

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**SENSIBILIDAD DE *Botrytis cinerea* Pers. A FUNGICIDAS
DICARBOXIMIDAS Y BENZIMIDAZOLES EN DOS REGIONES
PRODUCTORAS DE FRESA DEL ESTADO DE MICHOACÁN**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

PRESENTA:

ADÁN ÁLVAREZ MEDINA

CHAPINGO, MÉXICO, JUNIO DE 2010



**SENSIBILIDAD DE *Botrytis cinerea* Pers. A FUNGICIDAS DICARBOXIMIDAS Y
BENZIMIDAZOLES EN DOS REGIONES PRODUCTORAS DE FRESA DEL ESTADO
DE MICHOACÁN**

Tesis realizada por **Adán Álvarez Medina**, bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

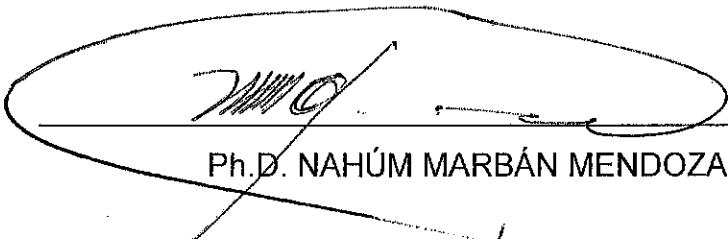
COMITÉ ASESOR:

DIRECTOR:



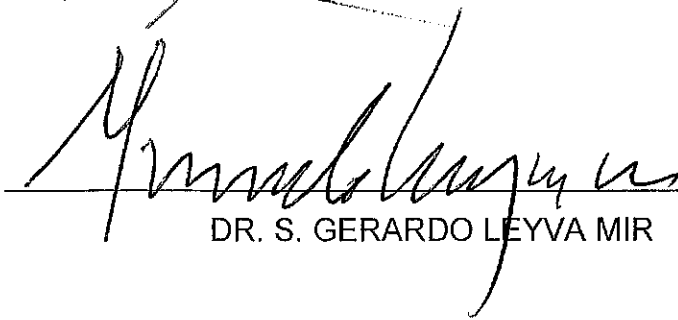
Ph.D. ÁNGEL REBOLLAR ÁLVITER

ASESOR:



Ph.D. NAHÚM MARBÁN MENDOZA

ASESOR:



DR. S. GERARDO LEYVA MIR

Chapingo, México, Junio de 2010

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el financiamiento brindado para la realización de los Estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola, por haber contribuido en mi Formación Profesional

Al Dr. Angel Rebollar Alviter por su acertada dirección, asesoramiento y tiempo dedicado a la realización de este trabajo de investigación.

A los Doctores Nahum Marbán Mendoza y Gerardo Leyva Mir por su valioso apoyo, aportaciones y sugerencias en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por su colaboración en la fase de Identificación Molecular del patógeno.

Al personal del Centro Regional Universitario Centro Occidente (CRUCO) y del Laboratorio de Fitopatología de Parasitología Agrícola por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo de tesis

DEDICATORIA

A mis padres: Sra. Ma. Trinidad Medina de Álvarez y Sr. Alfredo Álvarez Magaña, por darme la vida, por el apoyo, comprensión y, sobre todo por el sacrificio que me han brindado a lo largo de mi vida. Sé que sin ellos no hubiera sido posible mi formación profesional y el logro de mis objetivos. Estaré agradecido eternamente, todo lo que soy se los debo a ustedes.

A mis hermanos: Nancy, Felipe, Javier, Juan, Ismael, Sergio y Everardo, por el apoyo incondicional que siempre nos hemos brindado, por estar juntos en los buenos y malos momentos, y por haberme enseñado que la familia es uno de los principales valores.

A mis Sobrinos Jesús, Daniel, Alfredo, Lizbeth, Suzeth, Salud, Montserrat y Marco.

A mis amigos y compañeros de Licenciatura y Maestría por todos los momentos compartidos, es un espacio pequeño para mencionarlos a todos, pero de antemano saben que se les aprecia.

A la persona que ha permanecido conmigo durante un tercio de nuestras vidas, por su amor, comprensión, compañía y por tener un gran corazón... ALMA.

DATOS BIOGRAFICOS

Adán Álvarez Medina nació un 30 de Octubre de 1981 en Puruándiro, Michoacán, donde realizó su educación básica.

Para 1996 ingresa al departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo donde curso durante tres años el nivel medio superior. Para el mes de julio de 2001 ingresa al Departamento de Fitotecnia de la misma universidad para cursar la carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia; egresando de ésta en junio de 2005 y titulado con la tesis profesional "Relación entre pruebas de calidad fisiológica en semillas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con el establecimiento en Almácigo".

De 2005 a 2007 participa en la Secretaría de la Reforma Agraria como Prestador de Servicios Profesionales en la Dirección de Catastro Rural, laborando en las delegaciones de Veracruz y Chiapas. En Agosto de 2007 ingresa al programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, de la cual egreso en Julio de 2009 y que como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias elaboró el presente trabajo de investigación "Sensibilidad *in vitro* de *Botrytis cinerea* a fungicidas benzimidazoles y dicarboximidas en dos regiones productoras de fresa del Estado de Michoacán".

Actualmente se encuentra laborando para la empresa Syngenta Agro S.A. de C.V. como Consultor Técnico para la zona centro del país en el área de Desarrollo e Investigación.

INDICE GENERAL

	Pág
INDICE DE CUADROS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISION DE LITERATURA.....	4
3.1. El cultivo de fresa (<i>Fragaria X ananassa</i>).....	4
3.1.1. Generalidades.....	4
3.1.2. Variedades.....	5
3.1.3. Importancia mundial y nacional.....	7
3.1.4 Importancia Estatal.....	9
3.2. Moho gris de la fresa (<i>Botrytis cinerea</i> Pers.).....	10
3.2.1. Importancia y distribución.....	10
3.2.2. Agente causal, morfología y taxonomía.....	11
3.2.3 Identificación y diagnóstico con técnicas moleculares.....	12
3.2.4. Ciclo biológico de la enfermedad.....	14
3.2.5 Variabilidad genética de <i>Botrytis cinerea</i>	15
3.2.6. Interacción Planta-Patógeno.....	17
3.2.7. Manejo de la enfermedad.....	18
3.3. Resistencia a fungicidas.....	20
3.3.1. Mecanismos de resistencia a fungicidas.....	22
3.3.2. Monitoreo de la resistencia a fungicidas.....	24
3.3.2.1. Ensayos de sensibilidad <i>in vitro</i>	25
3.3.2.2. Evaluación de los ensayos de sensibilidad <i>in vitro</i>	26
3.4. Fungicidas Benzimidazoles y Dicarboximidas.....	28

3.5. Resistencia de <i>Botrytis cinerea</i> a fungicidas benzimidazoles y dicarboxamidas.....	30
3.5.1. Antecedentes de estudios sobre resistencia de <i>Botrytis cinerea</i> a fungicidas en México.....	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
4.1. Descripción del sitio experimental.....	35
4.2. Colecta y obtención de aislamientos monospóricos de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	36
4.2.1. Aislamiento del patógeno.....	36
4.2.2. Obtención de cultivos monospóricos.....	37
4.3. Identificación morfológica y molecular.....	39
4.3.1. Identificación morfológica.....	39
4.3.2. Identificación molecular.....	39
4.3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
4.3.2.2. Electroforésis.....	40
4.3.2.3. Limpieza del ADN.....	41
4.3.2.4. Secuenciación del ADN y comparación en el GenBank...	41
4.4. Fungicidas evaluados.....	42
4.5. Ensayo de sensibilidad <i>In vitro</i>	42
4.5.1. Ensayo de crecimiento micelial.....	43
4.5.2. Ensayo de germinación de conidios.....	44
4.6. Análisis de datos.....	45
4.6.1. Estimación de la concentración efectiva (EC ₅₀).....	45
4.6.2. Distribución de la Sensibilidad.....	46
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
5.1. Identificación morfológica de aislamientos.....	47
5.2. Identificación molecular de aislamientos.....	47
5.3. Ajuste del modelo estadístico.....	48
5.4. Distribución de la sensibilidad de cepas de <i>Botrytis cinerea</i> a	

iprodiona.....	49
5.5. Distribución de la sensibilidad de cepas de <i>Botrytis cinerea</i> a tiofanato metílico.....	55
6. CONCLUSIONES.....	61
7. LITERATURA CITADA.....	63
8. ANEXO.....	69

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Producción, valor, rendimiento y superficie sembrada de fresa por entidad federativa en 2008.....	8
Cuadro 2 Fungicidas recomendados para el control de <i>Botrytis cinerea</i> en fresa.....	19
Cuadro 3 Aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> usados en el estudio, cultivar y zona geográfica de donde fueron aislados.....	38
Cuadro 4 Comparación de secuencias obtenidas con las depositadas en GenBank.....	48
Cuadro 5 Estadística básica y momentos de los valores de DE ₅₀ (µg/ml) en micelio y conidios de <i>B. cinerea</i> obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora para el fungicida Iprodiona.....	50
Cuadro 6 Estadística básica y momentos de los valores de DE ₅₀ (µg/ml) en micelio y conidios de <i>B. cinerea</i> obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora para el fungicida Tiofanato metílico.....	56

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Ciclo biológico de <i>Botrytis cinerea</i>	15
Figura 2 Obtención de cultivos monosporicos de <i>Botrytis cinerea</i>	37
Figura 3 Realización de PCR (Polymerase Chain Reaction).....	42
Figura 4 Conidióforo y conidios de <i>Botrytis cinerea</i> obtenidos de aislamientos de fresa.....	47
Figura 5 Curvas respuesta típicas para aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> (Crecimiento relativo de micelio) en la prueba de micelio- iprodiona y sus residuales asociados.....	49
Figura 6 Distribución de la sensibilidad de micelio de <i>B. cinerea</i> obtenidos de frutos de fresa a iprodiona.....	54
Figura 7 Distribución de la sensibilidad de conidios de aislamientos de <i>B. cinerea</i> a iprodiona.	55
Figura 8 Distribución de la sensibilidad de micelio de aislamientos de <i>B. cinerea</i> al fungicida tiofanato metílico.....	58
Figura 9 Distribución de la sensibilidad de conidios de aislamientos de <i>B. cinerea</i> al fungicida tiofanato metílico.....	59
Figura 10 Inhibición del crecimiento micelial en <i>Botrytis cinerea</i> , aislamiento Z16b-1 en medio de cultivo PDA con diferentes concentraciones de Iprodiona.....	69
Figura 11 Inhibición de la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i> , aislamiento Z14a-1 en medio de cultivo AA con diferentes concentraciones de Iprodiona.....	70

SENSIBILIDAD DE *Botrytis cinerea* Pers. A FUNGICIDAS DICARBOXIMIDAS Y BENZIMIDAZOLES EN DOS REGIONES PRODUCTORAS DE FRESA DEL ESTADO DE MICHOACÁN

Alvarez-Medina, A.¹; Rebollar-Alviter, A.²; Marbán-Mendoza, N.³ y Leyva-Mir, S. G.³

RESUMEN

Se determinó la sensibilidad de *Botrytis cinerea* Pers aislado de fresa a fungicidas dicarboximidas (iprodiona) y benzimidazoles (tiofanato metílico) basada en el crecimiento de micelio y germinación de conidios. Se evaluaron 62 aislamientos monospóricos de dos regiones del Estado de Michoacán. La dosis efectiva que redujo en un 50% el crecimiento de micelio (DE₅₀) con iprodiona varió de 0.23 a 0.89 µg/ml para los aislamientos del Valle de Maravatío y de 0.22 a 3.0 µg/ml en el Valle de Zamora. La DE₅₀ para germinación de conidios vario de 0.47 a 16.8 µg/ml y de 0.59 a 22.60 µg/ml, en Maravatío y Zamora, respectivamente. La prueba de Kolmogorov indicó diferencias estadísticas ($P<0.001$) en la distribuciones de la sensibilidad de micelio entre zonas, sin embargo esta no fue diferente en la prueba de conidios ($P=0.47$). Para tiofanato metílico, la distribución de la sensibilidad fue muy dispersa. La DE₅₀ en micelio osciló de 0.11 a >2000 µg/ml en Maravatío y de 0.82 a > 3400 µg/ml en Zamora, mientras que en germinación de conidios fue de 0.02 a 892 µg/ml y de 0.01 a 2000 µg/ml, en Maravatío y Zamora, respectivamente. La distribución de la sensibilidad de micelio entre las dos zonas fue diferente ($P<0.002$; $Ks=1.86$) y la mediana de la ED₅₀ en Zamora fue 667 veces mayor que la de Maravatío, sin embargo no hubo diferencias significativas ($P=0.13$; $Ks=1.17$) entre las distribuciones de sensibilidad de los conidios, aunque la mediana fue 9 veces mayor en Zamora.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, sensibilidad, benzimidazoles, dicarboximidas.

¹ Estudiante de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

² Centro Regional Universitario Centro Occidente, Universidad Autónoma Chapingo.

³ Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

**SENSITIVITY OF *Botrytis cinerea* Pers TO DICARBOXIMIDE AND
BENZIMIDAZOLE FUNGICIDES IN TWO STRAWBERRY GROWING
REGIONS IN MICHOACAN STATE.**

Alvarez-Medina, A.; Rebollar-Alviter, A.; Marbán-Mendoza, N. y Leyva-Mir, S. G.

ABSTRACT

Sensitivity to dicarboximide (iprodione) and benzimidazole (thiophanate methyl) fungicides of 62 isolates of *Botrytis cinerea* Pers. isolated from strawberry fruits and plants from two different regions of Michoacan State were determined based on mycelium growth and conidia germination. The effective dose that reduced mycelium growth by 50% (DE₅₀) with iprodione ranged from 0.23 to 0.89 µg/ml for Maravatio Valley isolates, and 0.22 to 3.0 µg/ml for Zamora Valley isolates. For conidia germination the ED₅₀ ranged from 0.47 to 16.8 µg/ml and 0.59 to 22.60 µg/ml in Maravatio and Zamora, respectively. Kolmogorov-Smirnov two sample test indicated significant differences ($P < 0.001$) in sensitivity distributions of mycelium between regions, however there were no difference in conidia germination sensitivity distribution ($P = 0.47$). For thiophanate methyl, the distribution of sensitivity was very scattered. The ED₅₀-growth ranged from 0.11 to >2000 µg/ml in Maravatio and from 0.82 to >3400 µg/ml in Zamora, while ED₅₀-germ was 0.02 to 892 µg/ml and 0.01 to 2000 µg/ml, in Maravatio and Zamora, respectively. The distribution of the sensitivity of mycelium between the two areas was different ($P < 0.002$, $K_s = 1.86$) and median of the ED₅₀ was 667 times greater than that of Maravatio, however no significant differences ($P = 0.13$, $K_s = 1.17$) between the distributions of sensitivity of conidia, although the median was nine times higher in Zamora.

Keywords: *Botrytis cinerea*, sensitivity, benzimidazole, dicarboximide

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la fresa ha representado, desde hace más de 50 años, un incentivo a la economía nacional por ser un producto de exportación y de alta generación de divisas y porque le ha dado un importante carácter económico y social a las zonas productoras, principalmente a los estados de Michoacán, Baja California y Guanajuato (SAGARPA, 2009).

La fresa como cualquier otra planta, está expuesta al ataque de plagas y enfermedades, siendo éstas últimas de mayor importancia y una de las limitantes principales en la producción de fresa en México. Las enfermedades más frecuentes que se presentan en las regiones productoras de fresa son la secadera (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Rhizoctonia* sp., *Verticillium* y *Alternaria* sp.), antracnosis (*Colletotrichum* sp.), peca de la hoja (*Ramularia tulasnei*), pudrición de la corona (*Phytophthora cactorum*), pudrición roja de la raíz (*Phytophthora fragariae*), moho gris (*Botrytis cinerea*), cenicilla (*Sphaerotheca macularis*), mancha angular (*Xantomonas fragariae*), virus y phytoplasmas (Mendoza, 1987).

El hongo *Botrytis cinerea* ataca un gran número de cultivos, principalmente frutas y hortalizas. Este patógeno ocasiona enfermedades en pre y postcosecha en al menos 230 especies vegetales, en donde sus daños alcanzan magnitudes muy considerables (Ma y Michailides, 2005). En el cultivo de fresa ocasiona el moho gris de los frutos. Es un patógeno muy importante en cualquier lugar donde se cultivan fresas. A menudo puede encontrarse en frutos verdes, cercanos a la cosecha y posterior a la misma. Cuando las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad, las pérdidas pueden ser muy severas. *B. cinerea* también puede atacar las hojas y peciolo, así como las yemas florales y pétalos (Maas, 1984).

El control del moho gris está basado en la integración de varias prácticas culturales, además del uso de fungicidas de diferentes grupos químicos. Hasta la década de los 90s, el control químico de la enfermedad se centraba

por el uso de fungicidas con modo de acción específico como benzimidazoles, dicarboximidas y *N*-fenilcarbamatos, mientras que los inhibidores multiespecíficos como clorotalonil, dichofluanid, iminactodine y captan eran usados solo en mezclas de tanque o en rotación con los primeros, dado que su eficacia es baja cuando son aplicados solos. Sin embargo, el uso intensivo de fungicidas benzimidazoles y dicarboximidas ha traído la rápida generación de cepas resistentes a uno o a ambos grupos de fungicidas en muchas partes del mundo (Myresiotis, et al, 2007). Existen numerosos reportes de resistencia de *B. cinerea* a fungicidas benzimidazoles y dicarboxamidas (Northover, 1986; La Mondia, 1998; Yourman, 1999; Lennox, 2003; Tremblay, 2003; Li et al, 2007; Banno et al, 2008) así como a otros grupos químicos como QoI (Inhibidores externos de la quinona), anilopirimidinas, hidroxianilidas y fenilpirroles (Myresiotis, 2007, Hilber and Maja, 1998).

B. cinerea presenta una alta variabilidad genética entre poblaciones, aspecto que lo clasifica como un organismo con altas posibilidades de generación de resistencia (Elad, et al., 2007). Considerando que el cultivo de fresa ha sido cultivado en México desde hace varias décadas, en el cual se han usado fungicidas de diferentes grupos químicos, entre ellos los benzimidazoles y dicarboxamidas y ante los reportes de falta de eficacia por algunos productores de las principales zonas productoras de fresa en Michoacán, se realizó la presente investigación con los siguientes:

2. OBJETIVOS

- Estimar la DE_{50} (Dosis efectiva del fungicida que reduce el crecimiento micelial o germinación de conidios en un 50%) de los aislamientos de *B. cinerea* colectados en el Valle de Zamora y el Valle de Maravatío.
- Determinar y comparar la distribución de la sensibilidad *In vitro* de cepas monospóricas de *Botrytis cinerea* Pers. aisladas de frutos de fresa provenientes de dos regiones del Estado de Michoacán a fungicidas dicarboxamidas (Iprodiona) y benzimidazoles (Tiofanato metílico).

