

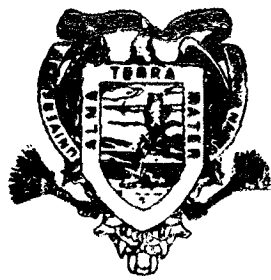
DETERMINACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD A
FUNGICIDAS DE AISLAMIENTOS DE Botrytis cinerea
OBTENIDOS DE ROSAL

LUIS JAVIER MENDOZA MELENDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



Universidad Autónoma Agraria
"Antonio Narro"
BIBLIOTECA
PROGRAMA DE GRADUADOS
Buenavista, Saltillo, Coah.

OCTUBRE DE 1999

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

DETERMINACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD A FUNGICIDAS DE
AISLAMIENTOS DE *Botrytis cinerea* OBTENIDOS DE ROSAL.

TESIS

POR

LUIS JAVIER MENDOZA MELENDEZ

Elaborada bajo la supervisión del comité particular
de asesoría y aprobada como requisito parcial para optar
al grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGIA AGRICOLA

COMITE PARTICULAR

Asesor principal

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor

Dr. Melchor Cebeda Siller

Asesor

Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez

Asesor

Dr. Alfonso Reyes López

Dr. Ramiro López Trujillo.
Subdirector de Postgrado

Buenvista, Saltillo, Coah. Octubre de 1999

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” por darme de nuevo oportunidad de capacitarme en sus aulas, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ya que si el apoyo económico brindado no hubiera podido llevar a cabo estos estudios. Al Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, por los apoyos económicos y por tener actualmente dentro de su equipo a uno de mis asesores quien es una pieza fundamental en la conclusión del presente me refiero al Dr. Eugenio Guerrero.

A un gran maestro y amigo quien me ha guiado en mi desarrollo profesional, Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe. A mis asesores por su participación y consejos para la conclusión del presente trabajo Dr. Daniel Hernández Castillo, Dr. Melchor Cepeda Siller, Dr. Alfonso Reyes López. Al coordinador de la Maestría Dr. Jerónimo Landereos Flores.

A quienes han colaborado en mi formación profesional, Dr. Gustavo Frías Treviño, MC Luis Angel Villarreal García, MC José Manuel Gutiérrez Ruelas.

A todos mi compañeros de trabajo y en especial a quienes me han ayudado en la captura y formato del presente documento Nora Aidé Montalvo Cadena y Silvana Penelope Aranda Rojas.

DEDICATORIA

A mis padres C. Isidro Mendoza Mejia y C. María Cristina Melendez Bernal todos sus sacrificios, y consejos para seguir adelante y todo el esfuerzo que realizado para que yo haya llegado hasta donde estoy.

A mis hermanos Jorge Isidro, Sergio Alberto, Carlos Guillermo, José Salvad

A mi esposa Rosa María Muciño Mares, por todo el amor que me has dado tu paciencia, entrega, comprensión, y motivación para concluir el presente trabajo.

A mis hijos Luis Javier y Diana Jeannette, a quienes dejé en varias ocasi para concluir este trabajo y quienes son el motor de mi vida.

COMPENDIO

DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A FUNGICIDAS DE
AISLAMIENTOS DE *BOTRYTIS CINEREA* OBTENIDOS DE ROSAL.

POR

LUIS JAVIER MENDOZA MELENDEZ

MAESTRIA

PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. OCTUBRE 1999

DR. Francisco Daniel Hernández Castillo-Asesor

Palabras claves: *Botrytis cinerea*, adaptabilidad susceptibilidad, resistencia.

El presente trabajo surge a partir de la inquietud de los productores de rosa de región sur del estado de Coahuila, ya que a pesar de aplicar diferentes fungicidas, r hubo un control del hongo *Botrytis cinerea*. Se evaluó la susceptibilidad de los diferentes aislamientos del hongo a diferentes fungicidas y la patogenicidad de estos e

explantes de rosal. Los fungicidas evaluados fueron dos benzimidazoles (Benomyl y Tiabendazol) y dos pertenecientes al grupo de las dicarboxamidas (Vinclozolin e Iprodione). El material biológico fue aislado de invernaderos del rancho Guadalupe, de invernaderos del rancho Capulin ambos ubicados en el sur del Estado de Coahuila, y de plantas provenientes del Estado de México que se comercializan en la ciudad de Saltillo, Coah. En los resultados se detectaron diferencias significativas entre las pruebas realizadas que fueron: dosis letal 50 para cada uno de los fungicidas utilizados, porcentaje de germinación, esporulación o producción de conidias, incidencia y severidad; derivado de los mismos se concluye que todos los aislamientos presentaron moderada y alta resistencia a los Benzimidazoles, para las dicarboxamidas se presentó un aislamiento con moderada resistencia al Vinclozolin y al Iprodione, otro aislamiento presentó moderada resistencia a Vinclozolin y otro diferente a Iprodione; en las pruebas de adaptabilidad de los aislamientos se demostró que no existe una relación entre resistencia y adaptabilidad. Por lo que se asume que los genes que confieren resistencia no están ligados con los genes de virulencia.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE SUSCEPTIBILITY TO FUNGICIDES
ISOLATION THE *Botrytis cinerea* OBTAINED OF ROSE.

