resistant to other botryticides and selection resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. European Journal of Plant Pathology 109: 173-182.

POMMER E.-H., LORENZ G. 1995. Dicarboximide fungicides. Modern Selective Fungicides. Ed. H. Lyr. 2 ed., Gustav Fisher Verlag. New York, USA. 595p.

RAPOSO R., DELCAN J., GÓMEZ V., MELGAREJO P. 1996. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spain greenhouses. Plant Pathology 45: 497-505.

RIBERA A. 2007. Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie Quillaja saponaria Mol. cultivada in vitro en *Botrytis cinerea* Pers. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Ciencias de Recursos Naturales. Temuco, Chile. Universidad de la Frontera. 197p.

RUSSELL P. 2004. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Fungicide Resistance Action Committee, Monograph No. 3. Aimprint. UK. 60 p.

SANDOVAL C. 2004. Manual técnico de manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Universidad de Talca, Chile. 53p.

SERVICIO FITOSANITARIO DEL ESTADO. 2009. Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica 2009. Ministerio de Agricultura y Ganadería 118p.

SERVICIO FITOSANITARIO DEL ESTADO. 2012. Productos registrados por el Servicio Fitosanitario de Estado para el combate de *Botrytis* spp. (En línea) Consultado 25 Agosto 2012. Disponible en http://www.protecnet.go.cr/InsumoSys/Principal.htm

STAUB T., SOZZI D. 1984. Fungicide resistance a continuing challenge. Plant Disease 68(12):1026-1031.

STEHMANN C., DE WAARD M. 1996. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* to triazoles, benomyl and vinclozolin. European Journal of Plant Pathology 102: 171-180.

SUN H., WANG H., CHEN Y., LI H., CHEN C., ZHOU M. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. Plant Disease 94(5): 551-556.

SUTY A. PONTZEN R., STENZEl K. 1999. Fenhexamid - Sensitivity of *Botrytis cinerea*: Determination of base line sensitivity and assessment of the risk of resistance. Pflanzenschuts-Nachrichten Bayer 52(2): 145-157.

THOMIDIS T., MICHAILIDES T., EXADAKTYLOU E. 2009. Contribution of pathogens to peach fruit rot in northern Greece and their sensitivity to iprodione, carbendazim, thiophanate-methyl and tebuconazole fungicides. Journal of Phytopathology. 157: 194-200.

TOMLIN CDS. 2009. The Pesticide Manual: a world compendium. 15ta ed. BCPC, Hampshire, UK. 1457p.

TROUT C., RISTAINO J., MADRITCH M., WANGSOMBOONDEE T. 1997. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. Plant Disease 81(9): 1042-1048.

ULMER E. 2003. In vitro sensitivity of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. to pyrimethanil and cyprodinil in some Croatian vineyards. Journal of Plant Diseases and Protection 110(1): 54-58.

VALLEJO I., MUÑOZ F., CARBU M., REBORDINOS L., FERNÁNDEZ-ACERO F., CANTORAL J. 2003. Study on fungicide resistance of *Botrytis cinerea* isolates from diseased strawberry plants. Archives of Phytopathology and Plant Protection 36:1-7.

VAN BARLEN P., LEGENDRE L., VAN KAN J. 2007. Plant defense compounds against *Botrytis* infection. Eds. Y. Elad, Williamson B., Tudzynski P., Delen N. Dordrecht, The Netherlands. Springer. 404 p.

WAGHMARE M., WAGHMARE R., KAMBLE S. 2011. Efficacy of carbendazim against *Botrytis cinerea* causing leaf blight of rose. BIOINFOLET - A Quarterly Journal of Life Sciences 8(2): 157.

WANG Z., COLEY-SMITH J., WAREING P. 1986. Dicarboximide resistance in *Botrytis cinerea* in protected lettuce. Plant Pathology 35:427-433.

WEBER R. 2010. Occurrence of Hyd R3 fenhexamid resistance among *Botrytis* isolates in Northern German soft fruit production. Journal of Plant Diseases and Protection 117(4): 177-179.

WEBER R., HAHN M. 2011. A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. Journal of Plant Diseases and Protection 118(1): 17-25.

WILLIAMSON B., TUDZYNSKI B., TUDZYNSKI P., VAN KAN J. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8(5): 561-580.

YOURMAN L., JEFFERS S. 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. Plant Disease 83(6): 569-575.

ZHANG, C., ZHU J., WEI F., LIU S., ZHU G. 2007. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables to DMI's and fenhexamid. Phytoparasitica 35(3): 300-313.

ZHANG C., LIU Y., ZHU G. 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. European Journal of Plant Pathology 126: 509-515.

ZIOGAS B., MARKOGLOU A., MALANDRAKIS A. 2003. Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology. 109: 311-317.

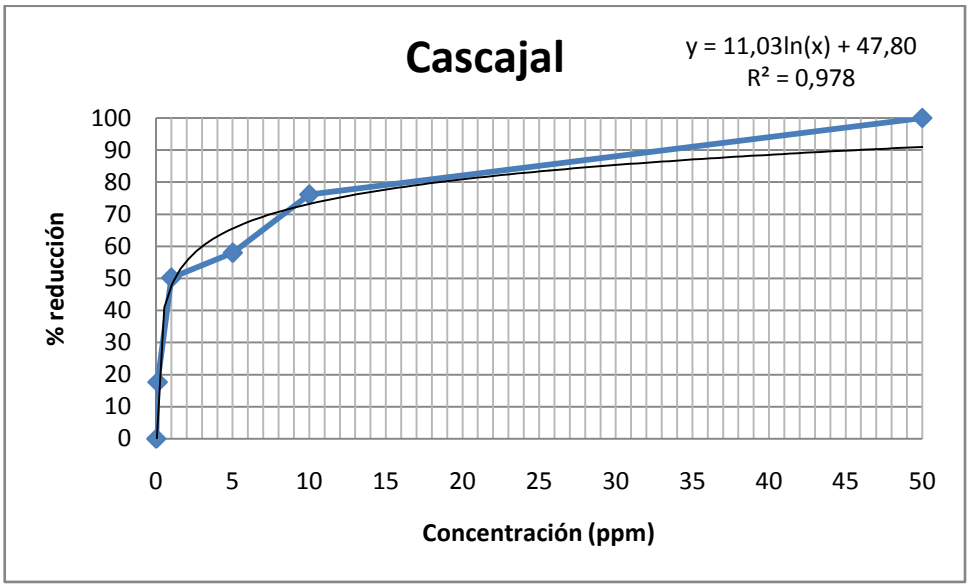
Anexo 1

Alineamiento correspondiente a las secuencias bilaterales de cada una de las muestras de *B. cinerea*.