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. El cultivo de fresa

El cultivo de la fresa, *Fragaria X ananassa* Duchesne, es de origen relativamente reciente. La fresa moderna es producto de la hibridación *F. chiloensis* (L.) y *F. virginiana* Duchense, realizada alrededor de 1750 en Europa (Maas, 1987).

3.1.1. Generalidades

Las fresas y los fresones pertenecen a la familia Rosaceae y al género *Fragaria*. La planta es pequeña, de no más de 50 cm de altura, con numerosas hojas trilobuladas de pecíolos largos, que se originan en una corona ó rizoma muy corto, que se encuentra a nivel del suelo y constituye la base de crecimiento de la planta, en ella se encuentran tres tipos de yema; unas originan mas tallos, que crecen junto al primero, otras los estolones, que en contacto con el suelo emiten raíces y forman nuevas plantas, y el tercer tipo de yemas, forman los racimos florales cuyas flores son hermafroditas y se agrupan en racimos (Maas, 1987).

Lo que se conoce como fresa, es en realidad un falso fruto, producto del engrosamiento del receptáculo floral; sobre ese falso fruto se encuentran gran cantidad de semillas pequeñas, que son frutos verdaderos llamados aquenios. Las raíces de la fresa son fibrosas y poco profundas. La planta de fresa es perenne, ya que por su sistema de crecimiento, constantemente está formando nuevos tallos, que la hacen permanecer viva en forma indefinida (Maas, 1987).

El tallo está constituido por un eje corto de forma cónica llamado "corona", en el que se observan numerosas escamas foliares. Las hojas aparecen en roseta y se insertan en la corona.

Son largamente pecioladas y provistas de dos estípulas rojizas. Su limbo está dividido en tres folíolos pediculados, de bordes aserrados, tienen un gran número de estomas (300 a 400 /mm²), por lo que pueden perder gran cantidad de agua por transpiración.

El sistema radical es fasciculado, se compone de raíces y raicillas. Las primeras presentan cambium vascular suberoso, mientras que las segundas carecen de éste, son de color más claro y tienen un periodo de vida corto, de algunos días o semanas, en tanto que las raíces son perennes. Las raicillas sufren un proceso de renovación fisiológico, aunque influenciados por factores ambientales, patógenos del suelo, etc., que rompen el equilibrio. La profundidad del sistema radicular es muy variable, dependiendo entre otros factores, del tipo de suelo y la presencia de patógenos en el mismo. En condiciones óptimas pueden alcanzar los dos o tres metros, aunque lo normal es que no sobrepasen los 40 cm, encontrándose la mayor parte (90 %), en los primeros 25 cm.

3.1.2. Variedades

Se conocen en el mundo más de 1000 variedades de fresa, fruto de gran capacidad de hibridación que es característico de la especie (www.infoagro.com, 2007).

Dentro de las variedades que se cultivan en México, y conforme lo reporta el CONAFRESA (2008)⁴, se tienen a las siguientes:

Albion: Esta es una de las variedades de mayor importancia en Michoacán, es precoz y los productores la catalogan como muy buena. Esta variedad es de reciente introducción a México, ya que se conoció apenas en el 2006 y tiene

⁴ CONAFRESA (Consejo Nacional de la Fresa, A.C). 2008. Variedades de fresa utilizadas en México. Sistema Producto Fresa en línea: <http://conafresa.com/index.php>.

una demanda ascendente. Su fruta es de muy buena calidad tanto para exportación como para el mercado nacional.

Aromas: Esta es una variedad precoz y es otra de las que ya han sido usadas en el pasado, pero su aceptación va en descenso. Los productores mencionan que es una variedad muy susceptible a las deformaciones, por lo que está siendo rechazada por el mercado.

Camarosa: Ha sido una de las variedades que se ha aprovechado por aproximadamente 10 años, aunque en la actualidad su demanda va en descenso, ante la entrada de nuevos y mejores materiales. Sus proveedores, la describen como variedad de día corto, con excepcional adaptación climatológica y que su fruto es de extraordinaria calidad y sabor también mencionan que el 60% de la producción mundial corresponde a esta variedad.

Camino real: Los productores de fresa en México la consideran de buena calidad, como variedad tardía (comienza a producir a mediados de noviembre), se describe como planta de porte pequeño y erecto lo que permite grandes densidades de plantación por hectárea y bajo buen manejo produce buen volumen de fruta. Se menciona que es de buen tamaño, firmeza y calidad de fruta y se le atribuye tolerancia a condiciones climáticas, plagas y enfermedades como la pudrición por *Verticillium*, *Phytophthora* y antracnosis.

Festival: Actualmente esta es una de las variedades líderes en las regiones productoras de los estados de Guanajuato, Michoacán y Estado de México. Produce fruta abundante y de excelente calidad, tanto para consumo en fresco como para la industria. Generada en la Universidad de Florida, USA.

Sweet Charlie: Variedad de fruta grande, muy usada en el estado de Guanajuato, pero no se usa en Michoacán porque se menciona que es de

consistencia blanda (aguada), muy susceptible al manejo. Generada en la Universidad de Florida, USA.

Tioga. Su adaptación es excelente. Es la de mayor distribución mundial. La producción anual depende mucho del manejo y época de siembra. Normalmente está entre 30 y 60 ton ha⁻¹ y entre el 50 y 60 % de la fruta cumple las normas de exportación. Es una variedad un poco tardía ya que alcanza la máxima producción a los siete meses si la planta es importada; si es nacional, su máxima producción es a los cuatro meses. El tamaño de fruto es grande, consistente y resiste bien al transporte.

Ventana: Existe información de que esta variedad tiene muy buena aceptación para su cultivo en Baja California por su precocidad y que en esa entidad se usa en mayor proporción que el resto de variedades; se menciona que no se ha adaptado muy bien a las condiciones de los estados productores del centro del país, particularmente en Michoacán, sin embargo algunos productores mencionan que en condiciones muy locales, les está dando buenos resultados. La Producción de estolones de esta variedad es muy reducida, por lo que produce poca planta, sin embargo las plantas que produce son muy vigorosas y buenas productoras de fresa. De igual manera que en Baja California, esta variedad se comporta de manera precoz en el estado de Michoacán.

3.1.3. Importancia mundial y nacional

A nivel mundial, en el año 2006, se tuvo una producción total de 3, 548,290 ton de fresa, donde los tres principales países productores en orden de importancia fueron: Estados Unidos de América, con una producción de 1,004, 160 ton que representa el 28.3 % de la producción total; España con alrededor de 288,100 ton (8.1 %), y Japón con 198,200 ton que representa el 5.6 % del total de la producción. México, se sitúa como el octavo país productor, con 150,

260 toneladas, es decir, participa con 4.2 % de la producción mundial (FAOSTAT, 2006).

En lo que respecta a la producción nacional, Michoacán, Baja California y Guanajuato aportan el 91.3% de la producción (42.5, 39.3 y 9.5%, respectivamente). Baja California obtiene los mejores rendimientos con un promedio de 51.96 ton/ha (Cuadro 1).

Es muy importante mencionar que el periodo de cosecha de la fresa en México, varía de una entidad a otra, así tenemos que el estado de Baja California y Guanajuato, cosecha a partir del mes de enero; Guanajuato concluye en julio y Baja California en agosto. Michoacán y el estado de México tienen el mismo periodo de cosecha, entre los meses de noviembre a junio. Sin embargo, es importante mencionar que en Michoacán, utilizando la tecnología del macro túnel la producción se prolonga hasta el mes de agosto. Actualmente existen más de 500 Ha con este sistema (CONAFRESA, 2008).

Cuadro 1. Producción, valor, rendimiento y superficie sembrada de fresa por entidad federativa en 2008.

Entidad Federativa	Superficie sembrada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	Valor de la producción (miles de pesos)	Participación (%)
Baja California	1,355.00	70,410.70	51.96	580,680.57	39.30
Michoacán	3,215.00	106,905.85	33.25	637,267.46	42.50
Guanajuato	1,055.00	18,065.80	17.24	137,448.30	9.50
México	244.00	5,068.00	20.77	36,242.80	2.5
Otros	318.50	8,481.90	16.4	91,184.80	6.20
Total	6,214.00	208,932.25	33.86	1,482,823.93	100.00

Fuente: SIAP-SAGARPA, 2009.

3.1.4. Importancia Estatal

Para el Estado de Michoacán, el cultivo de la fresa se ha convertido en una actividad productiva y con gran futuro en el desarrollo de la economía notable, tanto por el aumento en los niveles de producción, industrialización y ampliación de la infraestructura productiva, como por el número de empleos que genera en la época de cosecha y de las diversas actividades que se desarrollan en torno a la agroindustria, comercialización y abastecimiento (Medina y Aguirre, 2007).

Las regiones productoras de Michoacán son los Valles de Zamora y Maravatío, donde se ubica la mayor parte de los 1994 productores de fresa con que cuenta el Estado de acuerdo a información de la SAGARPA-MICHOACÁN (2008)⁵. Donde la producción de fresa se destina en un 30% al mercado nacional y el 70% al mercado internacional Estados Unidos de Norteamérica, Inglaterra, Italia, Alemania, Francia y Japón.

El Valle de Zamora es la región más importante en cuanto a superficie cultivada de fresa, volumen de producción, mano de obra empleada y número de empresas agroindustriales procesadoras establecidas. Dentro de los municipios freseros del Valle de Zamora, de acuerdo a la superficie sembrada en el ciclo 2008, fueron en orden de importancia: Zamora, Jacona, Tangancícuaro e Ixtlán con 1,084, 600, 300 y 220 hectáreas, respectivamente. (SIAP-SAGARPA, 2009).

⁵ SAGARPA - MICHOACÁN. 2008. Delegación de la SAGARPA en el Estado de Michoacán. En línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/dlg/michoacan/agricultura/fomento/cultivos/html>.

3.2. - Moho gris de la fresa (*Botrytis cinerea* Pers.)

3.2.1. Importancia y distribución

Botrytis cinerea y otras especies de *Botrytis* son patógenos de viveros de plantas, hortalizas, ornamentales, frutales y de productos agrícolas almacenados y en transporte. Se requiere de esfuerzos considerables para proteger ciertos cultivos contra *Botrytis* antes y después de la cosecha. El mercado de productos anti – *Botrytis* oscila entre los 15-25 millones de dólares anuales en épocas recientes. La intensidad de las medidas para su control continúan sin cesar a través de los últimos 20 años pero el entendimiento de los procesos que gobiernan el ciclo de vida, patogenicidad y epidemiología ha aumentado considerablemente. Elad et al. (2007) reporta que tiene 235 hospedantes que se agrupan en una amplia gama de familias. Otras especies de *Botrytis* tienen un solo hospedante o un número limitado de ellos.

En los últimos 125 años, *B. cinerea* ha sido estudiado por un numero de especialistas que se incrementa constantemente, los cuales pertenecen a ramas de la ciencia tan variadas como química, bioquímica, biología molecular, genética, morfología, histología, taxonomía, ecología y epidemiología (Coley-Smith, 1980, citado por Elad et al, 2007).

Es un patógeno muy importante en cualquier lugar donde se cultivan fresas. A menudo puede encontrarse en frutos verdes, cercanos a la cosecha y posterior a la misma. Cuando las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad, las pérdidas pueden ser muy severas. *B. cinerea* también puede atacar las hojas y peciolo, así como las yemas florales y pétalos (Maas, 1984). En el campo, el tizón de las flores frecuentemente procede y conduce a la pudrición del fruto. El hongo se establece en los pétalos y ahí produce micelio y conidios, ambos capaces de infectar a los frutos recién formados, o maduros y a otros más por contacto. Los frutos y tejidos suculentos infectados adquieren una consistencia suave (acuosa) y un color café claro; luego la epidermis se

rompe y el hongo fructifica; finalmente, los tejidos se secan y se arrugan, estado en el cual se pueden formar esclerocios, superficialmente o hundidos en el fruto (Romero, 1993).

Es un patógeno de áreas templadas, aunque también ataca a especies vegetales en una amplia gama de climas que van desde los tropicales y subtropicales, hasta los fríos. La alta tasa de germinación de conidios, infección, crecimiento micelial y esporulación ocurre en muchas especies de *Botrytis* spp. bajo un amplio rango de condiciones micro climáticas y a nivel mundial frecuentemente se presentan problemas en el manejo de la enfermedad (Elad et al, 2007; Horst, 1997), El moho gris ocasionado por *B. cinerea* se encuentra distribuido en todo el mundo y tiene un gran número de hospedantes (Horst, 1997).

3.2.2. Agente causal, morfología y taxonomía

El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, 2009)⁶ clasifica a éste patógeno de la siguiente forma:

Dominio: Eucariota

Reino: Eumycota

Phyllum: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Orden: Helotiales

Familia: Sclerotiniaceae

Genero *Botrytis*

Especie: *B. cinerea*

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>

En medios de cultivo crece rápidamente, en PDA el cultivo es inicialmente blanquecino pero rápidamente se vuelve gris. Las hifas son ramificadas, septadas y hialinas. Los conidióforos son largos (hasta 5 mm), de color oscuro y ramificado de manera irregular o dicotómicamente y presentan una célula basal. Cerca del ápice de cada conidióforo se producen ramificaciones cortas y septadas donde se producirán los conidios. Cada ramificación presenta una ámpula en la cual los conidios se desarrollan sincronizadamente en finos denticulos. Los conidios (11 x 11 µm) usualmente son lisos, unicelulares, incoloros o de color gris, los cuales pueden ser elipsoides, ovoides o globosos. La etapa sexual (ascosporas) rara vez se ha encontrado en la naturaleza. Los esclerocios son negros, de forma irregular (1-5 mm de diámetro) y pueden ser producidos en medios de cultivo o en campo en los frutos infectados o en otras partes de la planta (Maas, 1984).

Frecuentemente se refiere a *B. cinerea* como un hongo inusualmente variable, debido a la existencia de diferentes tipos morfológicamente distintos. Usualmente estos son agrupados como miceliales, esporulantes (conidiales) y esclerotiales, pero se pueden reconocer subtipos. Típicamente, tales morfotipos son estables cuando son transferidos usando masas de inóculo, pero subcultivos originados de un solo conidio a menudo difieren de los padres y presentan diferentes habilidades para sobrevivir y dispersarse (Elad et al, 2007).

3.2.3. Identificación y diagnóstico con técnicas moleculares

La identificación adecuada de organismos patógenos de las plantas cultivadas es importante en la implementación de estrategias para el manejo y control de enfermedades. Particularmente se requiere la caracterización fenotípica y genética de los patógenos de plantas persistentes en un área determinada. La aplicación de técnicas moleculares, permite clarificar las relaciones genéticas de los grupos de hongos fitopatógenos, principalmente cuando los criterios

morfológicos de clasificación son variables. El uso de técnicas moleculares permite la identificación de organismos fitopatógenos de forma certera por estar basado en la composición del ADN (Calle, 2005).

Entre las técnicas disponibles para la identificación de patógenos, las técnicas basadas en los ácidos nucleicos son ampliamente reconocidas por ser las más exactas. Las técnicas de detección basadas en los ácidos nucleicos, particularmente aquellas que se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), son rápidas, específicas y altamente sensibles (Vincelli and Tisserat, 2008).

La amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleídos tiene una alta sensibilidad para diferenciar entre aislamientos, por ejemplo, se pueden discriminar con precisión diferentes cepas de *Fusarium oxysporum* o algún otro hongo. El uso de marcadores moleculares permite además procesar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo (Alves *et al.*, 2002).

White *et al.* (1990) citado por Calle (2005) diseñaron y describieron iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del rDNA mitocondrial y nucleico de hongos, abriendo la posibilidad de realizar estudios filogenéticos utilizando estos genes.

Freeman *et al.* (1998) realizaron la identificación molecular del agente causal de la pudrición de frutos de fresa con síntomas típicos de antracnosis y mediante la amplificación de Calnt2 e ITS4, lograron caracterizar y relacionar en un cien por ciento de similitud sus cepas con aislamientos almacenados en bases de datos correspondientes a *Colletotrichum acutatum*.

Los análisis moleculares se utilizan en la identificación de bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos, especialmente para géneros dentro de los cuales las especies tienen características morfológicas coincidentes entre ellas. La

detección o diagnóstico molecular podría ser más útil a partir de tejido vegetal y/o muestras de suelo directamente, además de que su uso en combinación con técnicas serológicas como ELISA, incrementan la sensibilidad y previenen problemas con inhibidores de productos PCR, tan comunes en plantas. Sin embargo, se necesitan de mayores avances, principalmente en el desarrollo de técnicas más confiables y disponibles para la extracción de ADN y/o ARN de tejido vegetal o suelo para emplear en laboratorios de diagnóstico (Martin *et al.*, 2000).

3.2.4. Ciclo biológico

El patógeno sobrevive en forma de esclerocios y micelio en las partes atacadas (residuos) en el suelo o sobre otras plantas, estos germinan en condiciones favorables y producen conidióforos y conidios que son liberados y que atacan plántulas a nivel del cuello y después infectan hojas, pecíolos, tallos, corona, flores y frutos. El micelio requiere de humedad y temperaturas de 18 a 23 °C para que se desarrolle, esporule, germinen las esporas y se produzca la infección. En general, la enfermedad se ve favorecida por los riegos pesados y bajo esas condiciones fácilmente infecta flores y frutos que están en contacto con el suelo. El patógeno es diseminado por el viento, el riego, el salpique de lluvia o por labores culturales (Mendoza y Pinto, 1985).

Puede existir como saprófito en restos de plantas. En plantaciones de fresa, en latitudes del norte, el hongo puede invernar en forma de esclerocios y micelio invernante en restos de plantas. Bajo condiciones favorables, el hongo produce masas de conidios, las cuales constituyen el inóculo primario. Los conidios son dispersados por corrientes de aire y salpique de agua (de lluvia o de riego). Cuando la planta florece, los tubos germinativos de los conidios penetran directamente en la epidermis senescente de los pétalos, sépalos, estambres o receptáculos florales. Una vez establecido en las partes florales, el hongo usualmente invade los frutos en desarrollo causando su pudrición o permanece

inactivo hasta que el fruto se encuentra en estado maduro o ha sido cosechado. Una vez establecido, el hongo puede comenzar una producción de esporas secundaria en pocos días, así la producción de inóculo es continua a través de la temporada de producción (Maas, 1984).