FOR

LUIS JAVIER MENDOZA MELENDEZ

MASTER OF SCIENCE

PLAN PROTECTION

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. OCTUBRE 1999

DR. Francisco Daniel Hernandez Castillo-Adviser

Key words: *Botrytis cinerea*, adaptability, susceptibility, resistance.

The present work arise from the restlessness of the rose producers of the south region of the State of Coahuila, since in spite of the applying of different fungicides, there were not a control of the *Botrytis cinerea* fungus. It was evaluated the susceptibleness of the different isolations of the fungus to different fungicides and the pathogenically of these on rosebush Explantes. The fungicides evaluated were two Benzimidazoles (Benomyl and Tiabendazol) and two belonging to the group of the

Dicarboxamidas (Vinclozolin e Iprodione). The biological material was isolated of greenhouses of Guadalupe Ranch, of greenhouses of the Capulin Ranch both located at the South of the State of Coahuila, and of becoming plants of the State of Mexico that are marketed in the city of Saltillo, Coah. In the results were detected significant differences between the carried out tests, which were: lethal dose 50 for each one of the used fungicides, percentage of germination, esporulation or production of conidium, incidence and severity: derived of the same it is concluded that all the isolations presented moderating and high resistance to the Benzimidazoles, for the dicarboxamidas presented an isolation with moderating resistance to the Vinclozolin and to the Iprodione, an other isolation presented moderating resistance to the Vinclozolin and to other different than Iprodione; in the tests of adaptability of the isolations was showed that does not exist a link between resistance and adaptability. Because of it is assumed that the genes which confer resistance are not joint to the genes of virulence.

INDICE

	Página
INDICE DE CUADROS	xi
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
Ubicación Taxonómica de la Rosa	3
Descripción botanica	3
Requerimientos ecológicos	4
Temperatura	4
Luz	5
Humedad	6
Suelo	7
Necesidades nutricionales	7
Clasificación Taxonómica del Moho Gris	8
Descripción del Patógeno	9
Síntomas	10
Resistencia a Fungicidas	10
Resistencia a benzimidazoles	11
Resistencia a dicarboxamidas	11
Modo de Acción de los Fungicidas	12
Benzimidazoles	12
Dicarboxamidas	13
MATERIALES Y METODOS	15
Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i>	15
Incremento de Inoculo	17
Bioensayos de Fungicidas <i>B. cinerea</i> a	18

Determinación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial	19
Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 y 95	19
Valor Adaptativo de <i>B. cinerea</i>	19
Germinación de Conidias.	20
Incidencia y Severidad de <i>B. Cinerea</i> en Pétalos de Rosal	21
Producción de Conidias	22
RESULTADOS	24
Aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i>	24
Bioensayos con benomilo	24
Bioensayos tiabendazol	25
Bioensayos con vinclozolin	27
Bioensayos con iprodione	28
Pruebas de Adaptabilidad <i>B.Cinerea</i>	29
Germinación de Conidios de los Diferentes Aislamientos	29
Incidencia de <i>B.cinerea</i> en pétalos de rosal	30
Severidad de <i>B. cinerea</i> en pétalos de rosal	31
Producción de conidias.	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39
APENDICE	44

INDICE DE CUADROS

CuadroNo	Descripción	Pagina
4.1	Cepas de <i>Botrytis cinerea</i> aisladas de rosal utilizadas para estudiar el valor adaptativo.	25
4.2	Concentración inhibitrís 50 y sus límites fiduciales de aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> al benomilo.	26
4.3	Concentración inhibitrís 50 y límites fiduciales de aislamientos <i>Botrytis cinerea</i> al tiabendazol.	27
4.4	Concentración inhibitrís 50 y límites fiduciales de aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i> al iprodione.	28
4.5	Concentración inhibitrís 50 y límites fiduciales de aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> al vinclozolin.	29
4.6	Germinación (expresada en por ciento) de los diferentes aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i>	30
4.7	Incidencia expresada en por ciento de los diferentes aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i>	31
4.8	Severidad expresada en número de lesiones de los diferentes aislamientos de <i>B. cinerea</i>	32
4.9.	Producción de conidios esporas por centímetro cuadrado de los diferentes aislamientos de <i>B. cinerea</i>	33
5.1.	Síntesis de los diferentes parámetros evaluadas para las cepas de <i>B. cinerea</i>	35

INTRODUCCION.