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         10         20         30         40         50         60
Cascajal         ---GTAACAA GGTTTCCGTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTACAGAGT TCATGCCCGA
San Martín       ---GTAACAA GGTTTCCGTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTACAGAGT TCATGCCCGA
Zarcero          ---GTAACAA GGTTTCCGTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTACAGAGT TCATGCCCGA
Tacares          GTCGTAACAA GGTTTCCGTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTACAGAGT TCATGCCCGA
Calle Blancos    ---GTAACAA GGTTTCCGTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTACAGAGT TCATGCCCGA
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         70         80         90        100        110        120
Cascajal         AAGGGTAGAC CTCCCACCCT TGTGTATTAT TACTTTGTTG CTTTGGCGAG CTGCCTTCGG
San Martín       AAGGGTAGAC CTCCCACCCT TGTGTATTAT TACTTTGTTG CTTTGGCGAG CTGCCTTCGG
Zarcero          AAGGGTAGAC CTCCCACCCT TGTGTATTAT TACTTTGTTG CTTTGGCGAG CTGCCTTCGG
Tacares          AAGGGTAGAC CTCCCACCCT TGTGTATTAT TACTTTGTTG CTTTGGCGAG CTGCCTTCGG
Calle Blancos    AAGGGTAGAC CTCCCACCCT TGTGTATTAT TACTTTGTTG CTTTGGCGAG CTGCCTTCGG
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        130        140        150        160        170        180
Cascajal         GCCTTGTATG CTCGCCAGAG AATACCAAAA CTCTTTTTAT TAATGTCGTC TGAGTACTAT
San Martín       GCCTTGTATG CTCGCCAGAG AATACCAAAA CTCTTTTTAT TAATGTCGTC TGAGTACTAT
Zarcero          GCCTTGTATG CTCGCCAGAG AATACCAAAA CTCTTTTTAT TAATGTCGTC TGAGTACTAT
Tacares          GCCTTGTATG CTCGCCAGAG AATACCAAAA CTCTTTTTAT TAATGTCGTC TGAGTACTAT
Calle Blancos    GCCTTGTATG CTCGCCAGAG AATACCAAAA CTCTTTTTAT TAATGTCGTC TGAGTACTAT
                  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        190        200        210        220        230        240
Cascajal         ATAATAGTTA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTG GCATCGATGA AGAACGCAGC
San Martín       ATAATAGTTA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTG GCATCGATGA AGAACGCAGC
Zarcero          ATAATAGTTA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTG GCATCGATGA AGAACGCAGC
Tacares          ATAATAGTTA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTG GCATCGATGA AGAACGCAGC