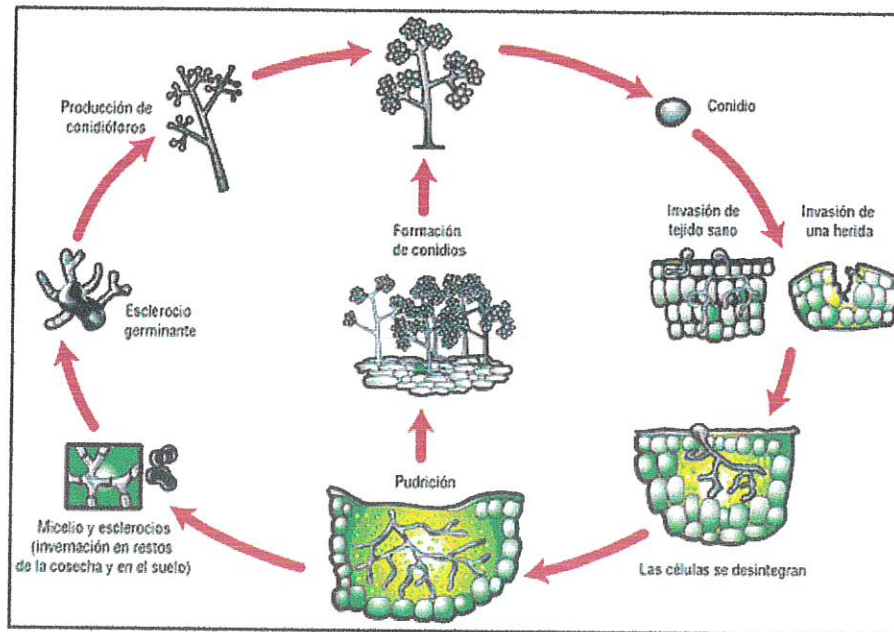


Figura 1. Ciclo biológico de *Botrytis cinerea* (www.bayercropscience.com.mx, 2007).

3.2.5. Variabilidad genética de *Botrytis cinerea*

Este hongo presenta una variabilidad genotípica y fenotípica extrema, así como una adaptabilidad excepcional. Giraud et al. (1997), citado por Milicevic et al. (2006) menciona que las causas de la variabilidad genotípica son: heterocariosis, heteroploidia, RNA de doble cadena y partículas parecidas a virus, así como elementos transposables. La variabilidad fenotípica es observada en la diferenciación morfológica y la resistencia a fungicidas. Este último es el mayor problema en la producción ya que dificulta el control químico del patógeno. El estado teleomórfico raramente aparece en la naturaleza, sin embargo, con el desarrollo de métodos para cultivarlo *in vitro*, se ha descubierto

la base genética del fenómeno de resistencia en la mayoría de fungicidas. Nuevas técnicas moleculares de PCR se han aplicado en la filogenia y especialización de poblaciones de este hongo, del cual ahora se sabe que existe al menos una especie uniforme, y más de un complejo de especies.

Las especies pueden ser divididas en dos poblaciones crípticas de acuerdo al contenido de elementos transposables: *vacuma* y *transposa*. Los elementos transposables son fragmentos de una molécula de ADN que pueden cambiar su posición dentro del genoma, es decir, cambian su posición o loci en el cromosoma, lo que ocasiona apariencias como: inactivación de genes, reactivación de pseudogenes, desordenes en la expresión génica y diferentes tipos de mutaciones (delección, inserción, inversión y traslocación).

Las especies simpátricas *vacuma* contienen dos elementos transposables: retrotransposon *Boty* (el cual tiene un peso de 6 kb, caracterizado por una terminal repetida, presente en múltiples copias en diferentes regiones del genoma), y el trasposon *Flipper* (el cual tiene 1842 pb, presente hasta en 20 copias por genoma), mientras que las poblaciones *transposa* no contienen ninguno de estos elementos. También existen otras dos sub-poblaciones que contienen solamente uno de estos elementos transposables: *Boty* o *Flipper*. Las investigaciones de elementos transposables en *Botryotinia fuckeliana* se han realizado en poblaciones aisladas de vid. Aun no es bien conocido como los elementos transposables están relacionados con el desarrollo de resistencia hacia fungicidas selectivos, especialización hacia las plantas hospedantes, y si existen diferencias morfológicas entre las sub-poblaciones simpátricas. Hasta ahora, no hay confirmación, aunque Giraud, (1999) aportó algunos datos concernientes a la conexión entre los elementos transposables y la especialización hacia plantas hospederas y la resistencia a fungicidas (Milicevic, et al., 2006).

En fresa, Milicevic, et al. (2006) encontró cuatro sub-poblaciones simpátricas, basadas en un análisis de elementos transposables: *transposa* (*Boty+ Flipper+*), *vacuma* (*Boty- Flipper-*), solo *Boty* (*Boty+ Flipper-*) y solo *Flipper* (*Boty- Flipper+*).

3.2.6. Interacción planta patógeno

La infección de plantas hospedantes por *Botrytis cinerea* es regulada por numerosas enzimas y metabolitos extracelulares. Cada uno de estos compuestos juega un papel importante en las diferentes etapas del proceso de infección. Algunas cutinasas, lipasas y enzimas degradadoras de la pared celular facilitan la penetración en la superficie del hospedero, mientras que toxinas, oxalato y oxígeno reactivo pueden contribuir a matar las células del hospedante. Varias enzimas que degradan la pared celular contribuyen a la conversión del tejido del hospedero en biomasa del hongo, pero también otras enzimas, como lacasas y proteasas están involucradas en la patogénesis. Muchas de estas enzimas actúan extracelularmente en la interface hongo-planta, generalmente cerca del punto de crecimiento de la hifa (Kars y van Kan, 2007).

El ciclo de la enfermedad comienza con la germinación del conidio sobre la superficie de hospedante, donde el tubo germinativo produce un apresorio que facilita la penetración de dicha superficie epidermal. Una vez que ha traspasado la cutícula, *B. cinerea* mata las células subepidermales antes de que sean invadidas por las hifas mediante la secreción de diferentes toxinas y ácido oxálico. Después que ha penetrado la pared celular epidermal, el hongo crece a través de la lamela y produce una gran variedad de enzimas degradadoras de la pared celular. Este proceso enzimático que destruye la pared celular libera carbohidratos, los cuales consume el patógeno. La degradación de la pared celular es mediada por pectinasas, celulasas y hemicelulasas, las cuales están

involucradas en diferentes etapas de la colonización y maceración del tejido vegetal (Kars y van Kan, 2007).

A través del curso de la interacción entre *B. cinerea* y su hospedante, la planta intenta defenderse contra la invasión del patógeno. Los mecanismos de defensa durante la invasión incluyen una respuesta hipersensitiva, lignificación de tejidos, biosíntesis de fito-alexinas y acumulación de proteínas. Estas respuestas de defensa pueden ser locales, restringidas al sitio de infección. La respuesta de defensa total resulta en una lesión necrótica primaria en la cual el hongo es restringido. Dependiendo del tipo de tejido atacado y de aspectos fisiológicos intrínsecos del hospedante, el crecimiento fungal entra en una fase LAG en la cual las lesiones no se expanden. Una proporción de las lesiones primarias eventualmente se pueden expandir. El patógeno no es muerto en las lesiones ya que el micelio puede recuperarse. Así, una defensa activa de la planta contribuye temporalmente a restringir al hongo, originando un periodo de quiescencia. Sin embargo no se conocen los factores que determinan la transición quiescencia-activo dentro del proceso de infección (Kars y van Kan, 2007).

3.2.7. Manejo de la enfermedad

Se deben realizar prácticas culturales, principalmente evitar los excesos de humedad, reduciendo las láminas de riego; mejorar el drenaje, utilizar surcos altos y mayor espaciamiento entre plantas; también es conveniente eliminar residuos y frutos atacados, rotación de cultivos, cubrir el suelo con polietileno (acolchado).

Para el control químico se recomienda el Vinclozolin (Ronilan), Fluazinam (Shogun), Fenhexamid (Elevat), Iprodiona (Rovral), Tiabendazol (Tecto 60), y Benomil (Benlate), aunque existe riesgo de crear resistencia con los dos últimos

productos. Existen otros productos menos específicos tales como el captan, Clorotalonil y Dyrene (Anilazina). Después de la cosecha se sugiere el lavado de la fruta con una solución al 1% de sal sódica del ácido dihidroacético, que permite que el fruto dure más tiempo sin podrirse. Asimismo, es conveniente elegir alguna variedad tolerante a esta enfermedad (Kirk *et al.*, 2001).

Cuadro 2. Fungicidas recomendados para el control de *Botrytis cinerea* en fresa.

N. COMERCIAL	I. A.	GRUPO QUÍMICO	Código FRAC	Riesgo de resistencia	DÓSI/HA.	I.S. (días9
Captan ®	Captan	Acción multisitio	M4	Bajo	3-4 kg	0
Bravo 720	Clorotalonil	Acción multisitio	M5	Bajo	1.5-2.5 L	
Cupravit®	Oxicloruro de cobre	Accion multisitio	M1	Bajo	2-4 kg	0
Rovral®	Iprodiona	Dicarboxamidas	2	Alto	1.5 kg	0
Switch®	Ciprodinil + Fludioxonil	Anilopirimidinas+ Fenil-pyrrol	9 + 12	Medio + medio	1.0 kg	0
Benomyl®	Benomilo	Benzimidazoles	1	Alto	0.6 - 1.0 kg	5
Cercobin M®	Tiofanato metílico	Benzimidazoles	1	Alto	0.7-1.0 kg	1
Elevat®	Fenhexamid	Hidroxi-anilidas	17	Bajo - medio	1.7-2.2 kg	0
Cabrio C ®	Pyraclostrobin + boscalid	Estrobilurina + carboxamida	11 + 7	Medio + Medio	0.8 kg	0
Scala	Pirimetanil	Anilopirimidinas	9	Medio	1.25-1.5 L	1
Bavistin DF	Carbendazim	Benzimidazoles	1	Alto	100-200 gr/100 L	2

Fuente: PLM, 2009; Syngenta, 2007.

3.3.- Resistencia a fungicidas

Brent y Derek (2007), mencionan que un fungicida antes de salir al mercado es probado en laboratorio e invernadero campo en diferentes tipos de patógenos, y después es probado en ensayos de campo en un amplio rango de enfermedades en diferentes regiones y países. Solamente si trabaja de manera uniforme a través de muchos ensayos y en varias temporadas es considerado para su introducción al mercado. Los patógenos sobre los que tiene acción son denominados "sensibles" y aquellos en los que no actúa se les denominan "naturalmente resistentes". Esta pre existencia de resistencia no es de interés práctico una vez que se ha identificado la limitación del rango de uso del nuevo fungicida.

La resistencia a fungicidas como tal se considera diferente, algunos la llaman "resistencia adquirida". Tarde o temprano durante los años de la vida comercial de un fungicida, pueden surgir poblaciones del patógeno que no son lo suficientemente sensibles al fungicida para controlarlo adecuadamente. Esto generalmente aparece como respuesta al uso repetido del fungicida, o al uso repetido de otro fungicida que presenta el mismo modo de acción químico o bioquímico. Algunas personas prefieren llamar a este fenómeno como "insensibilidad" o "tolerancia", principalmente son las compañías de agroquímicos las que utilizan estos términos porque suenan menos alarmantes que "resistencia" (Brent y Derek, 2007).

La aparición repentina de resistencia en una población de un patógeno puede, tener como resultado el fracaso del control de la enfermedad cuando no se reconoce en una etapa temprana y consecuentemente, graves pérdidas de la cosecha. Se define a la resistencia a fungicidas como el cambio hereditario de una célula fungosa o una población de un hongo a un fungicida, lo que resulta en una sensibilidad menor a lo normal hacia éste (Dekker, 1988).

Debido a la introducción de los fungicidas sistémicos para el manejo de enfermedades causadas principalmente por hongos, la incidencia de la resistencia creció y el tiempo de la aparición de esta es a menudo relativamente corto. Una vez que surge, se ha encontrado que la resistencia es heredable. Existen diferentes tipos de resistencia como: resistencia discreta, cuantitativa, cruzada y múltiple (Dekker, 1988).

El monitoreo se basa en el análisis de la respuesta de una población de un patógeno al uso del fungicida. Su principal objetivo es detectar a tiempo cualquier cambio de sensibilidad, para poder tomar así las medidas adecuadas para prevenir su desarrollo (Dekker, 1988).

Cuando un fungicida se lleva a nivel comercial se debe de tomar en cuenta el riesgo inherente de resistencia y tomar en cuenta si antes del uso del producto ya se encuentran poblaciones resistentes. Se debe dar seguimiento al comportamiento del hongo y del fungicida, así como observar el nivel de efectividad de este último (Rodríguez, 1985).

La resistencia de un organismo a un fungicida determinado es cuando su aplicación no causa el mismo efecto sobre las poblaciones del patógeno en las mismas concentraciones del fungicida. La resistencia ocurre cuando la reducción en eficacia se debe a la presencia de cepas resistentes del hongo, problema que inicialmente estuvo ausente. Este fenómeno afecta a la mayoría de los grupos químicos de fungicidas. Sin embargo, los casos más comunes son encontrados con los fungicidas sistémicos, los cuales frecuentemente poseen un sitio de acción bioquímica individual (compuestos de monositio) dentro de las células del hongo, son altamente efectivos, de efecto persistente y amplia distribución dentro de la planta, por lo cual ejercen una fuerte presión de selección.

Al presentarse el fenómeno de resistencia, existe un importante incremento en la frecuencia de las poblaciones del hongo con menor sensibilidad al producto químico (Brent y Derek, 2007; Rusell 1995; Staub, 1991).

La resistencia es una propiedad estable y hereditaria de un patógeno y se observa porque se reduce la sensibilidad a un fungicida. Esta una vez establecida en la población, puede permanecer por tiempo indeterminado o desaparecer rápidamente (Georgopoulus, 1995).

3.3.1.- Mecanismos de resistencia a fungicidas

El desarrollo de resistencia a un fungicida se debe a cambios en la célula del hongo que le impide al fungicida llegar al sitio de acción. Algunos cambios que pueden inducir resistencia según Dekker, (1988) son:

- Menor permeabilidad de las membranas celulares: Esta alteración impide que el fungicida alcance el sitio de acción disminuyendo el control de la enfermedad. En este caso los organismos resistentes escapan de la acción fungitóxica porque las membranas celulares no permiten la entrada del producto.
- Rutas metabólicas alternas: En este caso el tóxico toma otra ruta en los individuos resistentes esquivando los sitios de acción en el patógeno.
- Conversión a un compuesto inactivo (detoxificación): Ciertos patógenos tolerantes tienen la capacidad de convertir un fungicida específico en otra sustancia menos tóxica.
- Compensación: Es cuando un fungicida bloquea la producción de alguna enzima y esta es indispensable para la síntesis de algún compuesto vital en la vida del hongo; la producción de una mayor cantidad de enzima por

parte del hongo, anula la acción del fungicida; haciendo resistente al patógeno.

- Falta de activación del fungicida por el patógeno: En ciertos casos algunos productos no son fungicidas en sí mismos, sino que deben sufrir un cambio o metabolización (activación) dentro del patógeno para convertirse en fungitóxicos; los fungicidas a los que el patógeno ha desarrollado resistencia no sufren esta activación dentro del patógeno y por tanto escapan a la acción del producto.
- Alteración del sitio activo: Cuando un fungicida es de acción específica en un solo sitio del patógeno, como es el caso del benomil que actúa sobre la tubulina del ADN; una modificación en este sitio puede traer como consecuencia una falta de acople entre el patógeno y el fungicida y resultar en resistencia.

Dekker, 1988, Brent y Derek, 2007 presentaron las clases de resistencia siguientes:

Resistencia discreta: Se caracteriza por una repentina y marcada pérdida de efectividad y por la presencia de poblaciones sensibles y resistentes del patógeno, las cuales difieren ampliamente en su respuesta hacia el fungicida.

Resistencia cuantitativa: Se caracteriza por una pérdida lenta del control de la enfermedad y en la sensibilidad de la población del patógeno. A través de la disminución en el uso del fungicida y en la alternancia con fungicidas de diferente modo de acción. Esta resistencia puede ser revertida a poblaciones nuevamente sensibles.

Resistencia cruzada: Se presenta cuando las poblaciones de un patógeno en particular desarrolla resistencia a un fungicida y automática y simultáneamente

se hace resistente a otros fungicidas que son afectados por la misma mutación y por el mismo mecanismo de resistencia.

Resistencia múltiple: Algunos patógenos pueden poseer mecanismos de resistencia separados a dos o más fungicidas no relacionados. Estos han surgido a partir de mutaciones independientes que fueron seleccionadas por exposición a cada uno de los fungicidas.

3.3.2 Monitoreo de la resistencia a fungicidas

El primer paso para estudiar la resistencia a fungicidas es el monitoreo de esta en campo mediante el muestreo de poblaciones del patógeno para determinar su grado de sensibilidad a uno o más fungicidas. Esto es un área crucial de la investigación sobre resistencia, porque, virtualmente todo nuestro conocimiento de la distribución, evolución e impacto de resistencia en el campo depende del monitoreo (Brent y Derek, 2007).

El primer método consiste en realizar monitoreos al inicio de la introducción al mercado de un nuevo fungicida, y con esta información obtener líneas base de sensibilidad del patógeno antes de que se exponga al nuevo fungicida. Esta es la evaluación del rango "natural" de la sensibilidad, y es de enorme ayuda para la interpretación de cualquier monitoreo posterior en términos de posible pérdida de sensibilidad (Brent y Derek, 2007). Las líneas base de sensibilidad se definen como "un perfil de la sensibilidad de un hongo a un fungicida, construida usando técnicas biológicas o moleculares para evaluar la respuesta a poblaciones o individuos que no han sido expuestos al fungicida" (Russell, 2007). Son construidas mediante el muestreo de un cierto número de individuos o poblaciones y estableciendo la variabilidad entre ellos. Normalmente debe incluir la mayor variabilidad posible mediante un muestreo adecuado, mínimamente debe hacerse un muestreo en 20-50 sitios diferentes entre sí.

La línea base, como quiera que sea expresada, visualmente, matemáticamente o ambos, ilustrará dicha variabilidad.

Una segunda actividad para complementar el monitoreo de la resistencia, post-liberación comercial del fungicida con el objetivo de vigilar la posible pérdida del grado de sensibilidad en el control en campo (Brent y Derek, 2007) es el monitoreo posterior y constante mediante pruebas de sensibilidad *in vivo* o *in vitro* que deberán ser comparadas con las líneas base para determinar la posible pérdida de sensibilidad del patógeno hacia el fungicida.