El rosal (*Rosa sp.*) es la flor de jardín más cultivada y la flor de invernadero más importante comercialmente considerada como símbolo perfecto de belleza, y de las especies ornamentales es la única flor que se puede cosechar durante todo el año. El rosal pertenece a la familia Rosacea y al género rosa que incluye aproximadamente 200 especies. La rosa a sido considerada desde los tiempos más remotos como una de las flores más elegantes por lo que su historia se remonta a 300 años, a la fecha existe un impresionante gusto por esta flor, en México se cultivan alrededor de 600 ha localizadas principalmente en los estados de Morelos, Michoacán, México, Puebla, Hidalgo y el Distrito Federal. (Mendoza 1993)

En el ámbito regional se cultivan bajo condiciones de invernadero aproximadamente 7.5 ha las cuales tienen una alta inversión debido a la tecnificación de los mismos, en los cuales se genera ocupación a 8 personas por ha sin contar el área de empaque.

A pesar de la alta tecnología con la que cuentan estos invernaderos el cultivo se ve afectado por el ataque de varios microorganismos, de los cuales destacan los hongos, bacterias, virus y los nemátodos, además de las enfermedades abióticas

ocasionadas por excesos o deficiencias de nutrimentos, agua, potencial hidrógeno (pH), o por condiciones ambientales extremas (Mendoza, 1993).

De todas las enfermedades en este cultivo, las ocasionadas por hongos son las que mayores pérdidas económicas originan, ya que prácticamente todas las partes de la planta son susceptibles de ser atacadas por estos patógenos, una de las más importantes es la que ocasiona el moho gris que es producido por *Botrytis cinerea* el cual puede causar fuertes daños desde la producción en invernadero, aunque las mayores pérdidas son producidas en almacén, (Mendoza, 1993).

En la zona productora de rosas en el sur del Estado de Coahuila, se registran grandes pérdidas en la producción de rosas en invernadero; así como en el almacenamiento y transporte de las mismas, sin lograr obtener un eficiente control con ningún fungicida, por lo que derivado de los problemas para el control de *B. cinerea* se estableció el presente estudio para conocer las causas del bajo o nulo control de este hongo. Por lo que los objetivos son; conocer la susceptibilidad de los aislamientos de *B. cinerea* a diferentes fungicidas, conocer el valor adaptativo de las cepas susceptibles y resistentes de *B. cinerea* a diferentes fungicidas .

REVISION DE LITERATURA

Ubicación Taxonómica del Rosal

De acuerdo a Cronquist (1986) el rosal se ubica en la siguiente posición taxonómica.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Subfamilia	Rosaideae
Género	<i>Rosa</i>
Especie	<i>spp</i>

Descripción Botánica.

Según la especie, el rosal puede ser de tipo arbustivo, de tallo bajo, alto, rastrero o sarmentoso, liso o veloso o guarnecido de afiladas y curvadas espinas; hojas caducas o semiperennes, alternas imparipinadas, foliadas, ligeramente dentadas, estipuladas y de matiz verde y brillante. Las flores, en su gran mayoría, est:

compuestas de cinco sépalos divididos con cinco pétalos, numerosos estambres y carpelos insertos en un receptáculo copado, que da lugar a un fruto carnoso de color rojo a amarillo al madurar, según sea la especie. Las flores de gran belleza, pueden ser de color blanco, púrpura rosa, amarillo, solitarias o reunidas en un corimbo terminal, aunque por medio de las cruces e hibridaciones se han obtenido nuevas formas y colores con un gran número de pétalos.

Requerimientos Ecológicos

Temperatura.

El calor es el más poderoso excitante para el desarrollo y la actividad de las plantas, diversos investigadores coinciden en afirmar que durante la noche tiene lugar un mayor crecimiento de los rosales que durante el día. Se ha llegado a la conclusión que las temperaturas nocturnas bajas alargan mucho el período entre dos floraciones, pero el botón floral será más grande. Lo contrario ocurre con temperaturas nocturnas altas, entonces el floricultor deberá fijar la temperatura nocturna sobre la base de criterios comerciales (López, 1980). De acuerdo a Trejo (1988) cuando las temperaturas mínimas descienden por debajo de 8 a 10 °C durante la noche, en temporada de invierno, las plantas tienden a dormirse y por lo tanto aumenta el ciclo de producción, y la productividad disminuye significativamente.