Calle Blancos    ATAATAGTTA AAACTTTCAA CAACGGATCT CTTGGTTCTG GCATCGATGA AGAACGCAGC
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        250        260        270        280        290        300
Cascajal         GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC
San Martín       GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC
Zarcero          GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC
Tacares          GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC
Calle Blancos    GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        310        320        330        340        350        360
Cascajal         ATTGCGCCCC TTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTCGAG CGTCATTTCA ACCCTCAAGC
San Martín       ATTGCGCCCC TTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTCGAG CGTCATTTCA ACCCTCAAGC
Zarcero          ATTGCGCCCC TTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTCGAG CGTCATTTCA ACCCTCAAGC
Tacares          ATTGCGCCCC TTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTCGAG CGTCATTTCA ACCCTCAAGC
Calle Blancos    ATTGCGCCCC TTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTCGAG CGTCATTTCA ACCCTCAAGC
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        370        380        390        400        410        420
Cascajal         TTAGCTTGGT ATTGAGTCTA TGTCAGTAAT GGCAGGCTCT AAAATCAGTG GCGGCGCCGC
San Martín       TTAGCTTGGT ATTGAGTCTA TGTCAGTAAT GGCAGGCTCT AAAATCAGTG GCGGCGCCGC
Zarcero          TTAGCTTGGT ATTGAGTCTA TGTCAGTAAT GGCAGGCTCT AAAATCAGTG GCGGCGCCGC
Tacares          TTAGCTTGGT ATTGAGTCTA TGTCAGTAAT GGCAGGCTCT AAAATCAGTG GCGGCGCCGC
Calle Blancos    TTAGCTTGGT ATTGAGTCTA TGTCAGTAAT GGCAGGCTCT AAAATCAGTG GCGGCGCCGC
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        430        440        450        460        470        480
Cascajal         TGGGTCCTGA ACGTAGTAAT ATCTCTCGTT ACAGGTTCTC GGTGTGCTTC TGCCAAAACC
San Martín       TGGGTCCTGA ACGTAGTAAT ATCTCTCGTT ACAGGTTCTC GGTGTGCTTC TGCCAAAACC
Zarcero          TGGGTCCTGA ACGTAGTAAT ATCTCTCGTT ACAGGTTCTC GGTGTGCTTC TGCCAAAACC
Tacares          TGGGTCCTGA ACGTAGTAAT ATCTCTCGTT ACAGGTTCTC GGTGTGCTTC TGCCAAAACC
Calle Blancos    TGGGTCCTGA ACGTAGTAAT ATCTCTCGTT ACAGGTTCTC GGTGTGCTTC TGCCAAAACC