Para monitorear la resistencia a fungicidas se emplean diversas técnicas. Estas técnicas deben ser confiables y deben ser usadas en monitoreos posteriores para diferir lo menos posible en cuanto a la sensibilidad entre un monitoreo y otro. Si la molécula es de un grupo químico ya conocido y estudiado es posible que ya existan métodos publicados por la FRAC (Fungicide Resistance Action Committee, por sus siglas en inglés). Sin embargo, si no aplica la situación anterior, se debe desarrollar una técnica *in vitro* o *in vivo*, la cual debe ser robusta, confiable y repetible; así como también que sea posible de desarrollarla en términos de la tecnología disponible y que la sensibilidad obtenida esté relacionada con la observada en campo (Russell, 2007).

3.3.2.1. Ensayos de sensibilidad *in vitro*

Los ensayos *in vitro* pueden ser aplicados en cualquier tipo de patógeno (obligado y no obligado) aunque hay mayores limitantes en los primeros. Si el patógeno no obligado puede ser cultivado fácilmente en agar artificial o cualquier otro medio es factible que la investigación se base en procedimientos de dosis respuesta en este medio. La mayoría de las técnicas involucran el uso de un medio sólido mezclado con fungicida donde se evalúa el crecimiento del hongo sobre la superficie. Donde los fungicidas son incorporados en el medio de cultivo y este se somete a esterilización, se debe asegurar que el proceso de

esterilización no afecta las propiedades del fungicida. A menudo se preparan grandes cantidades de medio de cultivo con fungicida y este se almacena, sin embargo se debe procurar no almacenarlo por largos periodos de tiempo (no más de 7 días) para evitar que se degrade o que el fungicida se sedimente y la concentración de este sobre la superficie disminuya (Russell, 2007).

Existen varias técnicas para evaluar la sensibilidad *in vitro* entre las que se incluyen la de inhibición del crecimiento micelial, ensayos de germinación de esporas, y ensayos de elongación del tubo germinativo. La elección del medio de cultivo dependerá de las propiedades físico-químicas del fungicida principalmente su modo de acción fisiológico o bioquímico. Por ejemplo, un ensayo de germinación de esporas no podrá ser aplicado con un fungicida que no actúa en esta parte del ciclo biológico del hongo. Las condiciones específicas usadas en los ensayos de sensibilidad solamente podrán ser determinadas por experimentación, con la consigna de que sean repetitivas entre ellas (Russell, 2007).

Un factor importante que se debe considerar para la realización de ensayos de sensibilidad es el uso de aislamientos monospóricos, debido a la variabilidad genética que existe en la población del hongo en el campo. Evaluando varias esporas individuales de la misma lesión puede ser no representativo de la población del campo, mientras que evaluando esporas individuales de lesiones diferentes se puede encontrar potencialmente más variabilidad genética (Russell, 2007).

3.3.2.2. Evaluación de los ensayos de sensibilidad *in vitro*

Para ensayos de sensibilidad basados en espóra, se debe definir el criterio de cuando se considerara germinada la espóra y como evaluar la inhibición del crecimiento del tubo germinativo.

Un criterio usado muy a menudo para considerar la espora germinada es si el tubo germinativo tiene al menos dos veces el diámetro de la espora.

Si el ensayo está basado en el crecimiento micelial, se debe evaluar el crecimiento radial de la colonia en el medio de cultivo, el método más común involucra la evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio comparado con el crecimiento del hongo en ausencia de fungicida (testigo). Las medidas de crecimiento normalmente serán tomadas en dos diámetros de la colonia en ángulo recto. Si el inóculo es un trozo de micelio de una cepa sin tratar, deberá colocarse con la superficie de micelio hacia abajo para asegurar el contacto de este con el medio de cultivo con fungicida que se esté evaluando (Russell, 2007).

La sensibilidad del patógeno puede ser estimada con parámetros tales como:

- Dosis que brinda el control total del aislamiento (concentración mínima inhibitoria).
- Valores de EC_{50} , es decir la dosis o concentración que reduce en un 50% (o cualquier otro valor) el crecimiento de esporas o germinación de esporas comparado con un testigo en ausencia de fungicida.

Los valores de la concentración mínima efectiva son obtenidos directamente de las evaluaciones de las dosis. Los valores de EC_{50} pueden ser determinados de los datos de respuesta a las dosis mediante aproximación estadística (recomendado) o usando gráficos y estimando el 50 o 90% directamente. Cualquiera que sea el método usado se debe tener cuidado y asegurar que se haga una estimación razonable; el uso de una EC_{50} estimada que se encuentre fuera del rango de dosis evaluadas ciertamente no es recomendado, particularmente cuando las dosis está en una escala logarítmica (Russell, 2007).

3.4. Fungicidas Benzimidazoles y Dicarboximidas.

Benzimidazoles

Los benzimidazoles son fungicidas de amplio espectro que se han usado comercialmente para el control de enfermedades de plantas desde la década de los 60's. Cuando fueron introducidos, representaron una clase pionera de fungicidas con propiedades únicas, incluyendo actividad sistémica y curativa que permitió espaciar más las aplicaciones. En todo el mundo, los benzimidazoles se han registrado en más de 70 cultivos incluyendo cereales, frutales y hortalizas. Actualmente incluyen los siguientes ingredientes activos: benomil, carbendazim, tiabendazol, tiofanato, metil-tiofanato y fuberidazol. Actúa principalmente como un inhibidor de la polimerización de la β -tubulina en muchas especies de hongos. Presenta un alto riesgo de generación de resistencia a una gran cantidad de patógenos, entre los que se encuentra *Botrytis cinerea*. También se ha demostrado que existe resistencia cruzada entre este fungicida y otros del mismo grupo (benomil, carbendazim, tiabendazol) (FRAC, 2008) por lo que se recomienda monitorear constantemente las poblaciones de hongos para establecer tácticas anti resistencia.

A los pocos años de su introducción se registraron disminución en la capacidad de control en muchos cultivos, especialmente con patógenos que tienen varios ciclos por año, como *Botrytis cinerea*. Desde que se comenzaron a comercializar, al menos 100 especies de hongos han desarrollado algún grado de resistencia hacia los benzimidazoles (FRAC, 2007), incluyendo *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis*, *Pseudocercospora herqualis*, *Sphaeroteca fuliginea* entre muchos otros (Delph, 1988).

La resistencia hacia los benzimidazoles ha sido desarrollada independientemente en un gran número de especies de hongos y casi siempre

ha estado asociada con mutaciones puntuales en el gen que codifica la β -tubulina (Free et. al, 1996). Este gen ha sido mapeado, clonado y secuenciado de varios ascomicetos. Por ejemplo en *Botrytis cinerea* una mutación en la que se substituye los aminoácidos en las posiciones 198 y 200 confieren resistencia a benomilo. (Yarden and Katan, 1993).

Dicarboximidas

La actividad de los fungicidas dicarboxamidas fue reportada desde inicios de la década de los 70's con la introducción al mercado de iprodiona, vinclozolin y procymidona. Estos fungicidas son típicamente de acción preventiva, aunque varios autores han reportado que poseen cierta actividad sistémica. Comparados con otras clases de fungicidas su espectro de aplicación es relativamente reducido, incluyendo especies de los siguientes géneros: *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Monilia*, *Alternaria*, *Phoma*, *Didymella*, *Rhizoctonia*, *Laetisaria* (*Corticium*). Las dicarboxamidas originalmente fueron introducidas para el control de *B. cinerea* en el cultivo de vid, donde fueron muy bien aceptadas debido a que los fungicidas MBC (metil benzimidazol carbamatos) que se usaban para su control ya habían generado resistencia. En aquellos tiempos las estrategias de manejo de la resistencia estaban mal entendidas y esto condujo inevitablemente a la sobreexplotación de los fungicidas, de tal manera que la resistencia se generó muy rápidamente. *Botrytis* sigue siendo el principal hongo en situación de riesgo pero la posibilidad de generar resistencia pero también en otros géneros puede ser fácilmente encontrada dicha resistencia. (FRAC, 2007).

Aislamientos resistentes a dicarboximidas no fueron muy comunes en la naturaleza en los años siguientes en que fueron introducidos al mercado en la década de los 70's; sin embargo a inicios de los 80's los aislamientos resistentes fueron comunes en varios cultivos. La pérdida de eficacia de las dicarboximidas en el control de *Botrytis cinerea* debido a la aparición de

resistencia se observó en los viñedos en Nueva Zelanda, en pepinos de invernadero en Israel y en fresas en Inglaterra en esta década (Yourman y Jeffers, 1999).

A la fecha se desconoce con exactitud su modo de acción, sin embargo se sugiere que interfiere con la transducción de la señal osmótica entre las cascadas de la histidin-kinasa y la MAP kinasa, lo que se manifiesta principalmente en la inhibición de la síntesis de ADN y ARN así como en la división celular, (Matheron, 2001). Presenta un riesgo de generación de resistencia medio a alto. Por otro lado se ha demostrado que existe resistencia cruzada con fungicidas del mismo grupo, principalmente con vinclozolin y procimidona (FRAC, 2007).

Ma *et al* (2007) secuenciaron el gen de la histidin-kinasa (Bos1) de aislamientos de *Botrytis cinerea* susceptibles y resistentes a fungicidas dicarboximidas. Encontraron dos tipos de mutaciones en los aislamientos resistentes: una mutación en la posición 365 cambiando del aminoácido isoleucina a serina (I365N) y otra en la posición 373 cambiando de glutamina a prolina (Q369P).

3.5. Resistencia de *Botrytis cinerea* a fungicidas benzimidazoles y dicarboxamidas

El desarrollo de razas fisiológicas en *B. cinerea* tolerantes a fungicidas es de gran importancia en el control de enfermedades causadas por hongos, ya que en los últimos años su adaptación se ha incrementado considerablemente (Coley-Smith, 1980).

La resistencia a benzimidazoles sucede con frecuencia en la práctica. Las bases genéticas de la resistencia a este grupo químico se han estudiado muy poco.

El primer reporte de resistencia a fungicidas benzimidazoles se dio con el benomil en 1970, donde *Botrytis cinerea* aislado de ciclamen mostró resistencia después de un año de aplicaciones sucesivas (Lyr, 1987).

Delp (1980), estudió 13 aislamientos de *B. cinerea*, los cuales fueron tratados con diferentes fungicidas. De dichos aislamientos 6 mostraron resistencia a benomil y vinclozolin con una DE_{50} de 70 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

En un estudio de resistencia de poblaciones de *B. cinerea* a fungicidas en el cultivo de pera en Italia se encontró un alto nivel de resistencia al tiabendazol ($EC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$). Por el contrario, todas las cepas aisladas de fueron sensibles a la iprodiona a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Lennox y Spotts, 2003). El ensayo se condujo con la prueba de inhibición del crecimiento micelial.

Gomborg (1984) encontró que la resistencia de *B. cinerea* a dicarboxamidas es muy baja, mientras que la resistencia a benzimidazoles es alta y ampliamente distribuida.

Myresiotis (2007) evaluó la sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de cultivos hortícolas a fungicidas benzimidazoles (carbendazim) y dicarboxamidas (iprodiona). Del total de aislamientos, el 61.8 y 18 % fueron resistentes a carbendazim e iprodiona, respectivamente. Asimismo observó el desarrollo de resistencia a anilopirimidinas (pirimetanil y ciprodinil). Para el caso de iprodiona los valores de DE_{50} basados en crecimiento de micelio variaron en un rango de 0.1 a 1.42 $\mu\text{g/ml}$ y consideró como resistentes aquellos que su DE_{50} fue superior a 1 $\mu\text{g/ml}$.

Yourman y Jeffers, (1999) en un estudio de sensibilidad con 321 aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de plantas de geranio. Reportaron una resistencia del 81 % a benzimidazoles (tiofanato-metil) y de 61% a dicarboxamidas (vinclozolin).

Asimismo encontró el 32% de las cepas en estudios resistencia a dicarboxamidas (vinclozolin) y benzimidazoles (tiofanato metil) en cepas aisladas de cultivos hortícolas bajo invernadero. Los aislamientos sensibles al tiofanato metílico tuvieron una media de la DE_{50} de 0.93 $\mu\text{g/ml}$ para la germinación de conidios y de 0.11 $\mu\text{g/ml}$ para el crecimiento micelial. Para los aislamientos sensible a vinclozolin la media de EC_{50} fue de 1.63 $\mu\text{g/ml}$ para la germinación de conidios y de 0.26 $\mu\text{g/ml}$ en crecimiento micelial. Por el contrario los aislamientos resistentes al tiofanato metílico tuvieron una media de DE_{50} (conidios y micelio) superior a 500 $\mu\text{g/ml}$ y a vinclozolin de 500 $\mu\text{g/ml}$ para la germinación de conidios y de 3.18 $\mu\text{g/ml}$ para el crecimiento micelial,

Esterio (2007) menciona que durante los últimos 25 años se ha generado resistencia a fungicidas dicarboxamidas, benzimidazoles, anilopirimidinas, fenilpyrroles e hidroxianilidas. En los primeros dos la resistencia se detectó a los pocos años de su introducción.

Zhang (2008) estudió los riesgos de generación de resistencia a boscalid, este fue muy pequeño en comparación de pirimetanil. Sin embargo es un patógeno de alto riesgo, deben tomarse las precauciones adecuadas para prevenir el desarrollo de resistencia. También encontró un sinergismo entre boscalid y kresoxim-metil.

Tremblay, en el 2003 reportó resistencia de *B. squamosa* a iprodiona y vinclozolin (dicarboxamidas) así como también observó resistencia cruzada entre dicarboxamidas. La DE_{50} de 35 aislamientos basada en la inhibición de crecimiento micelial fue superior a los 3.98 $\mu\text{g/ml}$ en iprodiona y mayor de 17.49 $\mu\text{g/ml}$ para vinclozolin.

En un estudio de sensibilidad *in vitro* con aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de cultivos ornamentales en Estados Unidos, La Mondia y Douglas (1997) encontraron resistencia a los fungicidas benzimidazoles benomilo (DE_{50} de 101

µg/ml), tiofanato metílico ($DE_{50} \geq 1000$ µg/ml) y a las dicarboximidaz vinclazolin (11.1 µg/ml) e iprodiona (7.1 µg/ml) basados en el crecimiento de micelio. El nivel de resistencia hacia las dicarboximidaz fue menor que el mostrado por los benzimidazoles.

Raposo *et al* (2000) a partir de aislamientos de *B. cinerea* colectados en cultivos bajo invernadero en España realizaron un ensayo de sensibilidad *in vitro* basado en el crecimiento de micelio donde evaluó el fungicida dicarboximida iprodiona. La DE_{50} de los aislamientos resistentes variaron en un rango de 1.58 – 3.01 µg/ml y los sensibles de 0.36-0.49 µg/ml.

En Brasil, Domínguez *et al* (2000), determinaron la sensibilidad de aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de rosa al fungicida iprodiona mediante los ensayos de crecimiento micelial y germinación de conidios. Evaluó las concentraciones 0, 1, 10 y 100 µg/ml. Para el caso de micelio, todos los aislamientos evaluados inhibieron su crecimiento a la dosis de 1 µg/ml. En conidios, dos aislamientos tuvieron una $DE_{50} \leq 10$ µg/ml, y un aislamiento no inhibió su germinación 100 µg/ml.

3.5.1. Antecedentes de estudios sobre resistencia de *Botrytis cinerea* a fungicidas en México.

Martínez en 1988 evaluó la resistencia de *B. cinerea* a benomil, tiabendazol, vinclozolin y bitertanol. A partir de 5 cultivos monospóricos realizó un ensayo aplicando *in vitro* 5 dosis de los fungicidas. Dos aislamientos no inhibieron su crecimiento micelial a dosis de 1 µg/ml de benomilo, otros 2 lo hicieron para tiabendazol. No se observó resistencia al vinclozolin y al bitertanol.

Suarez en 1996 estudió la resistencia *in Vitro* de *B. cinerea*. Utilizó una cepa no expuesta a iprodiona y en otra hizo 15 aplicaciones de 1 µg/ml de iprodiona para inducir resistencia. Posteriormente realizó la prueba *in vitro* y encontró una

diferencia en la CE_{95} entre las dos cepas con valores de 3.65 y 17.86 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa no expuesta y la expuesta, respectivamente.

Calleja, en 1996 realizó un ensayo en el que partió de un aislamiento monospórico de una cepa silvestre de *B. cinerea* con una DE_{50} de 0.055 $\mu\text{g/ml}$. Indujo resistencia mediante aplicaciones de benomil a dosis de 0.08 $\mu\text{g/ml}$ cada 72 horas a tres cepas: en la primera realizó 6 aplicaciones, 12 en la segunda y 15 en la tercera. Posteriormente, muestras de micelio de dichas cepas se sembraron en medio PDA adicionado con diferentes dosis de fungicidas. Se obtuvieron las DE_{50} y se obtuvo que a mayor número de aplicaciones en incremento en la concentración del fungicida, el patógeno fue más resistente.

Aunque los reportes anteriores indican algunos avances en el estudio de la resistencia en México, dichos estudios no abordan la distribución de la sensibilidad del patógeno, centrándose más en la generación de cepas resistentes en *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Descripción del sitio experimental

Para elaborar el presente estudio se realizaron colectas de material enfermo de fresa de las dos zonas principales donde se cultiva fresa en el estado de Michoacán, que son el Valle de Maravatío y el Valle de Zamora. La primer región presenta un clima templado con lluvias en verano, tiene una precipitación pluvial anual de 897.7 milímetros y temperaturas que oscilan de 14.1° a 29.9 °C. Por su parte, en Zamora el clima es templado tropical con lluvias en verano, la precipitación pluvial anual promedio es de 1 000 mm. La temperatura oscila entre 6° y 39.2°. Se eligieron estas zonas por ser contrastantes en cuanto al nivel tecnológico en la producción del cultivo y por ende por la posibilidad de encontrar en cada una de estas zonas cepas con distinto nivel de sensibilidad a los fungicidas empleados para su control.

En cada una de las zonas se hizo un muestreo aleatorio, colectando frutos enfermos en parcelas distantes una de otra con el objetivo de obtener la mayor variabilidad posible entre los aislamientos.

El ensayo de sensibilidad *in vitro* se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Centro Regional Universitario Centro-Occidente (CRUCO) de la Universidad Autónoma Chapingo, en Morelia, Michoacán.

La identificación molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad (IREGEP) del Colegio de Posgraduados, en Montecillos, Estado de México.

4.2. Colecta y obtención de aislamientos monospóricos de *Botrytis cinerea* Pers.

Se colectaron frutos de fresa con síntomas típicos de *B. cinerea* (pudrición acuosa, cubierta o no por una masa grisácea de esporas en su superficie). Además se colectaron frutos con apariencia sana, pero que se encontraban bajo el follaje en condiciones de alta humedad relativa. Por cada muestra levantada se elaboró una cédula de información básica con los datos de ubicación geográfica, condiciones ambientales, variedad del cultivo, historial de aplicaciones de fungicidas, etc. Estas muestras se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético y se mantuvieron en hielo hasta su traslado al laboratorio de fitopatología del Centro Regional Morelia de la Universidad Autónoma Chapingo, donde se colocaron en refrigeración a 4° hasta su manejo posterior.