Larson (1987) indica que en invernaderos donde las temperaturas se mantiene demasiado altas, el tamaño de la flor es pequeño con pocos pétalos y la calidad es mala debido al mayor crecimiento herbáceo de flores y tallos, al respecto Moe (1972) menciona, que a su vez las altas temperaturas promueven el rompimiento de yemas e incrementan la floración; sin embargo, reducen la longitud final de los tallos a floración.

Por otra parte, en diversos estudios se menciona que el peso seco y fresco es mayor en combinaciones de temperaturas diurnas bajas de 15 a 17°C y temperaturas nocturnas bajas de 12 a 14 °C, además estas condiciones promovieron un incremento de calidad, mayor diámetro de tallo, peso fresco y seco, sin embargo se retrasó el ciclo productivo

Luz

La luz no solo influye en la producción floral sino también en la función clorofílica que se realiza en las hojas y de manera muy notable en la formación del aroma y coloración de pétalos florales. El rosal requiere una exposición muy soleada y únicamente en los climas de temperatura ardiente admite en pleno verano una situación entre sol y sombra en las h más calurosas del día (Juscáfresa, 1979).

Nell (1979) observó que en los meses de invierno el diámetro de los tallos se redujo debido a bajas intensidades lumínicas recibidas y la producción de los tallos ciegos se incremento.

Larson (1987) cita que la producción floral es potencialmente alta en verano cuando prevalecen altas intensidades y duración de luz diarias, y lo contrario pasa en invierno cuando las intensidades de luz son bajas y las h totales de luz son pocas. Utilizando un conjunto de fuentes de luz de los tipos de descargas de alta intensidad a combinaciones de lámparas fluorescentes e incandescentes, se han demostrado que la iluminación suplementaria mejora con un incremento de un 50 hasta un 240 % en la producción.

Humedad

Juscafresa (1979) establece que en la época de verano, sea cual sea la situación las necesidades hídricas del rosal aumentan y se precisa darle los riegos convenientes, para cubrir sus necesidades equilibradamente. Así, en una atmósfera húmeda, es más recomendable dar riegos de pie que de aspersion, con objeto de no aumentar la humedad del ambiente y saturar constantemente de agua las hojas de la planta, ya que fomentara la invasión de los parásitos causantes de la enfermedad del mildiuo. En atmósfera seca, resulta más aconsejable regar los rosales por el sistema de aspersion y no de pie a fin de que las hojas puedan tener una humedad conveniente.

Suelo

Trejo (1988) menciona que el rosal, es una planta exigente en disponibilidad de oxígeno por las raíces y por ello requiere un buen drenaje, siendo indispensable disponer de un sistema de drenaje artificial para eliminar hacia los colectores cualquier exceso de agua, dejando una profundidad segura para el desarrollo de raíces sin que se pudran. El rosal necesita que la cantidad de oxígeno en el suelo sea mayor al 5 por ciento, aunque lo ideal es cercano al 20 por ciento. Para garantizar la buena condición física del suelo hace falta un gran porcentaje de materia orgánica, un buen nivel se considere alrededor del 8 por ciento.

Necesidades nutricionales

El nitrógeno es el elemento que más influye en el desarrollo del rosal, no obstante debe ir siempre acompañado del fósforo y potasio en forma equilibrada para obtener una máxima eficacia. El exceso de nitrógeno estimulará una mayor biomasa y carecerá de resistencia a la invasión de patógenos y al ataque de insectos, además, utilizará la mayor parte de sus reservas en la formación de tallos y hojas en detrimento de la producción floral (Hildebrand y Heinicke 1937).

El fósforo después del nitrógeno es uno de los elementos más importantes, ya que aporta energía, ayuda a la movilización de sustancias en la planta y también aumenta la precocidad y desarrollo de la floración (Ozanne 1980).

Respecto al potasio Beringer y Northdurft (1985) mencionan que también es considerado elemento básico para la formación y elaboración de materia orgánica. Contribuye a dar resistencia a la sequía, al frío, a la invasión de patógenos y al ataque de insectos.

El magnesio contribuye al desarrollo vegetativo de la planta y mejora la calidad de las flores. Un cultivo de rosal en invernadero con buenos rendimiento extrae al año 100 g de nitrógeno, 25 g de ácido fosfórico y 100 g de potasio, por m² (Juscafresa, 1979).