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        490        500        510        520        530        540
Cascajal         CAAATTTTTC TATGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGGATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
San Martín       CAAATTTTTC TATGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGGATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
Zarcero          CAAATTTTTC TATGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGG..... .......... ..........
Tacares          CAAATTTTTC TATGGTTGAC CTCGGATC.. .......... .......... ..........
Calle Blancos    CAAATTTTTC TATGGTTGAC CTCGGATC.. .......... .......... ..........
```

Anexo 2

Evaluación de sensibilidad a los fungicidas comerciales.[5]



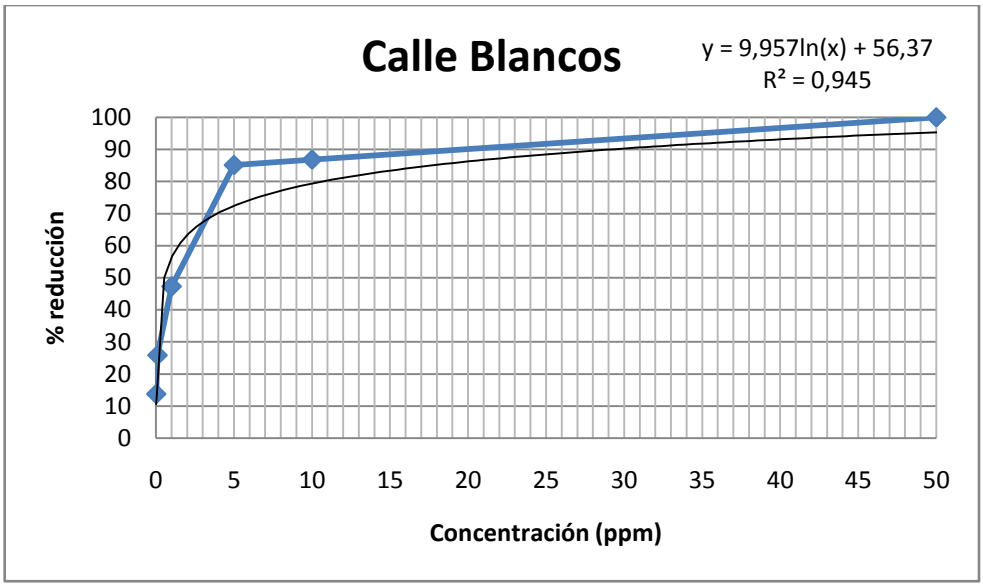
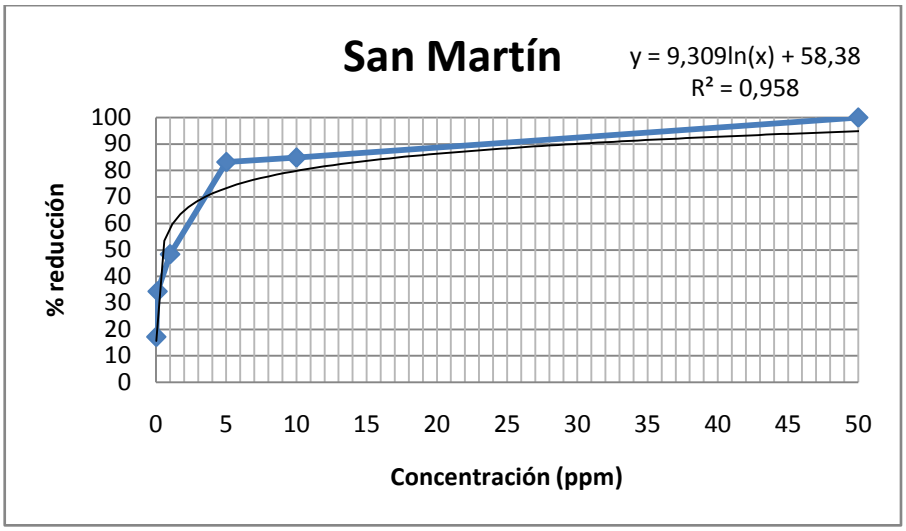
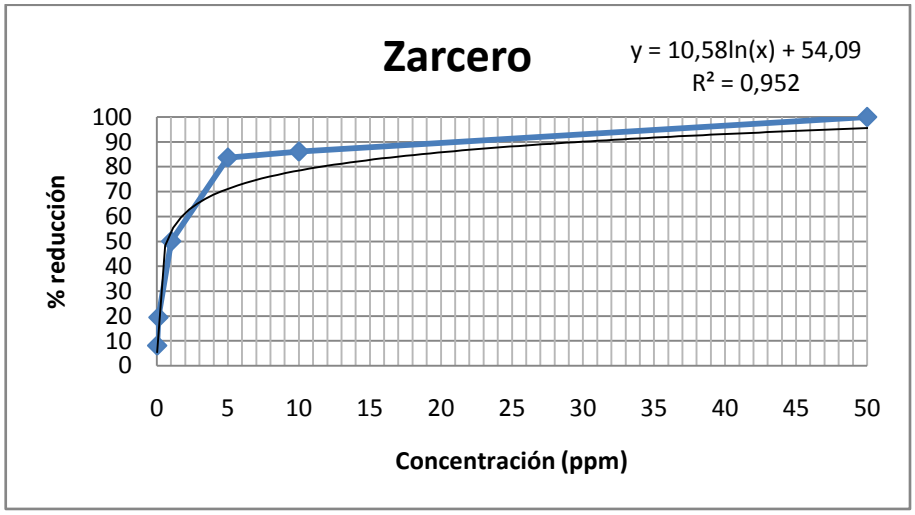


Figura 1. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a los aislamientos silvestres en función de la concentración del fungicida tebuconazol en un periodo de cinco días.

[5] La escala del eje X varía entre figuras para tener una mejor apreciación del % de reducción.