4.2.1. Aislamiento del patógeno

En laboratorio se cortaron trozos pequeños de fruto de la interface tejido sano-tejido enfermo y se colocaron en cajas petri estériles donde se lavaron por 3 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 0.6%, posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente por 5 minutos en la cámara de flujo laminar.

Por otro lado se preparó medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) colocando 39 gr de medio de cultivo deshidratado (Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company. Sparks, MD, 21152. USA) en 1 L de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121° (15 lb) por 15 min. Una vez preparado se enfrió a 50°C y se adicionaron 50 mg de estreptomycin. Se vació en cajas petri de 10 cm de diámetro bajo condiciones asépticas.

Se sembraron 5 trozos de fruto por muestra en cajas con medio de cultivo se sellaron con parafilm y se mantuvieron en condiciones de laboratorio por 3 días.

Transcurrido este tiempo, se observaron distintas colonias creciendo sobre el medio de cultivo. Con ayuda de un sacabocados, se obtuvieron discos de este medio de cultivo y se transfirieron a cajas nuevas con el objetivo de purificar las colonias. Después de 5 días bajo condiciones de luz fluorescente constante las colonias comenzaron a esporular.

4.2.2 Obtención de cultivos monospóricos.

Los aislamientos obtenidos se conservaron a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) en laboratorio hasta que estos presentaron esporulación (aprox. 7 días). Para cada aislamiento se prepararon suspensiones de conidios, con ayuda de una aguja de disección se raspó la parte con esporulación activa y los conidios colectados se transfirieron a un tubo con 10 ml de agua destilada estéril. Con ayuda de un hemacitómetro se determinó la concentración de conidios en la suspensión y mediante diluciones seriales se ajustó hasta una concentración final de aproximadamente 1.4×10^3 conidios ml^{-1} . De esta suspensión se colocaron 5 gotas en cajas petri con medio de cultivo agua-agar (20 g agar L^{-1} de agua destilada) y se inclinó ligeramente la caja para permitir que se distribuyera la suspensión. Se incubó por 6 hrs a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, bajo el microscopio estereoscópico se obtuvieron conidios germinados y se transfirieron a cajas petri con medio de cultivo PDA. Estos cultivos monospóricos se dejaron incubar por 5-7 días a temperatura ambiente. De cada aislamiento se obtuvieron de 1-3 cultivos monospóricos los cuales fueron almacenados en refrigeración a 4°C hasta su uso posterior.

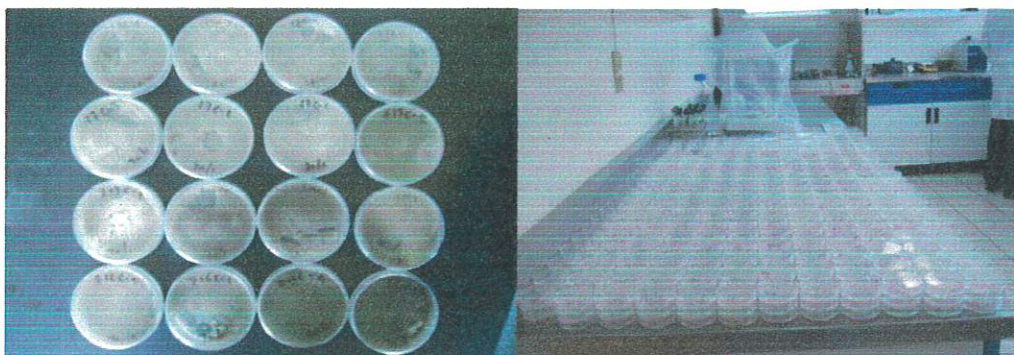


Fig 2. Obtención de cultivos monospóricos de *Botrytis cinerea*.

Cuadro 3. Aislamientos de *Botrytis cinerea* usados en el estudio, cultivar y zona geográfica de donde fueron aislados.

#	Cultivo monospórico	Cultivar	Zona	#	Cultivo monospórico	Cultivar	Zona
1	Z6A-1	Camarosa	Zamora	33	M12A2-1	Albion	Maravatio
2	Z6A-3	Camarosa	Zamora	34	M12A2-2	Albion	Maravatio
3	Z6B-1	Camino Real	Zamora	35	M12B-1	Albion	Maravatio
4	Z6B-2	Camino Real	Zamora	36	M12B-2	Albion	Maravatio
5	Z6B-3	Camino Real	Zamora	37	M12B-3	Albion	Maravatio
6	Z7A-1	Oso Grande	Zamora	38	M15A-1	Albion	Maravatio
7	Z7A-2	Oso Grande	Zamora	39	M15A-2	Albion	Maravatio
8	Z7A-3	Oso Grande	Zamora	40	M15A-3	Albion	Maravatio
9	Z7A-4	Oso Grande	Zamora	41	M16A-1	Albion	Maravatio
10	Z7C-1	Albion	Zamora	42	M16A-2	Albion	Maravatio
11	Z7C-2	Albion	Zamora	43	M16A-3	Albion	Maravatio
12	Z7C-3	Albion	Zamora	44	M17A-3	Albion	Maravatio
13	Z8B-3	Festival	Zamora	45	M19A-1	Albion	Maravatio
14	Z9B-3	Festival	Zamora	46	M19A-2	Albion	Maravatio
15	Z11A-1	Camarosa	Zamora	47	M19A-3	Albion	Maravatio
16	Z11A-2	Camarosa	Zamora	48	M19A-4	Albion	Maravatio
17	Z12B-1	Festival	Zamora	49	M20A-1	Albion	Maravatio
18	Z12B-2	Festival	Zamora	50	M20A-2	Albion	Maravatio
19	Z12B-3	Festival	Zamora	51	M21B-1	Albion	Maravatio
20	Z12B-4	Festival	Zamora	52	M21B-2	Albion	Maravatio
21	Z13C-2	Festival	Zamora	53	M21B-3	Albion	Maravatio
22	Z14A-1	Albion	Zamora	54	M26A-1	Camino Real	Maravatio
23	Z14A-2	Albion	Zamora	55	M26A-2	Camino Real	Maravatio
24	Z14A-3	Albion	Zamora	56	M26A-3	Camino Real	Maravatio
25	Z14B-1	Albion	Zamora	57	M27A-1	Albion	Maravatio
26	Z14B-3	Albion	Zamora	58	M27A-2	Albion	Maravatio
27	Z16B-1	Festival	Zamora	59	M27A-3	Albion	Maravatio
28	Z16B-2	Festival	Zamora	60	M28A-1	Tioga	Maravatio
29	Z16C-1	Camino Real	Zamora	61	M28A-2	Tioga	Maravatio
30	Z16C-2	Camino Real	Zamora	62	M28A-3	Tioga	Maravatio
31	Z16C-3	Camino Real	Zamora				
32	Z16C-4	Camino Real	Zamora				

4.3. Identificación morfológica y molecular

4.3.1. Identificación morfológica

Una vez crecidos los aislamientos se identificó al patógeno mediante la apariencia y color de las colonias así como también la morfología de conidios y conidióforos. Para ello se eligieron 5 cultivos monospóricos al azar y se preparó una suspensión de conidios en agua estéril, se colocó una gota en un portaobjetos y se observaron al microscopio compuesto (40X). Se utilizó una cámara fotográfica montada y se realizaron medidas de 10 conidios por cepa mediante el software Motic Image Plus (Motic China Group CO, LTD) y el promedio de las mediciones se comparó con el reportado por Elad *et. al* (2007).

4.3.2. Identificación molecular

Se eligieron 8 cultivos monospóricos al azar obtenidos de distintos aislamientos para realizar la identificación molecular (aislamientos Z7A-1, Z7A-3, Z16C-2, Z14A-3, Z14A-2, Z7C-1 Y Z7C-2). Esta actividad se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología de semillas del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. Se identificaron por medio de la amplificación y secuenciación de la región (ITS) de la unidad 16s del ADN ribosomal mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los primers ITS4 e ITS5.

4.3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la realización de la PCR se siguió el método descrito por Silva, (2008)⁷ que se describe a continuación, que es una adaptación del método de Sambrook (1986) y Bainbridge *et al*, 1990 para bacterias y hongos:

⁷ No publicado, comunicación personal.

1. Se tomó una muestra de la cepa con la punta de una micropipeta o espátula pequeña directamente de la caja de petri y se colocó en un tubo eppendorf de 2 mL que contenía 30 μL de una solución de lisis desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología de semillas del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.
2. Se colocaron los tubos a 95 °C por 5 min en un Termociclador modelo-FPROGO2Y Techne Progene®.
3. Una vez concluido ese tiempo se llevaron los tubos a centrifugación por 5 min a 12,000 G.
4. En tubos nuevos se colocaron 45 μL de agua para PCR y se les agregaron 5 μL del sobrenadante obtenido tras la centrifugación.
5. La mezcla resultante se colocó 2 min a centrifugación.
6. De esta mezcla se tomaron 5 μL para colocarlos en tubos nuevos que contenían 20 μL de la solución *master mix*:
 - a. Taq polimerasa: 0.4 μL
 - b. MgCl_2 : 2 μL
 - c. Buffer: 5 μL
 - d. Primer 1: 2 μL
 - e. Primer 2: 2 μL
 - f. dNTPs: 2 μL
 - g. Agua: 6.6 μL
7. La mezcla final se llevo al termociclador para su amplificación con el siguiente programa: un ciclo a 95 °C por 4 min, un ciclo a 95° por 2 min, un ciclo a 55 °C por 1 min, 35 ciclos a 72 °C por 2 min y finalmente un ciclo a 72 °C por 2 min

4.3.2.2. Electroforesis

El producto de PCR se sometió a una electroforesis con la siguiente metodología: como primer paso para realizar electroforesis se procedió a preparar un gel de agarosa 1.5%, donde se disolvieron 3 g de agarosa por cada 200 mL de una solución de buffer TAE 1X, la cual está compuesta por Tris, Acetato y EDTA. Esta mezcla de buffer y agar se calentó en microondas para

disolver completamente y lograr una mezcla hialina. Una vez disuelto el agar se dejó enfriar un poco y se procedió a vaciar en el porta gel de la cámara de electroforesis y se colocaron los peines correspondientes para formar los pozos.

Por otro lado en un trozo de parafilm se colocaron 2 µl de buffer de carga verde G y se mezcló con 10 µl del producto final de la PCR. Posteriormente se cargaron todas las muestras en el gel y se corrió en la cámara de electroforesis a 80 V hasta que la marca del buffer de carga llegara aproximadamente al 75% del tamaño del gel.

Finalmente se colocó el gel en una solución de bromuro de etidio durante 5 minutos, después se lavó el gel en agua y se visualizaron las bandas en el transiluminador EDAS- Kodak (Eastman Kodak Co. New Haven, CT, USA).

4.3.2.3. Limpieza del ADN

Antes de secuenciar, el producto final de la PCR fue purificado con el kit de purificación QIAquick (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.3.2.4. Secuenciación del ADN y comparación en el GenBank®

El ADN purificado fue enviado a secuenciar a la empresa MacroGen® (Rockville, MD, USA) y las secuencias obtenidas fueron editadas usando el software BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), donde se obtuvieron las secuencias consenso para llevar a cabo su comparación empleando la aplicación BLAST del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para obtener las posibles homologías con secuencias almacenadas en la base de datos.



Fig. 3. Realización de PCR (Polymerase Chain Reaction).

4.4. Fungicidas evaluados

Se evaluó un fungicida del grupo químico de los benzimidazoles y un fungicida del grupo de las dicarboximidas. Debido a la dificultad para conseguir el ingrediente activo en grado técnico, se utilizaron las siguientes marcas comerciales:

Iprodiona: Fungicida del grupo químico Dicarboximidas. Se evaluó el producto comercial **Rovral®** (Bayer Cropscience de México, México, D.F.), su concentración es del 50% y esta formulado como Polvo Humectable.

Tiofanato metílico: Fungicida del grupo químico benzimidazoles. Se evaluó la marca comercial **Cercobin®**, (BASF Mexicana, Zapopan, Jalisco), el cual viene formulado al 50% en forma de Polvo Humectable.

4.5.- Ensayo de sensibilidad *in vitro*

Una vez obtenidos los aislamientos monospóricos y corroborada su identidad por el método morfológica y molecular se procedió a evaluar la sensibilidad *in vitro* basados en la inhibición del crecimiento micelial o inhibición de la germinación de conidios:

4.5.1. Ensayo de inhibición de crecimiento micelial

Los 62 cultivos monospóricos de las dos zonas muestreadas se sometieron al ensayo de crecimiento micelial en medio de cultivo adicionado con los fungicidas referidos con el procedimiento siguiente:

Se preparó medio de cultivo PDA bajo la metodología descrita anteriormente, con la única excepción de que se utilizaron 900 ml de agua y 39 gr de PDA solido. El medio de cultivo preparado se mantuvo en baño maría a una temperatura de 50° C para evitar que solidificara.

Por separado se preparó una solución madre (en agua destilada estéril) de 10, 000 µg/ml de cada uno de los fungicidas. Se tomo en cuenta la concentración de ingrediente activo en la formulación comercial de los fungicidas. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas de 1/10, 1/100, 1/1000 en matraces estériles. La proporción correspondiente de cada una de estas diluciones se mezcló con el medio PDA y se vaciaron en cajas petri para obtener concentraciones finales en el medio de cultivo con fungicida de 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50 y 100 µg/ml para iprodiona y de 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 y 2000 µg/ml de tiofanato metílico. Una vez obtenida la mezcla a la concentración deseada, se dejó enfriar y se almacenó para ser usado en las próximas 48 horas como se describe posteriormente. Cada una de las concentraciones evaluadas se repitió 3 veces para los 62 aislamientos monospóricos.

Se realizó el procedimiento descrito por Rebollar *et al.* (2007). Del margen de colonias activas de cada uno de los aislamientos monospóricos se sacaron discos de 0.5 cm de diámetro y se colocaron en el centro de cajas petri de 6 cm de diámetro con el medio de cultivo adicionado con fungicida. Estas fueron selladas con parafilm y colocadas en bolsas plásticas estériles e incubadas en obscuridad a temperatura ambiente (20±2°C) por un periodo de 72 horas. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro de las colonias (dos mediciones

en ángulo recto una de otra) y el promedio de estas mediciones se utilizó para el análisis. El crecimiento de micelio en las 3 repeticiones fue promediado y usado para calcular el crecimiento relativo en relación al promedio de crecimiento micelial en el testigo absoluto para cada una de las concentraciones en cada uno de los aislamientos monospóricos. El crecimiento relativo de micelio fue utilizado para estimar la DE_{50} (Dosis efectiva que reduce en un 50% el crecimiento de micelio).

4.5.2. Ensayo de inhibición de germinación de conidios

Para este ensayo se evaluaron las mismas concentraciones de fungicida que en el ensayo de crecimiento micelial. Se preparo el medio de cultivo de similar manera, excepto que en este caso se empleó agua-agar de acuerdo a FRAC (FRAC, 2007).

De colonias de 8-12 días de edad se tomaron con ayuda de una aguja de disección la mayor cantidad de conidios posible y se vertieron en tubos de ensaye con agua destilada estéril, formando una suspensión de conidios. Al igual que en el procedimiento seguido en la obtención de los cultivos monospóricos, se ajustó la concentración de conidios con el uso de un hemacitómetro hasta obtener aproximadamente 1×10^3 conidios/ml. De esta suspensión se colocó 0.1 ml en una caja petri con el medio de cultivo + fungicida y se incubaron por 12-14 horas en condiciones de obscuridad para permitir la germinación de los conidios. Transcurrido este tiempo, se contaron los conidios germinados y no germinados de una muestra de 100 conidios en cada uno de los tratamientos (concentraciones de fungicida) con la ayuda de un microscopio compuesto a 40 X y se calculó el porcentaje de germinación relativa comparada con el testigo. Se tomo como parámetro de germinación la longitud del tubo germinativo; si este era igual o mayor a tres veces a longitud del conidio se consideró como germinado siguiendo la metodología de Yourman y Jeffers, (1999).

Al igual que en el ensayo de crecimiento de micelio, se emplearon tres repeticiones por cada dosis de fungicida-aislamiento. Los promedios de las repeticiones se promediaron y se compararon con la germinación en el testigo para calcular la germinación relativa. Esta a su vez se utilizó para calcular la DE_{50} (Dosis efectiva de fungicida que reduce en un 50% la germinación de los conidios) mediante el ajuste del modelo log-logístico.

4.6. Análisis de datos

A partir de los datos obtenidos (crecimiento micelial y germinación de conidios) se calculó el crecimiento relativo de micelio y germinación relativa de conidios mediante la comparación en ambos casos contra el testigo sin aplicación de fungicida. Con estos valores mediante la aplicación del modelo log-logístico se estimó la DE_{50} y a partir de estos parámetros se construyó la distribución de la sensibilidad de *Botrytis cinerea* en las dos regiones y para cada uno de los fungicidas y se hicieron las comparaciones de interés.

4.6.1. Estimación de la concentración efectiva (EC_{50}).

La DE_{50} del crecimiento relativo de micelio o germinación relativa de conidios fue estimada mediante la adecuación del modelo log-logístico con asíntota superior usando el procedimiento de SAS NLMIXED (versión 9.1). El modelo es expresado como:

$$y = \frac{\alpha}{(1 + \exp(\beta \log(\frac{Dosis}{DE_{50}})))}$$

Donde y es el crecimiento relativo de micelio o la germinación relativa de conidios, α la asíntota superior (máximo valor posible de y), β es la pendiente de la curva en el punto de inflexión y DE_{50} es la dosis a la cual el crecimiento/germinación es reducido en 50% (Rebollar *et al*, 2007).

El modelo es una reparametrización del modelo log-logístico en términos de la DE_{50} . Los valores de inicio de los parámetros para las iteraciones fueron asignados arbitrariamente. Debido a que no todos los valores de inicio resultaron en la convergencia para todos los aislamientos, diferentes conjuntos de valores de inicio fueron usados para alcanzar la convergencia. La calidad del ajuste fue comprobada revisando el patrón de residuales para cada uno de los aislamientos (Rebollar *et al.*, 2007).

4.6.2. Distribución de la sensibilidad.

Se utilizaron histogramas para ilustrar la distribución de los valores DE_{50} para el crecimiento de micelio y germinación de conidios. El momento estimado, mediciones de dispersión, estadística básica y parámetros de sesgo o desalineado y pruebas de normalidad se obtuvieron a través del Proc Univariate de SAS. Antes de realizar los histogramas, se realizó un diagnóstico previo de los datos a fin de revisar la presencia de valores extremos (ouliers) en la distribución. En caso de encontrar estos valores, se exploraron transformaciones a fin de ajustar la distribución de los datos a una distribución normal. Si aun después de realizar la transformación los datos no se ajustaban a una distribución normal, el valor extremo se removía para realizarla estimación de los parámetros de interés, pero fueron mantenidos con fines de ilustración de la distribución. Los histogramas de la distribución de la sensibilidad se realizaron con el software SigmaPlot (versión 10.0).