Clasificación Taxonómica del Moho Gris

De acuerdo a Alexopoulos (1979) el moho gris se ubica en la siguiente posición taxonómica:

Reino	Mycetae
División	Amastagomycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Hyphomycetidae
Orden	Moniliales
Familia	Moniliacea
Genero	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>cinerea</i>

Descripción del Patógeno

El hongo forma colonias difusas, de color gris, verde grisáceo, verde olivo oscuro a café negruzco, pocas veces cafés o verde rojizas, polvorientas a causa de la conidias de textura ligera o compactas, hasta de dos mm de altura. Los conidióforos son erectos o ramificados, septados de 11 a 23 μ de diámetro, de pared café negruzca casi hialinos hacia el ápice, con tres o más ramificaciones en el ápice en las cuales se forman conidios solitarios, sobre vesículas finas.

El ápice del conidióforo crece entre las vesículas presionándolas y apartándolas, entre unas y otras existe cierta distancia de tal manera que el conidióforo adopta posición lateral, las conidias son tan numerosas en las protuberancias que dan lugar a cabezuelas grandes que pronto se desprenden. Los conidios son ovales o elípticos a casi globosos, con base ligeramente puntiaguda, de 9 a 12 x 6.5 a 10 μ pared casi hialina levemente parduzca (Gilman 1963).

En las partes dañadas de las plantas pero principalmente en las más suculentas se pueden formar estructuras de forma irregular por lo general aplanadas y de color negro denominados esclerocios, cuya función es de sobrevivencia de la especie en condiciones desfavorables y de las cuales se puede formar la fase sexual asca denominada *Botryotinia fuckliana* (De bary) Mendoza 1993.

Síntomas

Los síntomas iniciales se presentan por lo general como pequeñas manchitas circulares acuosas que se aprecian blancas en pétalos rojos y cafés claros en pétalos blancos, de menos de 1 mm de diámetro sobre los pétalos exteriores. Si las condiciones lo favorecen, las lesiones crecen más y llegan a cubrir gran parte de los pétalos los cuales se tornan cafés y blandos y posteriormente se deshidratan y se secan. Los botones que son afectados no abren y se encorvan. En los tallos se notan lesiones negro grisáceos, lisas o ligeramente hundidas, pueden infectar las puntas de los tocones donde se cortan las flores, o donde se realizan las podas (Mendoza 1993).

Resistencia a Fungicidas

El término adquisición de resistencia es usado en una población cuando ésta es normalmente sensible a un biocida, y aparecen formas que son menos sensitivas a este tóxico. Esta resistencia puede tener bases genéticas y ser estable, o pueden ser adaptaciones fisiológicas y desaparecer rápidamente cuando el organismo no es expuesto al tóxico (Dekker, 1976). La resistencia puede deberse a un decremento de la permeabilidad de la membrana, a la conversión de la materia activa en compuesto inactivo (Kappas y Georgeopoulus, 1970), a un decremento en la habilidad del hongo para la conversión de un compuesto fungitóxico a un decremento a la afinidad del sitio de acción.

Estos productos fueron uno de los primeros fungicidas sistémicos puestos en práctica para un amplio espectro de patógenos en muchas especies de plantas (Delp, 1987).

Los benzimidazoles fueron introducidos a fines de los sesenta, y en su tiempo de ingreso al mercado se les consideró como fungicidas únicos y con buenas perspectivas en el control de enfermedades; sin embargo, Davidse (1973) realizó estudios donde delimitó un único sitio de acción, y por ende el potencial para inducir resistencia basada en estos atributos no fueron apreciados durante el desarrollo de estos fungicidas.

Los reportes de resistencia a los benzimidazoles surgieron a partir de 1969; no fue sino hasta 1974 cuando se presentó un fuerte problema con *Cercospora arachidicola* (Litrell), a partir de esta a la fecha abundan reportes donde se habla de la disminución o pérdida de la capacidad para controlar diferentes especies fungosas por parte de estos compuestos (Jones y Ehret, 1976).

Resistencia a dicarboxamidas

Estos productos fueron registrados en Francia en 1975, con la introducción de fungicidas como iprodione, vinclozolin, procymidone, por mencionar algunos. Posteriormente fueron registrados e introducidos a otros países, incrementándose su uso fuertemente en viñedos para el control del moho gris ocasionado por *B. cinerea* y

para su uso en hortalizas, esto debido principalmente al desarrollo de la resistencia a los benzimidazoles, desde 1970 y al alto nivel de eficiencia obtenido con las dicarboxamidas para el control de enfermedades ocasionadas por *Monilia spp.*, *Sclerotinia spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, y *Rhizoctonia spp.*

Las dicarboxamidas son generalmente productos fungistáticos, que dieron excelentes resultados, motivo por el cual se empezó un mal uso de los mismos, resultando en reportes de resistencia a partir de 1979.

De 1979 a 1984 reportes de aislamientos de *B. cinerea* en cultivos de fresa, tomate y vid en países como República Federal Alemana, Bélgica, Nueva Zelanda, Japón y Canadá determinaron presencia de resistencia a estos fungicidas (Holz, 1979; Maraite, 1981; Beever, 1983; Murakishi, 1982; Northover, 1984).