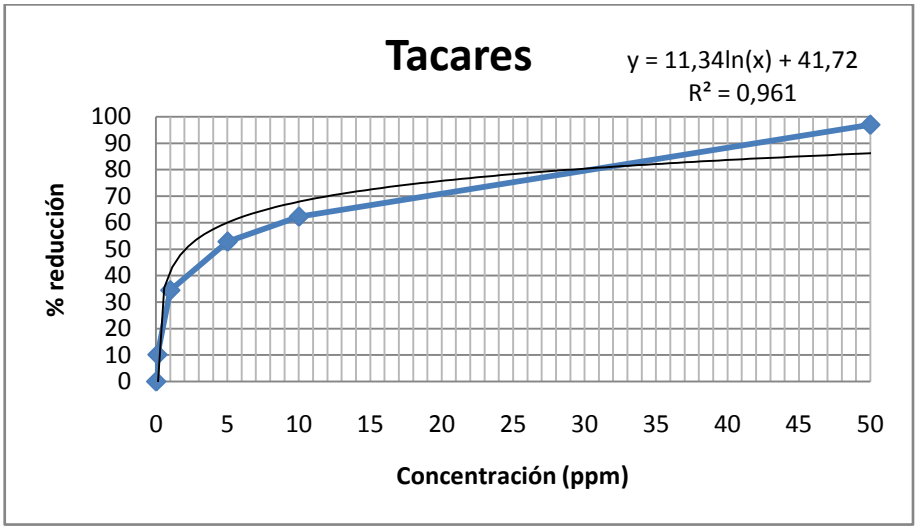
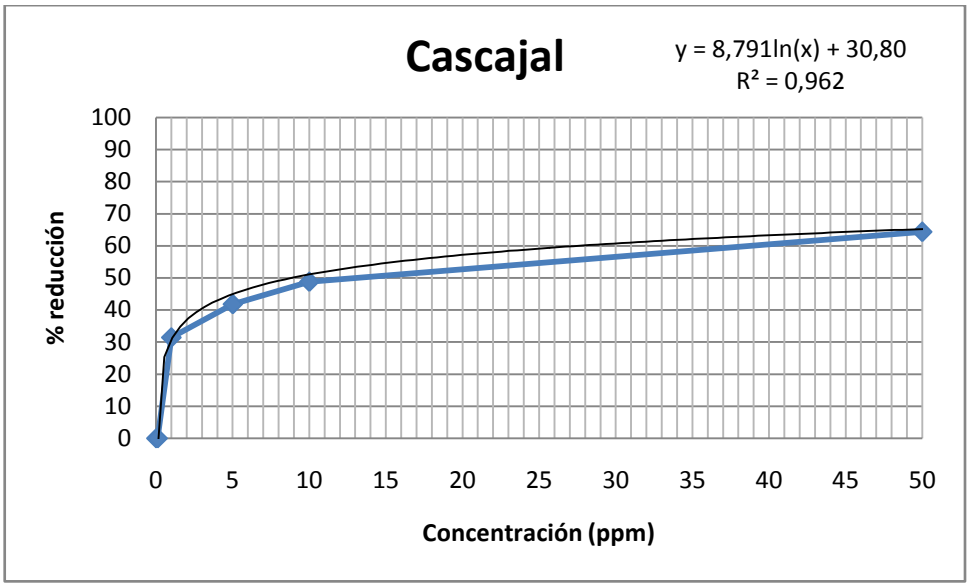


Figura 2. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a los aislamientos comerciales en función de la concentración del fungicida tebuconazol en un periodo de cinco días.



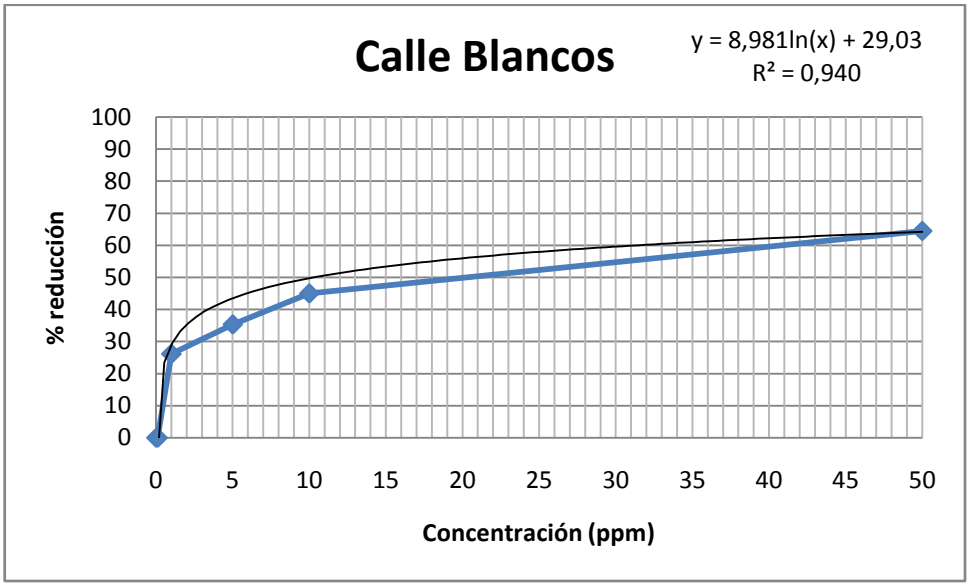


Figura 3. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a los aislamientos silvestres en función de la concentración del fungicida pyraclostrobin en un periodo de cinco días.

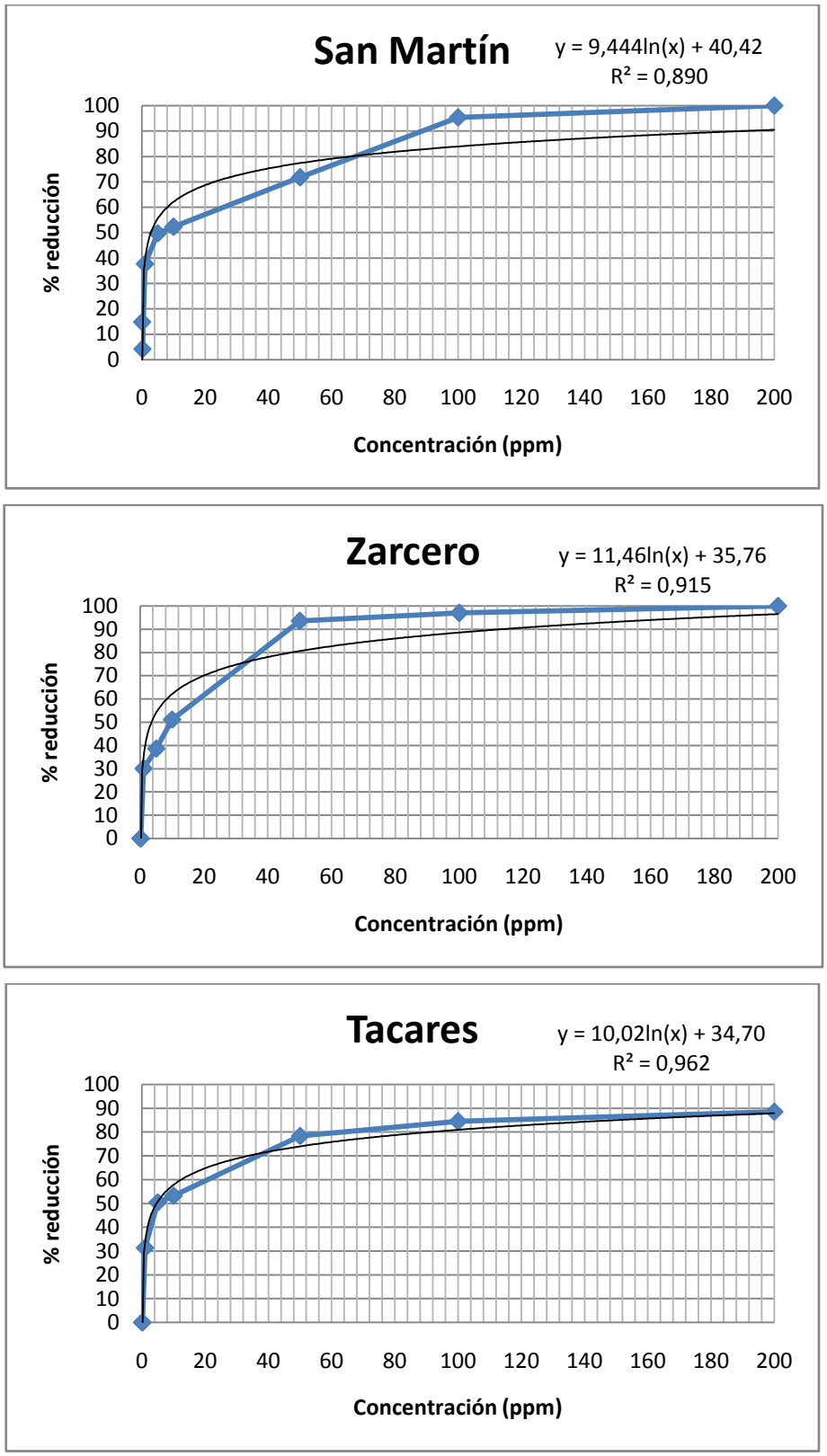
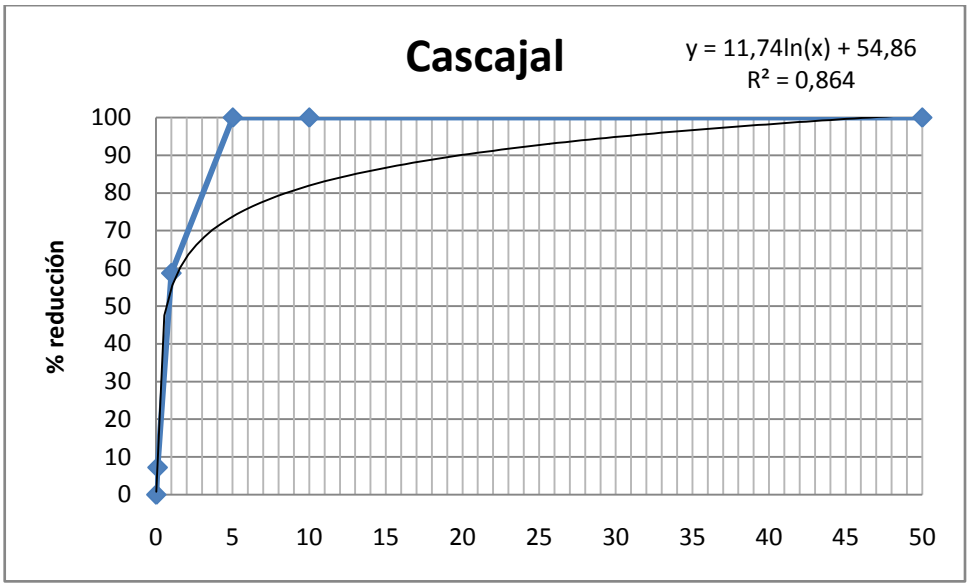


Figura 4. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a los aislamientos comerciales en función de la concentración del fungicida pyraclostrobin en un periodo de cinco días.



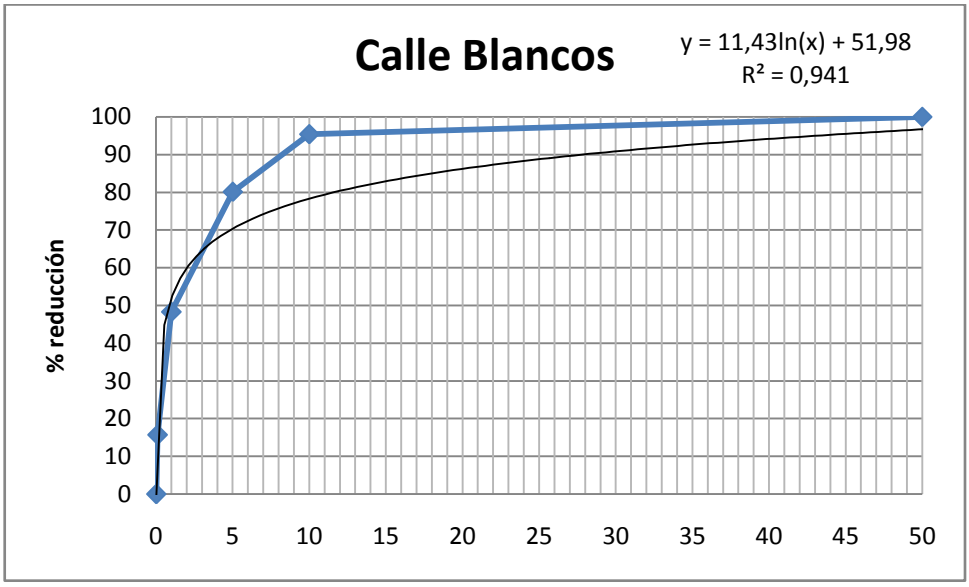


Figura 5. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de B. cinerea correspondiente a los aislamientos silvestres en función de la concentración del fungicida iprodione en un periodo de cinco días.

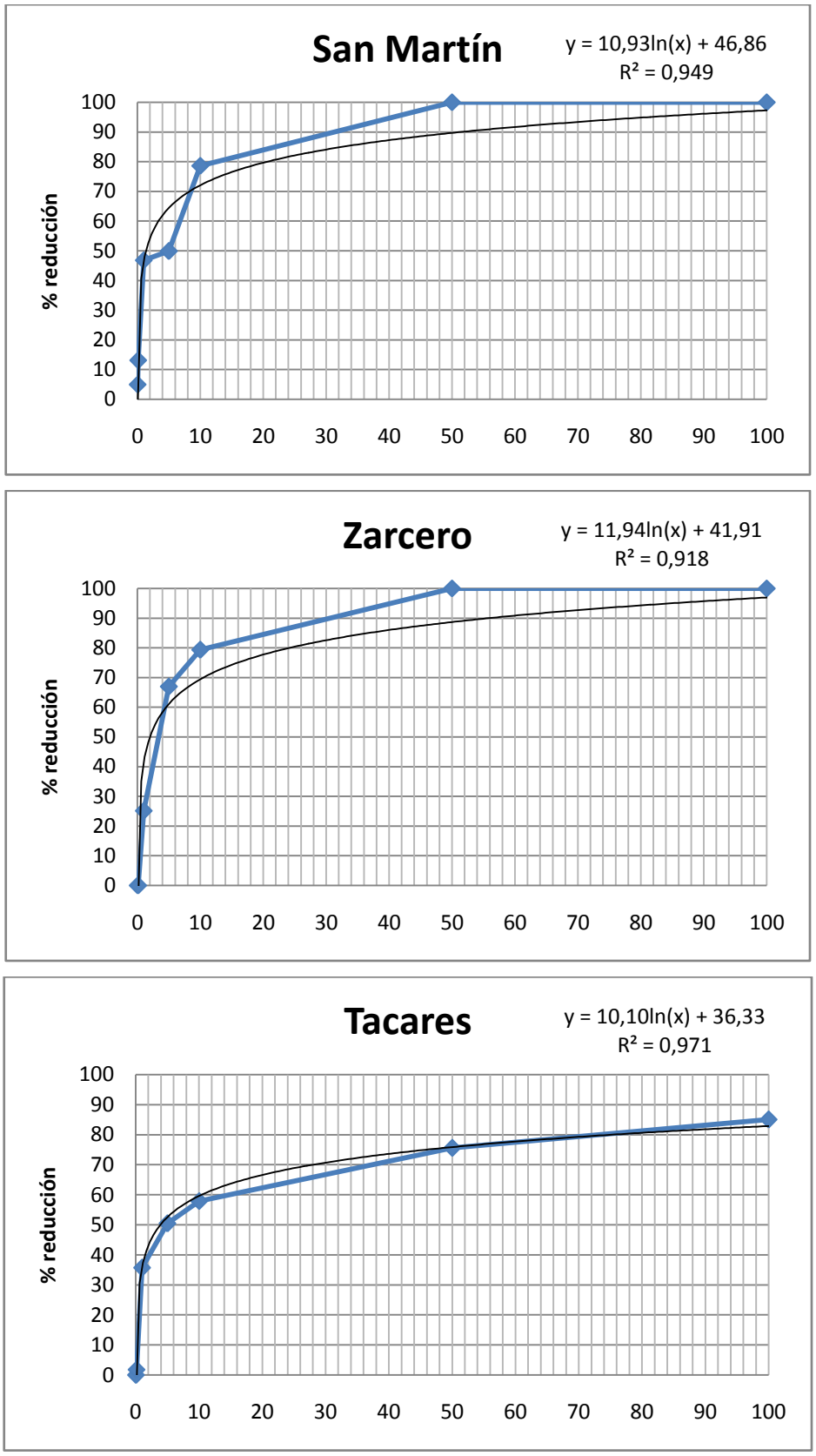
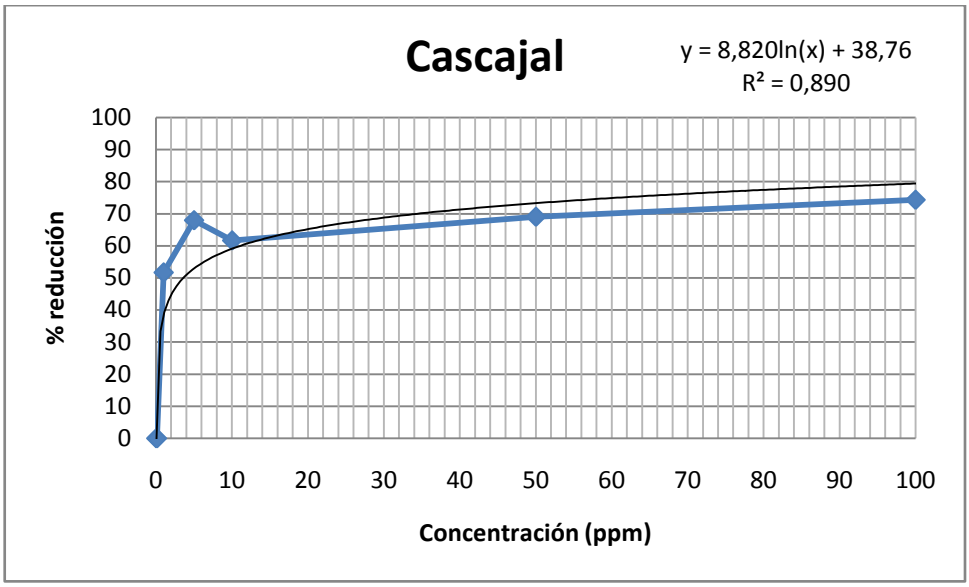