Finalmente, con se realizó la comparación de las distribuciones de la sensibilidad en conidios y de micelio de cada fungicida en cada región de estudio comparando las medias de DE_{50} , a través del procedimiento GLM y NPAR1WAY de SAS para detectar diferencias significativas entre fungicidas, zonas de estudio en conidios y micelio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación morfológica y molecular de aislamientos

Todos los aislamientos obtenidos de las dos regiones productoras de fresa en Michoacán (Valle de Zamora y Maravatío) correspondieron a *Botrytis cinerea* de acuerdo a las características morfológicas típicas del patógeno. La identificación morfológica se llevó a cabo de acuerdo a la clave taxonómica modificada de Mendoza, 1994. Las colonias observadas presentaban una coloración gris, micelio septado, hialino, los conidióforos y conidios de color gris. La longitud promedio de los conidios fue de $8 \times 14 \mu$, concordando con lo descrito por Maas, 1984.

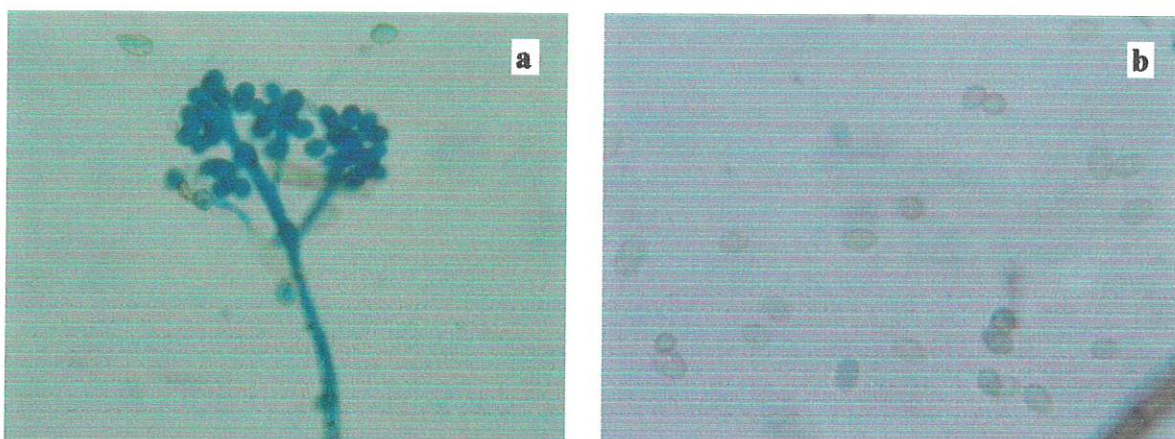


Fig. 4. Conidióforo (a) y conidios (b) de aislamientos de *Botrytis cinerea* obtenidos de fresa.

5.2. Identificación morfológica de aislamientos

Las secuencias obtenidas producto de la amplificación por PCR de la región ITS del ADN ribosomal de los 8 aislamientos fueron 100% homólogas a las secuencias depositadas en el GenBank (accesiones EU128648 y EU128649) realizada con el programa BLAST del NCBI (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de secuencias obtenidas con las depositadas en GenBank.

Aislamiento	Identificado como	Taxonomía	Numero de accesoión del Genbank más parecida	% de similaridad
Z7A-1	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomyces; Helotiales; Sclerotiniaceae; Botryotinia.	EU128649 <i>Botrytis cinerea</i> anamorfo	100
Z7A-3	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomyces; Helotiales; Sclerotiniaceae; Botryotinia.	EU128649 <i>Botrytis cinerea</i> anamorfo	100
Z16C-2	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomyces; Helotiales; Sclerotiniaceae; Botryotinia.	EU128648 <i>Botrytis cinerea</i> anamorfo	100
Z16C-1	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomyces; Helotiales; Sclerotiniaceae; Botryotinia.	EU128649 <i>Botrytis cinerea</i> anamorfo	100
Z14-3	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomyces; Helotiales; Sclerotiniaceae; Botryotinia.	EU128649 <i>Botrytis cinerea</i> anamorfo	100
Z14-2	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomyces; Helotiales; Sclerotiniaceae; Botryotinia.	EU128648 <i>Botrytis cinerea</i> anamorfo	100
Z7C-3	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomyces; Helotiales; Sclerotiniaceae; Botryotinia.	EU128649 <i>Botrytis cinerea</i> anamorfo	100
Z7C-1	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomyces; Helotiales; Sclerotiniaceae; Botryotinia.	EU128649 <i>Botrytis cinerea</i> anamorfo	97

5.3. Ajuste del modelo Log-logístico.

El modelo de predicción log-logístico $y = \frac{\alpha}{(1 + \exp(\beta \log(\frac{Dosis}{CE_{50}})))}$ con asíntota superior fue adecuado para describir el crecimiento relativo del micelio y la geminación relativa de conidios a diferentes dosis de fungicidas sin embargo no se pudo emplear para describir y predecir la concentración efectiva 50 (DE₅₀) del crecimiento micelial de todas las cepas evaluadas con el fungicida tiofanato

metílico. En este caso se empleó la fórmula de regresión lineal $y = \beta_0 + \beta_1 x$ y se empleó la parte recta de la curva para el análisis. La Fig. 5 muestra un ejemplo del ajuste del modelo log-logístico y su patrón de residuales de uno de los aislamientos evaluados.

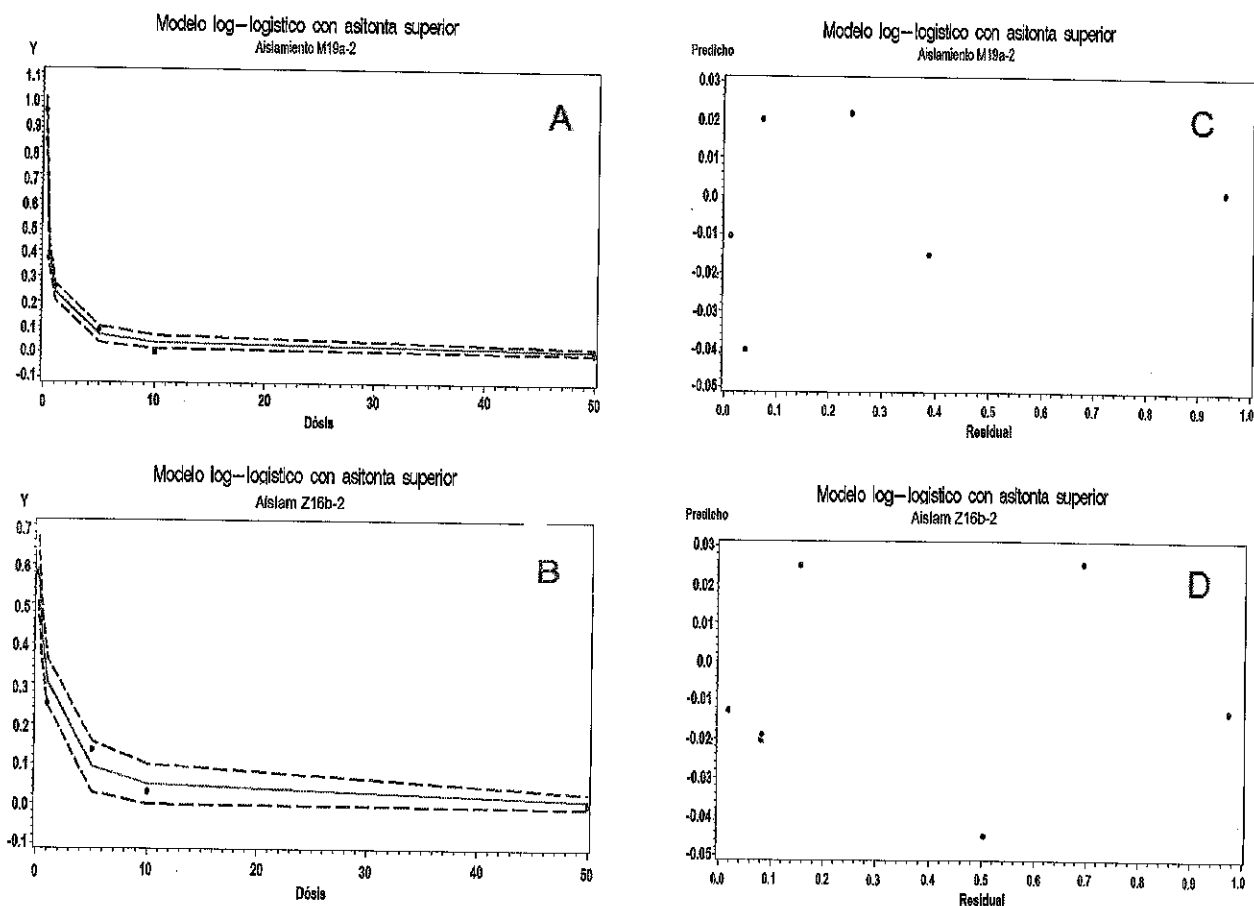


Fig. 5. Curvas respuesta típicas para aislamientos de *Botrytis cinerea* expuestos a iprodiona *in vitro*; Crecimiento relativo de micelio para los aislamientos M19a-2 (A) y Z16b-2 (B) calculado como el radio del crecimiento entre los tratamientos y el testigo. C y D: Valores para la dosis efectiva predicha para el 50% de reducción del crecimiento de micelio y sus residuales asociados.

5.4. Sensibilidad de *Botrytis cinerea* a iprodiona en dos regiones productoras de fresa en Michoacán.

La sensibilidad a iprodiona de las cepas de *B. cinerea* para el caso de micelio varió entre una dosis efectiva 50 (DE₅₀) de 0.23 a 0.89 µg/ml con una mediana

de 0.35 $\mu\text{g/ml}$ para los aislamientos colectados en el valle de Maravatío, mientras que en los aislamientos colectados en el Valle de Zamora la DE_{50} osciló en un rango 0.22 a 3.0 $\mu\text{g/ml}$ y una mediana de 1.5 (Cuadro 5). El valor de Skewness (desalineado) para la zona de Maravatío fue de 1.48 lo que indica que la distribución de sensibilidad tiende a cargarse hacia la derecha. La transformación de los datos al logaritmo base 10 ajustó sin problemas a una distribución normal. Para la zona de Zamora el valor de este parámetro es de 0.12 por lo que la curva de la distribución fue casi simétrica, ajustándose a una distribución normal sin la necesidad de transformación de datos, sin embargo se presenta el histograma con fines de ilustración (Fig. 6).

Los conidios fueron menos sensibles a la iprodiona en ambas regiones de estudio. La sensibilidad para los aislamientos colectados en el valle de Maravatío varió en un rango de 0.47 a 16.8 $\mu\text{g/ml}$ con una mediana de 3.2 $\mu\text{g/ml}$ y de 0.59 a 22.60 $\mu\text{g/ml}$ con una mediana de 4.8 en el valle de Zamora (Cuadro 5). La distribución de la sensibilidad *Botrytis cinerea* a iprodiona basado en la germinación de conidios de igual manera se ajustó a una distribución normal una vez que los datos fueron transformados al logaritmo base 10.

Cuadro 5. Estadística básica y momentos de los valores de DE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) en micelio y conidios de *B. cinerea* obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora para el fungicida Iprodiona, 2009.

Variable	Origen	Media	DS	Mínimo	Máximo	Mediana	Rango	Skewness	Kurtosis
Micelio	V.	0.42	0.16	0.23	0.89	0.35	0.66	1.48	1.86
	Maravatío	1.60	0.72	0.22	3.0	1.5	2.8	0.12	-0.42
Conidios	V.	4.14	3.43	0.47	16.8	3.2	16.28	1.87	5.10
	Maravatío	6.2	5.62	0.59	22.60	4.8	22.0	1.59	2.30
	V. Zamora								

La comparación estadística de la distribución de la sensibilidad de *B. cinerea* en ambas regiones de estudio a través de la prueba de Kolmogorov para 2 muestras, indicó diferencias significativas ($P < 0.001$) entre las distribuciones de la sensibilidad del micelio de *B. cinerea* de Zamora con la de Maravatío, confirmando que los aislamientos de Zamora fueron 5 veces menos sensibles a Iprodiona que los de Maravatío. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la sensibilidad de conidios al fungicida entre las dos zonas ($P = 0.47$). Por otro lado, realizando la comparación entre la sensibilidad de las estructuras (conidios y micelio por cada zona), los datos indican que los conidios son menos sensibles (40 veces menos en Maravatío y 5 veces en Zamora) al iprodiona que el micelio con diferencias altamente significativas en la sensibilidad ($P < 0.0001$). En general los datos muestran que los aislamientos de Zamora son menos sensibles al iprodiona que los aislamientos de Maravatío, ya que tanto el micelio como conidios toleraron mayores concentraciones que aquellos provenientes de Maravatío.

Por el modo de acción de la iprodiona (interfiriendo la transducción de la señal osmótica entre las cascadas de la histidin-kinasa y la MAP kinasa), que se manifiesta principalmente en la inhibición de la síntesis de ADN y ARN así como en la división celular, (Matheron, 2001) el efecto principal se hace visible en la reducción del crecimiento micelial, por lo tanto la sensibilidad de esta estructura es el indicador del nivel de resistencia de *B. cinerea*. Resulta interesante observar que en general, la población de Zamora resultó ser menos sensible al fungicida. Estos resultados se explican por el nivel tecnológico de ambas zonas. Mientras que esta zona la fresa se cultiva bajo un nivel tecnológico alto que implica la aplicación excesiva de plaguicidas, incluyendo fungicidas, en Maravatío, la fresa se desarrolla bajo sistemas de producción de baja tecnología en la cual el productor no recibe asistencia técnica, en superficies pequeñas de 1 a 3 has en general, y para el mercado nacional con aplicaciones de fungicidas a intervalos mayores menos frecuentes, principalmente preventivos, en contraste con la producción del Valle de Zamora.

Esta explicación del porque las diferencias en sensibilidad concuerda con Brent y Derek, (2007), quienes mencionan que el uso repetido del fungicida o de un fungicida con el mismo modo de acción puede traer como consecuencia el surgimiento de poblaciones del patógeno con menor sensibilidad hacia este. Aunado *B. cinerea* es un patógeno con alto riesgo de de resistencia a fungicidas (FRAC, 2007) y las dicarboximidas en general presentan un alto riesgo de generación de resistencia, lo que en conjunto nos eleva la posibilidad de desarrollo de la misma (Brent, 1995; Rusell 1995; Staub, 1991).

Los valores estimados de DE_{50} en el ensayo de crecimiento micelial variaron en un rango de 0.23 a 3.0 $\mu\text{g/ml}$. Estos valores concuerdan con el rango obtenido por otros autores (Lennox y Spotts, 2003; Myresiotis, 2007). Sin embargo estos mismos autores difieren en su criterio para discernir entre aislamientos susceptibles y resistentes. El primer autor consideró a los aislamientos con una $DE_{50} \leq 10 \mu\text{g/ml}$ como susceptibles, mientras que Myresiotis en un estudio con aislamientos de *B. cinerea* aislados de cultivos hortícolas obtuvo valores de DE_{50} que variaron en un rango de 0.1 a 1.42 $\mu\text{g/ml}$ y consideró resistentes aquellos que tuvieron una $DE_{50} \geq 1 \mu\text{g/ml}$.

La distribución de la sensibilidad de *B. cinerea* a iprodiona en el ensayo de germinación de conidios mostró una amplia distribución de los valores de la DE_{50} . El rango de sensibilidad fue de 0.47 a 22.60 $\mu\text{g/ml}$. Domingues *et al* (2004), encontró aislamientos con una $DE_{50} \leq 10 \mu\text{g/ml}$ y uno con $DE_{50} \geq 100 \mu\text{g/ml}$, sin embargo su metodología fue distinta, el utilizó discos de papel celofán colocados en cajas petri y embebidos con la solución de fungicida, posteriormente colocó la suspensión de conidios y evaluó el % de conidios tras 24 horas de incubación a 24 °C. En otro estudio con vinclozolin Yourman (1999), obtuvo valores de DE_{50} de 1.63 $\mu\text{g/ml}$ para aislamientos sensibles y para los resistentes una DE_{50} mayor a 500 $\mu\text{g/ml}$.

Las diferencias en el rango de sensibilidad entre autores se puede atribuir a diversos factores, sin embargo el de mayor interés debe ser la sensibilidad intrínseca de los aislamientos en cada una de las regiones donde se han realizado dichas investigaciones. Pero no se puede descartar que estén atribuidos a las diferencias en las técnicas de evaluación como por ejemplo el criterio de germinación. Yourman (1999) aplicó el criterio de germinación si el tubo germinativo tenía de 3-4 veces la longitud del conidio, mientras que Domingues *et al* (2004) lo consideró germinado si esta longitud era de al menos el doble de la longitud del conidio. En otro estudio, Myresiotis (2008) tomó como parámetro de germinación si el tubo germinativo era de al menos la mitad de la longitud del conidio. En nuestra metodología utilizamos el criterio de Domingues *et al* aunque las normas de FRAC (2007) no mencionan un parámetro específico para determinar cuando un conidio de *Botrytis cinerea* se considera germinado.

Debido a las diferencias reportadas en la literatura respecto a cuando un aislamiento es sensible o resistente a la iprodiona, no se pudo determinar en qué grado existe resistencia en los aislamientos de nuestro estudio, pero si se logró comparar la sensibilidad entre órganos (micelio/conidios) y entre zonas (Zamora/Maravatí o). Sin embargo, la prueba definitiva se obtendría a través de la secuenciación de los genes relacionados con el sitio de acción, en una actividad posterior para determinar a nivel molecular si es que hay una mutación en el gen que codifica la histidin-kinasa (Bos1) tal y como lo refieren Ma *et al* (2007) y Matheron, (2001) quienes encontraron dos tipos de mutaciones en los aislamientos resistentes: una mutación en la posición 365 cambiando del aminoácido isoleucina a serina (I365N) y otra en la posición 373 cambiando de glutamina a prolina (Q369P).