Modo de Acción de los Fungicidas

Benzimidazoles

Inhiben la mitosis en el proceso de reproducción de los hongos (Clemons y Sisler, 1971; Davidse, 1973; Hammerschlag y Sisler 1973). Estudios citológicos confirman la idea de la inhibición del ensamble de los microtubulos como el primer mecanismo de acción de los benzimidazoles; los microtubulos juntos así como la

intermedia y la actina de los filamentos son el mejor componente de la estructura celular un rasgo único y distintivo de las células eucarióticas.

El uso de fungicidas que afecta la tubulina, resulta en la inhibición del ensamble de los microtubulos, existiendo microtubulos dispersos por tener ellos un equilibrio con la tubulina. La intervención de los microtubulos en procesos celulares como la meiosis, mitosis, transporte de moléculas, partículas y organelos y en el mantenimiento y formación de las células, provee que al inhibir la conducción de estos ensambles en general se causa un fuerte disturbio en la función de las células. (Davidse, 1986; Morris, 1986).

Dicarboxamidas

Las dicarboxamidas inhiben la germinación de las conidias así como el crecimiento micelial (Lacroix *et al.*, 1974; Pommer y Mangold, 1975; Hisada *et al.*, 1977). En *B. cinerea* se han reportado afectando el metabolismo de los lípidos; así como, en la síntesis de ADN (Fritz *et al.*, 1977).

El modo de acción de estos fungicidas no ha quedado del todo claro por lo que ha sido sujeto de severos estudios. Estos fungicidas son agrupados con los fungicidas aromáticos hidrocarburos, como el cloroneb, dicloran y quintozeno porque las mutaciones resistentes a dicarboxamidas mostraron también resistencia a la familia de los fungicidas aromáticos. Georgopoulus *et al.* (1979) señalan que tanto los

aromáticos como las dicaboxamidas causan inestabilidad mitótica en *Aspergillus nidalus* y concluye que los efectos en cromosomas y posiblemente en la división mitótica son las principales bases para la fungitoxicidad, Kato (1983) por su parte propone que las dicarboxamidas son como el metil tolclofos que pueden inducir la acción tóxica por la unión de los microfilamentos de la molécula con las células del hongo.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de fitopatología y cámaras bioclimáticas del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” y en invernaderos comerciales del sur del estado de Coahuila.

Aislamientos e identificación de *B. cinerea*.

Los aislamientos se obtuvieron de invernaderos comerciales de rosa de la región de influencia de Saltillo, Coah; uno ubicado sobre la carretera 57 en su tramo Saltillo-Matehuala, a 60 km. de la ciudad de Saltillo, el otro invernadero se encuentra ubicado en el cañón de la Carbonera en la Sierra de Arteaga, Coah. También se obtuvieron aislamientos de rosas destinadas para su venta en la ciudad de Saltillo, Coah. provenientes del estado de México.

Los muestreos para la obtención de los aislamientos se realizaron de manera constante cada semana a partir del mes de febrero hasta el mes de septiembre de 1994. En cada muestreo se colectaron hojas o pétalos que presentaron síntomas de la enfermedad, los cuales fueron depositados en bolsas de polietileno, para evitar su

deshidratación, las bolsas eran identificadas con la localidad, número del invernadero y la fecha de colecta.

Las muestras se transportaron al laboratorio de fitopatología del Departamento de Parasitología de esta Universidad, lugar donde las muestras fueron procesadas. El tejido enfermo se cortó en Cuadros de aproximadamente 0.5 cm² cuidando que llevara parte con lesión del patógeno y parte sana. Posteriormente se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 2 por ciento por 1 min, en seguida se enjuagó por dos ocasiones en agua destilada estéril, se secó con papel secante estéril y se sembró en placas de Petri con papa dextrosa agar (PDA) para posteriormente colocarse en incubadora a una temperatura de $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A las 48 h se procedió a realizar la purificación de *B. cinerea* para lo cual se hicieron aislamientos de punta de hifa; esto consistió en tomar únicamente el ápice de una hifa del micelio, procedimiento que requería ser observado en el microscopio estereoscópico, bajo condiciones de asepsia en una cámara de transferencia.

Una vez obtenido el ápice de la hifa con medio de cultivo se transfería a una caja Petri con medio de cultivo PDA la que se incubó a $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta el momento en que el hongo presentara estructuras reproductivas para identificación y confirmación de que efectivamente se tratara de *B. cinerea*, para lo cual se utilizaron las claves de (Gilman 1963).