Figura 6. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de B. cinerea correspondiente a los aislamientos comerciales en función de la concentración del fungicida iprodione en un periodo de cinco días.



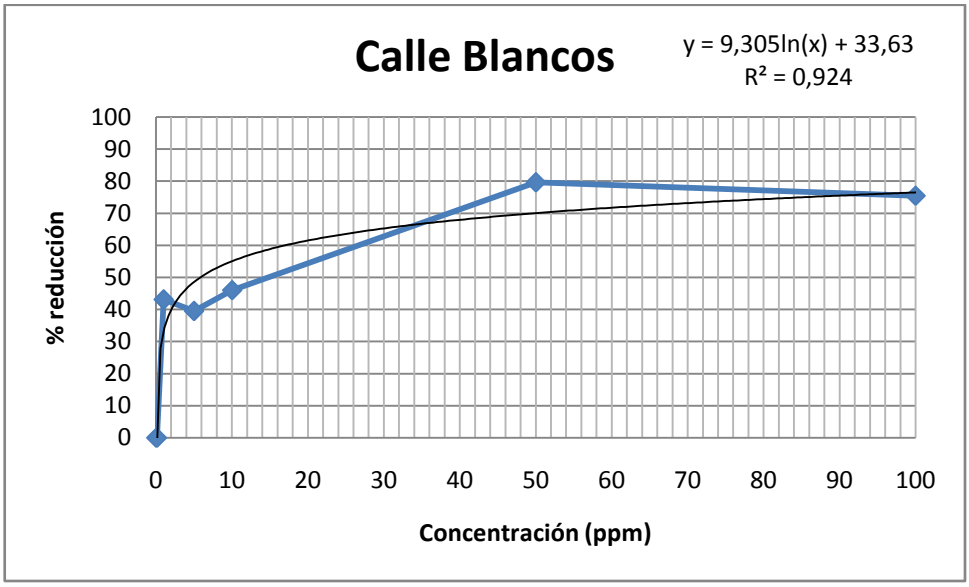


Figura 7. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a los aislamientos silvestres en función de la concentración del fungicida pirimetanil en un periodo de cinco días.

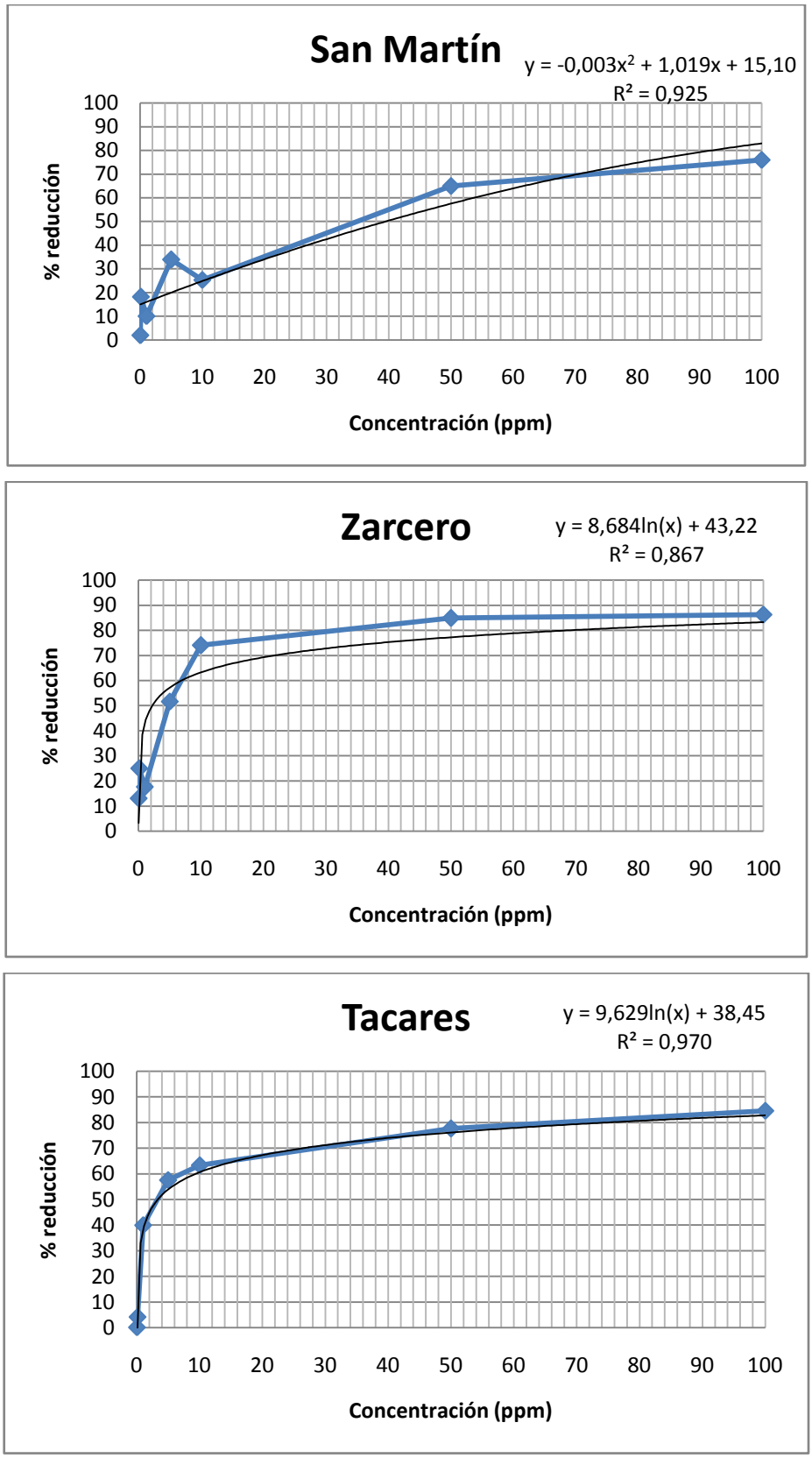


Figura 8. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a los aislamientos comerciales en función de la concentración del fungicida pirimetanil en un periodo de cinco días.

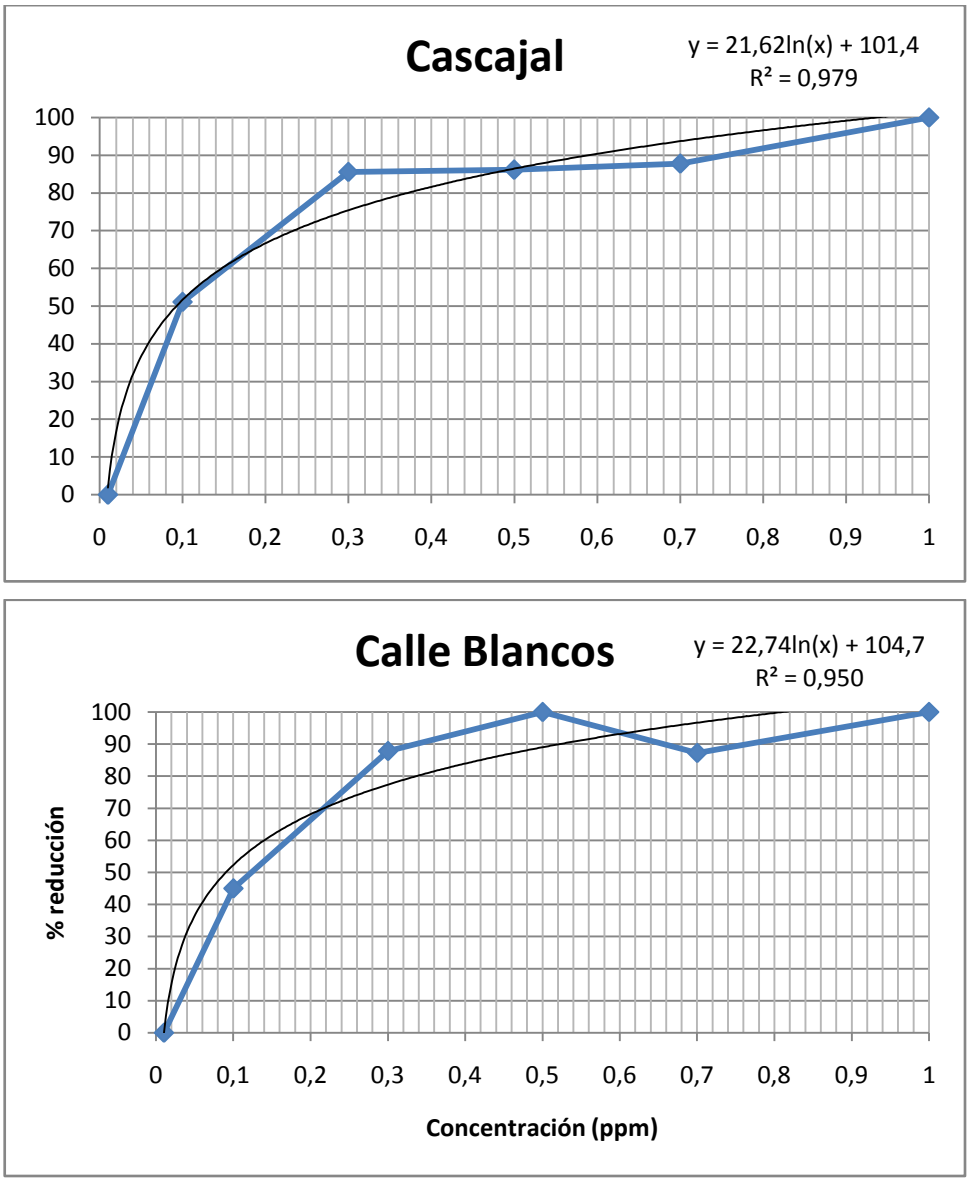
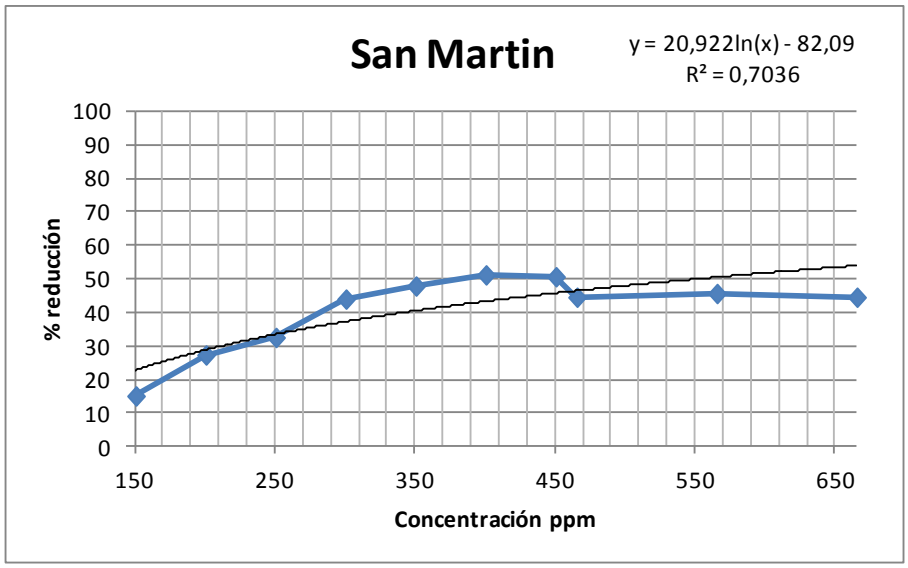
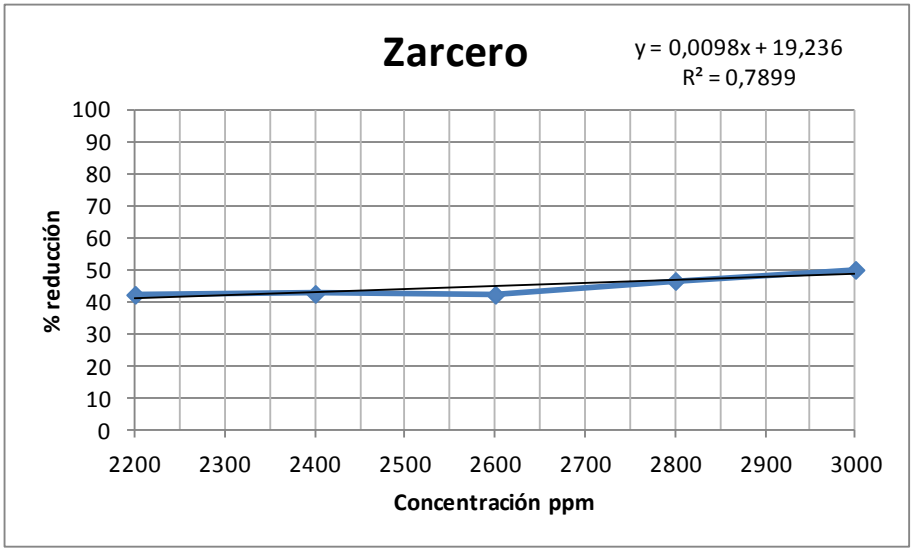


Figura 9. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a los aislamientos silvestres en función de la concentración del fungicida carbendazim en un periodo de cinco días.





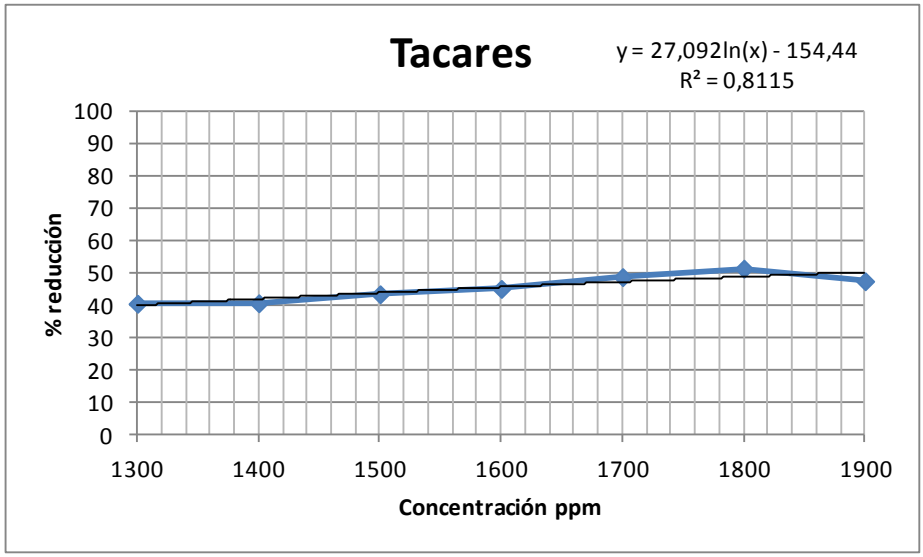


Figura 10. Porcentaje de reducción del crecimiento de micelio de *B. cinerea* correspondiente a los aislamientos comerciales en función de la concentración del fungicida carbendazim en un periodo de cinco días.