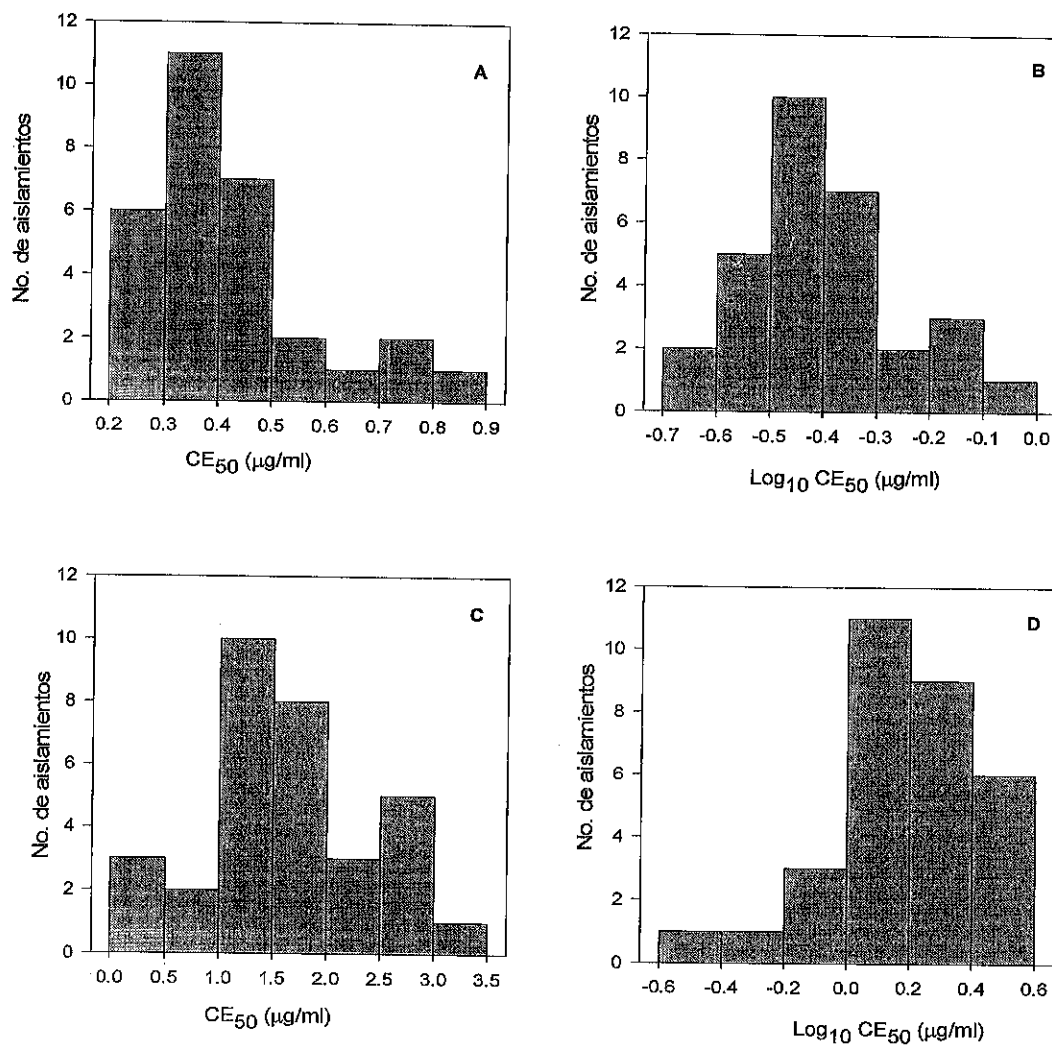


Fig. 6. Distribución de la sensibilidad de micelio de *B. cinerea* obtenidos de frutos de fresa a iprodiona: A) Distribución original de los valores de concentración efectiva 50 (DE₅₀) en aislamientos obtenidos del Valle de Maravatío, Mich; B) Logaritmo base 10 de los valores de DE₅₀; C) Distribución de la sensibilidad de aislamientos obtenidos del Valle de Zamora, Mich. D) Logaritmo base 10 de los valores de DE₅₀, Los valores originales para esta zona se ajustaron a una distribución normal.

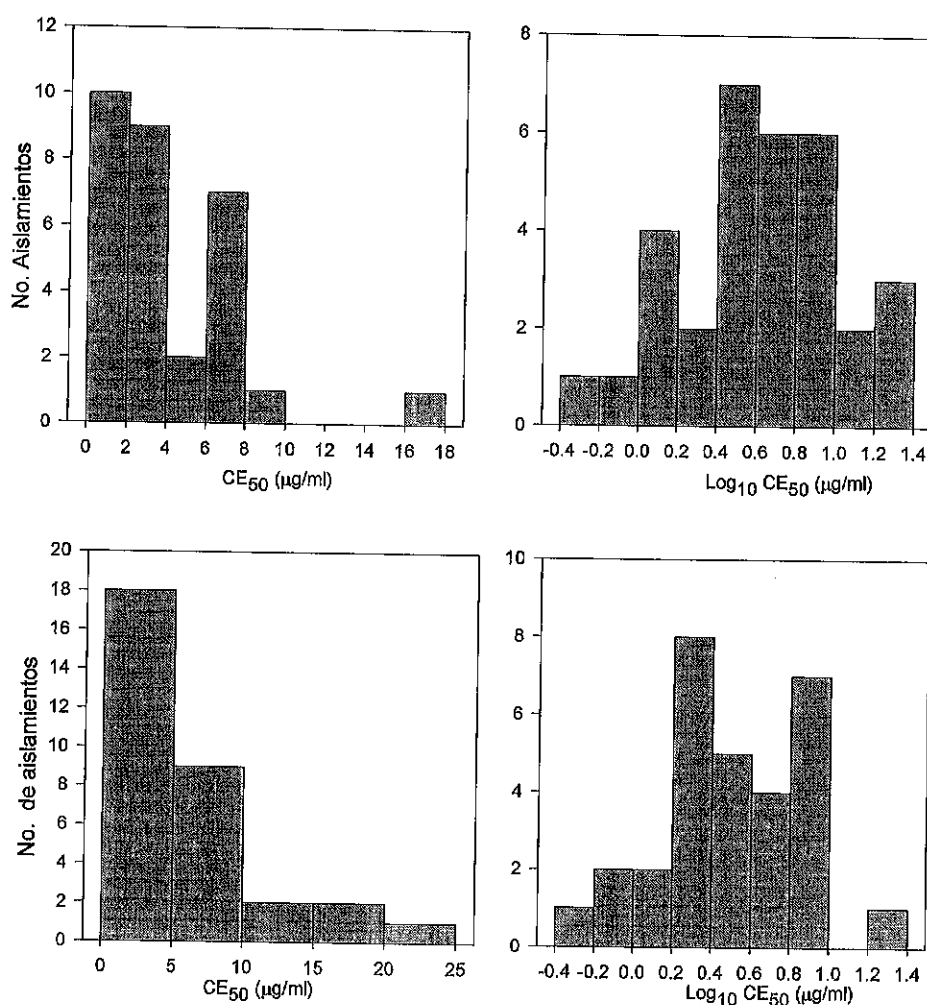


Fig. 7. Distribución de la sensibilidad de conidios de aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de fresa. A) Distribución original de los valores de concentración efectiva 50 (DE₅₀) en aislamientos obtenidos del Valle de Maravatío, Mich; B) Logaritmo base 10 de los valores de DE₅₀; C) Distribución de la DE₅₀ en aislamientos obtenidos del Valle de Zamora, Mich., D) Logaritmo base 10 de los valores de DE₅₀.

5.5. Sensibilidad de *Botrytis cinerea* a tiofanato metílico en dos regiones productoras de fresa en Michoacán

La distribución de la sensibilidad del micelio en Maravatío al tiofanato metílico fue muy dispersa (Fig. 8) con valores de DE₅₀ entre 0.11 a >2000 μg/ml con una mediana de 3.11 μg/ml. Dicha distribución no se ajustó a una distribución normal, aún después de la remoción de los valores extremos y realizar la transformación a logaritmo base 10.

En el caso de Zamora la distribución también estuvo dispersa, con valores que variaron de 0.82 a > 3400 µg/ml con una mediana de 2000 µg/ml, sin que se ajustara a una distribución normal aún con el procedimiento indicado. Contrario al micelio, los conidios fueron más sensibles al fungicida con valores de DE₅₀ que variaron desde 0.02 a 892 µg/ml y una mediana de 1.13 µg/ml para Maravatío. En Zamora, los valores estuvieron más dispersos variando desde un rango de 0.01 a 2000 µg/ml con una mediana de 9.7 µg/ml, nueve veces mayor que la mediana de Maravatío.

La comparación de las distribuciones de sensibilidad del micelio entre las dos zonas de estudio para el tiofanato metílico, indicaron que fueron significativamente diferentes ($P<0.002$; $Ks=1.86$) entre si y que la mediana de la ED₅₀ de Zamora fue casi 667 veces mayor que la mediana de Maravatío. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P=0.13$; $Ks=1.17$) entre las distribuciones de sensibilidad de los conidios, aunque la mediana fue 9 veces mayor en Zamora.

Cuadro 6. Estadística básica y momentos de los valores de DE₅₀ (µg/ml) en micelio y conidios de *B. cinerea* obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora para el fungicida Tiofanato metílico, 2009.

Variable	Origen	Media	DS	Mínimo	Máximo	Mediana	Rango	Skewness	Kurtosis
Micelio	V. Maravatío	667.6	942.7	0.11	2000	3.11	2000	0.77	-0.54
	V. Zamora	1354.7	949.5	0.83	3409	2000	3408	-0.309	-1.00
Conidios	V. Maravatío	48.0	178.9	0.02	892	1.13	892.2	4.26	18.64
	V. Zamora	165	417	0.01	2000	9.7	2000	3.32	12.3

En general, los datos indican un alto nivel de resistencia de *B. cinerea* al tiofanato metílico en ambas zonas de estudio, pero dicha resistencia es mayor en Zamora que en Maravatío. En ambas zonas en común el uso de los fungicidas benzimidazoles en forma calendarizada desde hace varias décadas, especialmente el benomil.

Esto explica la pérdida de sensibilidad, ya que existe resistencia cruzada entre tiofanato metílico y benomil, carbendazim y tiabendazol (FRAC, 2008).

En la actualidad, el tiofanato metílico representa una de las herramientas más usadas en el control de *B. cinerea* en fresa en Zamora para el control de *B. cinerea*, así como el tiabendazol para el control de otras enfermedades. De acuerdo con Yourman y Jeffers (1999) y La Mondia y Douglas (1997), los estudios realizados para definir líneas base de *B. cinerea* sobre micelio, indican que aislamientos con valores superiores a 500 µg/ml son considerados resistentes. Los benzimidazoles inhiben la síntesis de β -tubulina, la cual está involucrada en la formación del huso acromático durante el proceso de división celular (FRAC, 2008). Esta interferencia tiene efecto directo en crecimiento micelial, por lo que los estudios de sensibilidad en micelio son válidos para definir distribuciones de sensibilidad en poblaciones de hongos como *Botrytis cinerea*.

Los resultados obtenidos permitieron determinar la sensibilidad de *B. cinerea* a fungicidas benzimidazoles y dicarboximidas en dos regiones distintas. Dichos resultados tienen validez, ya que como lo menciona Rusell, (2004), para estimar la sensibilidad de un patógeno a un fungicida, debe muestrearse la mayor cantidad de individuos o poblaciones en un área determinada para obtener la mayor variabilidad genética posible, mínimamente de 20-50 puntos de muestreo. En nuestra investigación se obtuvieron 62 aislamientos monospóricos diferentes entre sí.

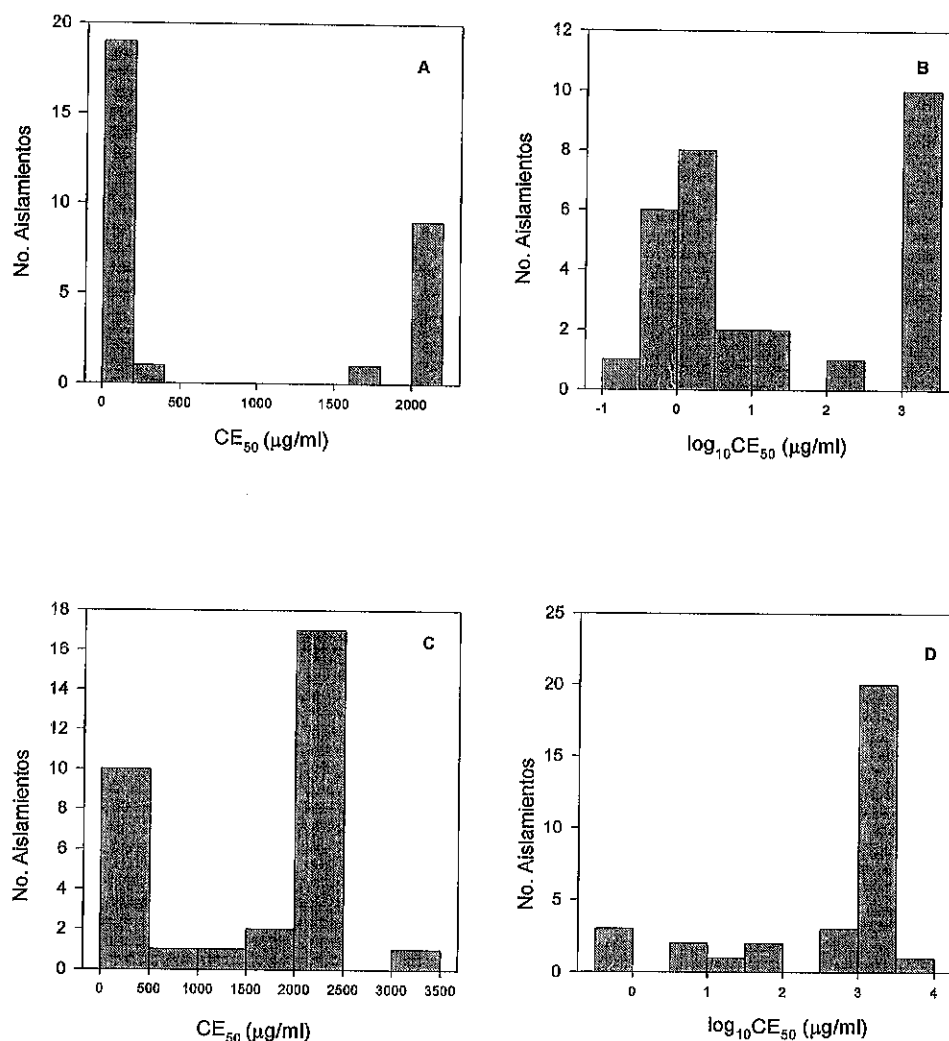


Fig. 8. Distribución de la sensibilidad de micelio de aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de fresa al fungicida tiofanato metílico A) Distribución original de los valores de concentración efectiva 50 (DE_{50}) en aislamientos obtenidos del Valle de Maravatío, Mich.; B) Logaritmo base 10 de los valores de DE_{50} ; C) Distribución de la DE_{50} en aislamientos obtenidos del Valle de Zamora, Mich., D) Logaritmo base 10 de los valores de DE_{50} .

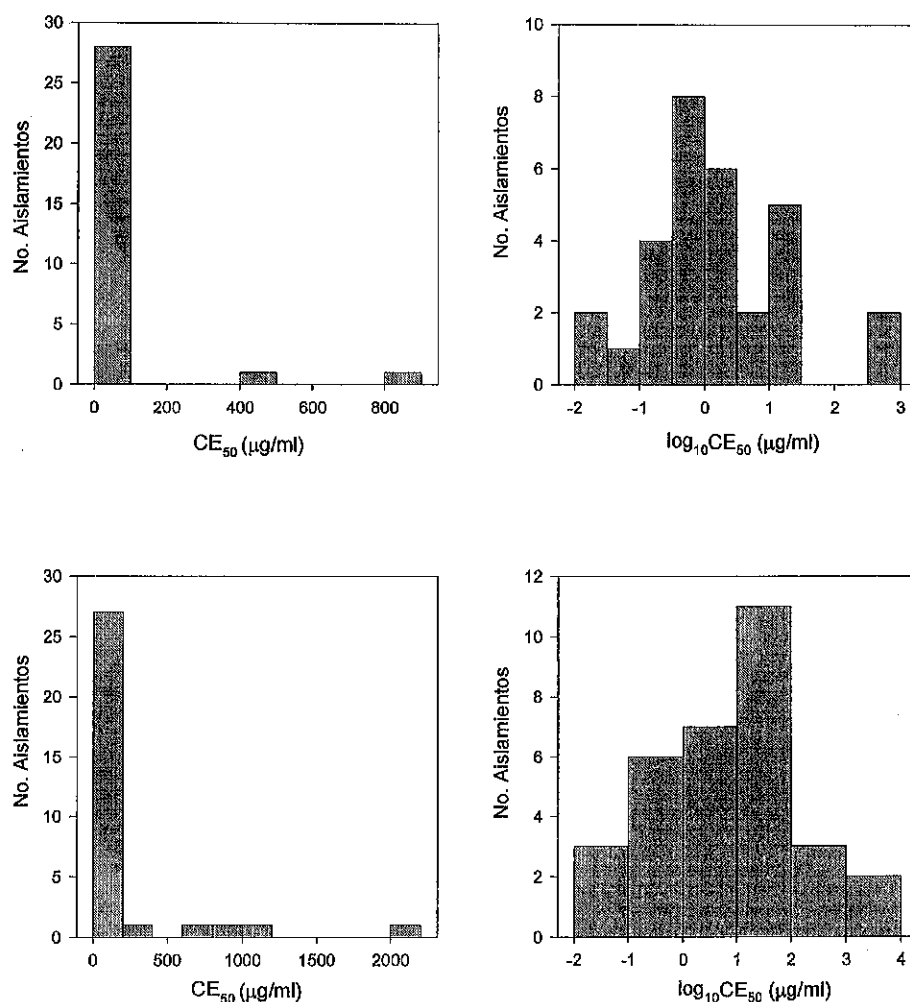


Fig. 9. Distribución de la sensibilidad de conidios de aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de fresa al fungicida tiofanato metílico A) Distribución original de los valores de concentración efectiva 50 (DE₅₀) en aislamientos obtenidos del Valle de Maravatío, Mich; B) Logaritmo base 10 de los valores de DE₅₀; C) Distribución de la DE₅₀ en aislamientos obtenidos del Valle de Zamora, Mich., D) Logaritmo base 10 de los valores de DE₅₀.

El presente estudio demuestra por primera vez la existencia de poblaciones de *B. cinerea* resistentes a los benzimidazoles en dos de las zonas más importantes de producción de fresa en México con condiciones socioeconómicas y tecnológicas contrastantes. Asimismo, indican que dichas poblaciones aun son sensibles a lo fungicidas dicarboxamidas (Lennox y Spotts, 2003; Myresiotis, 2007; Domingues *et al*, 2004; Yourman y Jeffers, 1999) en ambas zonas de estudio, pero estas deberán ser usadas de manera racional.

Además quedó evidente en este estudio, que la alta presión de selección que se ejerce en el Valle de Zamora relacionado con su alto nivel tecnológico está promoviendo el surgimiento de cepas insensibles a fungicidas producto de un manejo inadecuado de estas herramientas, y la falta de la aplicación de una estrategia anti-resistencia por parte de los comercializadores, productores y asesores técnicos.