Una vez identificado el aislamiento se procedió a realizar los cultivos monospóricos. La técnica para obtener estos cultivos es la siguiente; en cajas Petri con estructuras reproductivas se realizó un lavado de las mismas con agua destilada estéril más 20 gotas de tween 20 por litro. Se agregaron 10 ml de esta solución a las cajas para remover las conidias, para lograr la homogenización de la suspensión se utilizó un agitador para tubos de ensaye por espacio de 1 min a 10 rpm..

Con la suspensión ya homogenizada se realizaron diluciones con una pipeta estéril, hasta la dilución 10^{-6} cuando se obtuvo una concentración de aproximadamente 300 conidias por ml. Una vez homogeneizada esta solución se utilizó una pipeta Pasteur para tomar una pequeña cantidad de esa suspensión y depositarla en una caja Petri, la cual era distribuida posteriormente con una varilla de vidrio previamente flameada en mechero de alcohol.

Las cajas de Petri se depositaron en una incubadora a $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h tiempo en el que germinan las conidias, las cuales se observaron en el microscopio compuesto con el ocular 10X, con ayuda de una aguja de disección se extrajeron las conidias germinadas tratando de encontrar separadas unas de otras y se transfirieron en cajas Petri con PDA y se incubaron $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente estas cepas se conservaron en tubos de ensaye con PDA en refrigeración a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Incremento del Inóculo

De los tubos de ensaye con PDA se tomaba una pequeña porción de medio con micelio del hongo depositando en el centro de las cajas de Petri con PDA, 5 cajas por cada aislamiento, las cuales eran selladas con cinta plastipack e incubadas durante 96 h a $18 \pm 2^\circ\text{C}$, para permitir el crecimiento del hongo. Después de ese tiempo el inóculo era conservado en un refrigerador a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta su utilización en los bioensayos.

Bioensayos de Fungicidas en *B. cinerea*

Se utilizaron cuatro fungicidas dos benzimidazoles, (benomilo, y tiabendazol), y dos dicarboxamidas (iprodione, y vinclozolin). Con los fungicidas anteriores se prepararon soluciones madre a 10000 $\mu\text{g/ml}$. de PDA de la cual se realizaron las diluciones, para agregarlas a medio de cultivo con PDA.

Para el caso de los benzimidazoles se preparo medio de cultivo con 0, 0.5, 50, 500, 1000, 2000, 2500 y 3000 $\mu\text{g/ml}$. Para las dicarboxamidas se utilizaron las siguientes dosis: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Al medio de cultivo con PDA previamente esterilizado y a una temperatura aproximada de 45°C se le agregó el fungicida en las dosis señaladas anteriormente, agitándose por un minuto, se vació en cajas Petri de plástico de 8.4 cm de diámetro y se dejaron reposar por 24 h para ser sembradas posteriormente con las diferentes cepas aisladas.

La transferencia de los aislamientos se realizó simultáneamente en medio de cultivo con y sin fungicida. Este se efectuó cuando las cepas tenían aproximadamente 72 h en una incubadora a $18 \pm 2^\circ\text{C}$. Para ello se hicieron explantes con un sacabocados de 0.5 cm de diámetro, colocandolo con la ayuda de una aguja de disección en el centro de la caja Petri con PDA y PDA con las diversas concentraciones del fungicida.

Las cajas se incubaron a $18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ con 12 h de fotoperíodo, hasta el momento en que la caja testigo tuviera un crecimiento micelial de las tres cuartas partes de su capacidad lo cual ocurría generalmente a las 96 h.

Determinación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial

Esta evaluación se realizó en el momento en que el testigo cubría casi la totalidad de la caja, para ello se toma el diámetro del crecimiento del testigo y el mismo se consideró como cero por ciento de inhibición.

Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 y 95

Con el porcentaje de inhibición por dosis y con la ayuda del programa de computación Polo Pc; se determinaron los valores de concentración inhibitoria 50 y 95 (CI_{50} y CI_{95}).

Valor Adaptativo de *B. cinerea*

Después de conocer la concentración inhibidora 50 y 95 de los aislamientos de *B. cinerea* se procedió a realizar las pruebas para determinar el valor adaptativo de los aislamientos considerando, germinación, incidencia, severidad y producción de conidios.

Germinación de Conidias

De cada aislamiento se realizó el lavado de las cajas con agua destilada estéril más tween 20, depositándolos en tubos de ensayo, para ser agitados por un minuto, una vez lograda la homogenización de la suspensión y la liberación de las conidias del micelio, se realizó la centrifugación, a 3000 rpm por 10 min con la finalidad de concentrar todas las conidias y eliminar las partículas de micelio.