6. CONCLUSIONES

- 1.- El modelo matemático de predicción log-logístico permitió estimar adecuadamente la sensibilidad (DE_{50}) de 62 aislamientos monospóricos de *Botrytis cinerea* colectados en los Valles de Zamora y Maravatío a fungicidas benzimidazoles y dicarboxamidas mediante los ensayos *in vitro* de germinación de conidios y crecimiento de micelio.
- 2.- La sensibilidad estimada (DE_{50}) para Iprodiona en la prueba de micelio vario en un rango de 0.23 a 0.89 $\mu\text{g/ml}$ para los aislamientos colectados en el Valle de Maravatío y de 0.22 a 3.0 $\mu\text{g/ml}$ en el Valle de Zamora. Para el caso de conidios el rango fue de 0.47 a 16.8 $\mu\text{g/ml}$ y de 0.59 a 22.60 $\mu\text{g/ml}$ en Maravatío y Zamora, Respectivamente.
- 3.- En el ensayo con Tiofanato Metílico la DE_{50} osciló entre 0.11 a $>2000 \mu\text{g/ml}$ en el Valle de Maravatío y de 0.82 a $> 3400 \mu\text{g/ml}$ en el Valle de Zamora para la prueba de micelio, mientras que en la prueba de conidios fue de 0.02 a 892 $\mu\text{g/ml}$ y de 0.01 a 2000 $\mu\text{g/ml}$, en Maravatío y Zamora, respectivamente.
- 4.- La comparación estadística de las distribución de la sensibilidad de *B. cinerea* a Iprodiona en ambas regiones de estudio mostró que los aislamientos de Zamora fueron menos sensibles a los de Maravatío en la prueba de micelio, sin embargo no fueron diferentes estadísticamente en la prueba de conidios.
- 5.- En general, los datos obtenidos mostraron un alto nivel de resistencia de *B. cinerea* al tiofanato metílico en ambas zonas de estudio, pero dicha resistencia fue mucho mayor en Zamora que en Maravatío
- 6.- El presente estudio demostró por primera vez en la existencia de poblaciones de *B. cinerea* resistentes a los benzimidazoles en dos de las zonas

más importantes de producción de fresa en México. Asimismo, indicaron que dichas poblaciones aun son sensibles a lo fungicidas dicarboxamidas.

8. - LITERATURA CONSULTADA

- Alves-Santos, F. M., Ramos, M. A. García-Sánchez, A. P. and Díaz-Dominguez J. M. 2002.** A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* 92:237-244.
- Amiri, A., Scherm, H., Brannen, P.M. and Schnabel, G. 2008.** Laboratory evaluation of three rapid, agar-based assays to assess fungicide sensitivity in *Monilinia fructicola*. *Plant Dis.* 92 (3): 415-420
- ASERCA, 1998.** Revista Claridades Agropecuarias: La producción de fresa en México y la generación de divisas. ASERCA-SAGARPA. México, DF. 38 p.
- Banno, S.; Fukumori, F.; Ichiishi, A.; Okada, K.; Uekusa, H.; Kimura, M.; Fujimura, M. 2008.** Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* 98 (4): 397-404
- Benito, P. Arranz, M., y Eslava, P. 2000.** Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Rev Iberoam Micol.* 17:S43-S46
- Brent J. K. and Derek W. H. 2007.** Fungicide Resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC Monograph No. 1. Second edition. Brussels, Belgium. 60 P.
- Bristow, P. R. 1991.** Botrytis fruit rot (gray mold) and blossom blight. *In:* Compendium of blackberry and Raspberry Diseases and Insects. APS Society, St. Paul, Minnesota. 101 p.

- Calle, B. J. 2005.** Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. Universidad de Puerto Rico. Tesis Profesional. 115 p.
- Callejas, G. Z. 1996.** Inducción de resistencia in Vitro, de *Botrytis cinerea* a Benomyl. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 47 p.
- Dekker, J. 1988.** Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: center for agricultural publishing and documentation. Pp. 1-15.
- Delph, C. J. 1988.** Resistance management strategies for Benzimidazoles. Pages 41-43 *In: Fungicide Resistance in North America.* American Phytopathological Society, St Paul, MN. USA.
- Domingues, R. J., Tofoli, J. G. and Pinto, R. F. 2004.** Sensibility "in vitro" to iprodione, growth rate and pathogenicity to Rosa sp. of *Botrytis cinerea* strains. *Ecossistema* 29:49-54
- Elad, Y., Williamson, P., and Delen, N. 2007.** *Botrytis: Biology, pathology and control.* Ed Springer. Dordrecht, The Netherlands. 403 p.
- Ellis, M. 1994.** Botrytis Fruit Rot "Gray Mold" of Strawberry, Raspberry and Blackberry. Ohio State University Extension Fact Sheet, Plant Pathology Department. Columbus, Ohio. 4p.
- Esterio, J. M., Auger, C. R. and García, H. 2007.** First Report of Fenhexamid Resistant Isolates of *Botrytis cinerea* on Grapevine in Chile. *Plant Disease* 91(6): 768
- FRAC. 2008.** FRAC Methods for monitoring fungicide resistance. *EPPO Bulletin* 21: 292-293.

- Free, S. J., Holtz, B. A. and Michailides, T. J. 1996.** Mating behavior in field populations of *Monilia fructicola*. *Mycologia* 88: 208-211.
- Foster B. and Staub T. 1996.** Basis for use strategies of anilopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection* 15(6): 529-537
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K. and Brygoo, Y. 1999.** Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transpose* and *vacuma*, are found in sympathy on numerous host plants. *Phytopathology* 89:967-973.
- Hilber, U. W., and Hilber-Bodmer, M. 1998.** Genetic basis and monitoring of resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines. *Plant Dis.* 82:496-500.
- Horst, R. K. 1997.** Compendium of rose diseases. American Phyttopathological Society. St. Paul, Minnesota. 62 p.
- Kars I. and van Kan J. A.L. 2007.** Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In: *Botrytis: Biology, pathology and control*. Elad, Y., Williamson, P., and Delen, N. Ed Springer. Dordrecht, The Netherlands. 403 p.
- Kirk, P. M. 2001.** Dictionary of the Fungi. 9° Ed. CAB International. Great Britain. 665 p.
- Lennox C. L. and Spotts R. A. 2003.** Sensitivity of Populations of *Botrytis cinerea* from Pear-Related Sources to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. *Plant Dis.* 87:645-649.

- Ma, Z. H. and Michailides, T. J. 2005.** Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. Plant Dis. 89:1083-1089.
- Ma, Z. H., Yan, L. Y., Luo, Y and Michailides T. J. 2007.** Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. Pesticide biochemistry and physiology 88: 300-306
- Maas, J. L. 1987.** Compendium of strawberry diseases. Second printing. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 138 p.
- Martínez, A. J. y A. O. Del Río Mora. 1975.** Principales enfermedades de la fresa en el Valle de Zamora, Mich. Instituto nacional de Investigación Agrícola. SAG. Centro de Investigación Agrícola del bajo. Folleto Misc. 27. 22 p.
- Matheron, M. 2001.** Modes of Action for Plant Disease Management Chemistries. 11th Annual Desert Vegetable Crop Workshop. University Of Arizona. Yuma, AZ, USA.
- Mendoza, Z. C. 1996.** Notas parasitológicas. Enfermedades Fungosas de la Fresa. 248 p
- Milicevic, T., Topolovec-Pintaric, S., Cvjetkovic B. and Ivic, D. 2006.** Sympatric subpopulations of *Botrytis cinerea* on strawberries based on the content of transposable elements and their connection with resistance to botryticides. Proc. V Int. Strawberry Symposium. Ed. G. Waite. Acta Hort. 708.
- Myresiotis, C. K., Bardas, G. A., and Karaoglanidis, G. S. 2008.** Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of

- anilinopyrimidine- and benzimidazoles resistant strains by these fungicides. Plant Dis. 92:1427-1431.
- Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S., and K. Tzavella-Klonari. 2007.** Resistance of *Botrytis cinerea* Isolates from Vegetable Crops to Anilinopyrimidine, Phenylpyrrole, Hydroxylanilide, Benzimidazole, and Dicarboximide Fungicides. Plant Dis. 91 (4): 407-413.
- Northover, J., and Matteoni, J. A. 1986.** Resistance of *Botrytis cinerea* to benomyl and iprodione in vineyards and greenhouses after exposure to the fungicides alone or mixed with captan. Plant Dis. 70:398-402.
- Tompson PLM. 2009.** Diccionario de Especialidades Agroquímicas. Thompson Ed.México, DF. 1804 p
- Tremblay, D. M., Talbot, B. G., and Carisse, O. 2003.** Sensitivity of *Botrytis squamosa* to different classes of fungicides. Plant Dis. 87:573-578.
- Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T., and Melgarejo, P. 2000.** Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. Phytopathology 90:1246-1249.
- Rebollar-Alviter, A., Madden, L. V., Jeffers, S. N., and Ellis, M. A. 2007.** Baseline and differential sensitivity to two QoI fungicides among isolates of *Phytophthora cactorum* that cause leather rot and crown rot on strawberry. Plant Dis. 91:1625-1637.
- Rodríguez, M. R. y Jiménez, A. L. 1985.** El problema de la tolerancia de *Mycosphaerella fijiensis* al fungicida benomil en plantaciones bananeras de Costa Rica. ASBANA. San José, Costa Rica. Pp. 16.

- Romero, C. S. 1993.** Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 347 p.
- Russell, P.E. 2007.** Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. FRAC Monograph No 3. CropLife International, Brussels, 60 p.
- Rusell, P.E. 1995.** Fungicide resistance: occurrence and management. Journal of Agricultural Science, Cambridge 124:317-323.
- SAGARPA 2009.** Sistema de Información Agrícola y Pecuaria. Página web: http://siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeagr.html (20/01/2009)
- Staub, T. 1991.** Fungicide resistance: practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. Ann. Rev. of Phytopathology 29:421-442.
- Vincelli, P., and Tisserat, N. 2008.** Nucleic Acid-Based Pathogen Detection in Applied Plant Pathology. Plant Dis. 92: 660-669.
- Yarden O. and Katan T. 1993.** Mutations leading to substitutions at amino acids 198 an 200 of beta-tubulin that correlates with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. Phytopathology 83: 1478-1483.
- Yourman, L. F., and Jeffers, S. N. 1999.** Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 83:569-575

9. ANEXOS

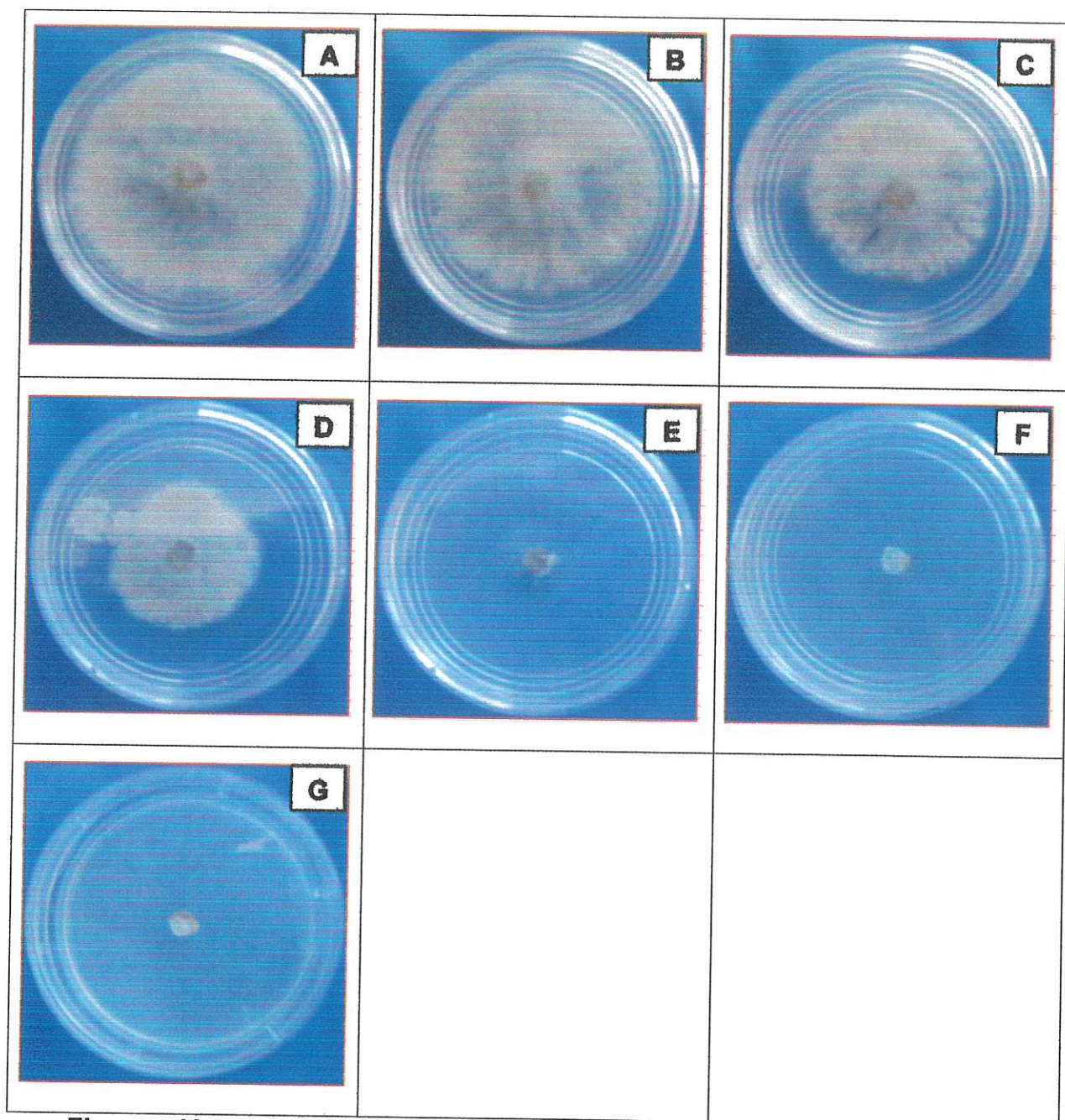


Figura 10. Inhibición del crecimiento micelial en *Botrytis cinerea*, aislamiento Z16b-1 en medio de cultivo PDA con diferentes concentraciones de Iprodiona. A) Testigo, B) 0.1 µg/ml, C) 0.5 µg/ml, D) 1 µg/ml, E) 10 µg/ml, F) 50 µg/ml y G) 100 µg/ml.

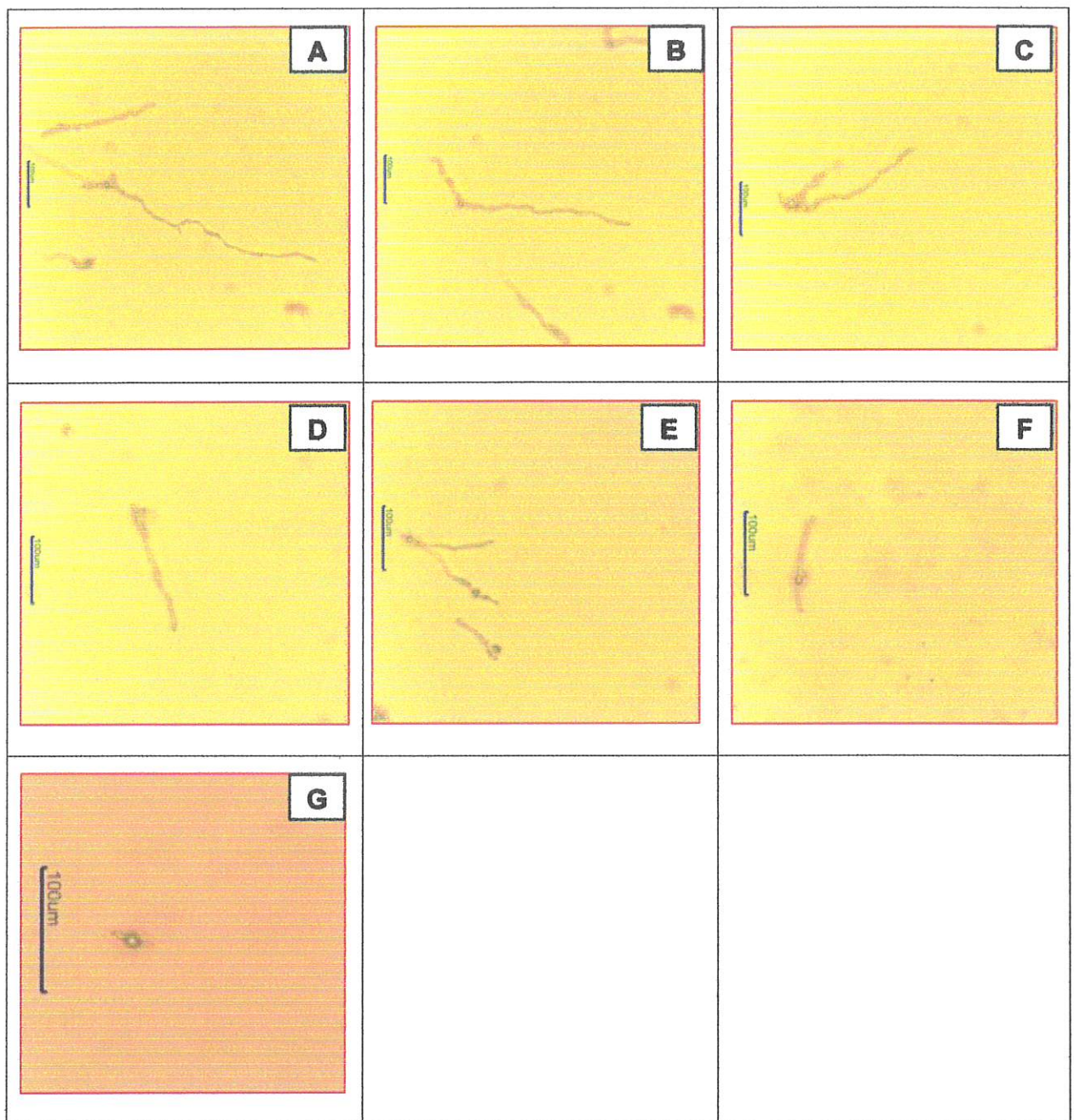


Figura 11. Inhibición de la germinación de conidios de *Botrytis cinerea*, aislamiento Z14a-1 en medio de cultivo AA con diferentes concentraciones de Iprodiona. A) Testigo, B) 0.1 µg/ml, C) 0.5 µg/ml, D) 1 µg/ml, E) 10 µg/ml, F) 100 µg/ml y G) 1000 µg/ml.