De la solución concentrada se realizaron diluciones hasta tener una concentración de aproximadamente 400 conidias por mililitro, misma que fue depositada en cajas Petri una gota de la suspensión, la cual fue extendida con una varilla de vidrio, con tres repeticiones por aislamiento.

Las cajas se depositaron en incubadora a 18°C durante 24 h tiempo en el cual se procedió a realizar la observación bajo microscopio compuesto, con el ocular 10X. De cada repetición se contaron 100 conidias al azar, anotándose el número de conidias

germinadas y no germinadas, expresándose el resultado como el por ciento de germinación para cada aislamiento.

Incidencia y Severidad de *B. cinerea* en Pétalos de Rosal

Esta parte de trabajo se realizó con los nueve aislamientos, los cuales se incrementaron en cajas Petri con medio PDA, contando con cuatro cajas por aislamiento, los que se incubaron por 15 días, hasta la formación de conidias del hongo.

Las conidias fueron lavadas de las cajas con agua destilada estéril más Tween 20. El agua de este lavado se depositó en tubos de ensaye para ser homogeneizados en un agitador Vortex, por un min; la concentración de las conidias se realizó con una centrífuga a 3000 rpm por un tiempo de 10 min. El sobrenadante se eliminó, y al concentrado de esporas se le volvió a agregar agua destilada estéril para resuspender las conidias y tomarla como suspensión madre. La concentración de la suspensión de esporas para la inoculación de los pétalos de rosa, se obtuvo de diluciones de la suspensión madre empleándose una concentración de 200,000 conidias por ml.

Para la inocular las esporas del hongo en los pétalos de rosa se utilizó la variedad "Royalti", la que fue proporcionada por un invernadero de la región. Con la finalidad de obtener un área homogénea para cada inoculación, se hicieron círculos de pétalos de rosa con un sacabocados de un centímetro de diámetro, los que se

colocaron en cajas de Petri con papel filtro estéril, humedecido con agua destilada estéril y una malla de polietileno colocada sobre este para evitar el contacto directo de los pétalos con la humedad del papel.

La inoculación se realizó con una atomizador manual, depositando 1 ml de la suspensión conidial por pétalo utilizado; para el caso del testigo únicamente se asperjo con agua destilada estéril, se emplearon tres repeticiones por aislamiento y ocho círculos de pétalo por caja Petri; las evaluaciones se realizaron como se indica a continuación:

Para el caso de la incidencia; del total de los pétalos inoculados se contó el número de pétalos que presentaran lesiones típicas ocasionadas por *B. cinerea* y el resultado se expresó en por ciento de pétalos dañados.

Para medir la severidad; de cada pétalo que presentó daño se contó el número de lesiones y el tamaño de las mismas. Para las dos evaluaciones se realizó la toma de datos cada 24 h hasta que en alguno de los tratamientos los pétalos presentaran un daño total.

Producción de Conidias.

Para la evaluación de producción de conidias se utilizaron los mismos pétalos del estudio que se realizó para medir la incidencia y severidad de *B. cinerea*, los cuales

después de cada evaluación eran depositados nuevamente en la cámara bioclimática. La medición de la producción de conidias se llevó a cabo en el momento en el que todos los aislamientos presentaran cuando menos un 50 por ciento de los pétalos tratados con estructuras reproductivas del hongo. Cuando esto ocurrió se llevó a cabo el lavado de los pétalos de rosal. Para ello se depositaron los pétalos de cada repetición en tubos de ensaye con agua destilada estéril más Tween 20 (5 gotas por litro), se agitaron por 1 min en un agitador Vortex, los pétalos se desecharon y la suspensión se colocó en una centrífuga a 3000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se le agregaron 10 ml, de agua destilada estéril, para formar de nuevo una suspensión, misma que se homogenizo en el agitador Vortex por 1 min De la suspensión ya homogenizada se tomó una muestra con una pipeta Pasteur y se depositó en una cámara New Bauwer en donde se realizó la cuenta de las conidias por cada repetición de cada tratamiento.

RESULTADOS

Aislamiento e Identificación de *B. cinerea*

Los resultados obtenidos de los cuatro fungicidas evaluados, fueron realizados a nivel laboratorio *in vitro*. Se realizaron 15 aislamientos de *B. cinerea*; 12 aislamientos fueron colectados de dos invernaderos de la zona de producción de rosa para exportación, cercana a Saltillo, Coah, y tres cepas fueron colectadas de material originario del estado de México, mismos que se encuentran especificados en el Cuadro 4.1.

Bioensayos con benomilo.

Para estos fungicidas se evaluaron 15 aislamientos seis del Rancho Guadalupe, seis del Rancho Capulín y tres del estado de México. En el Cuadro 4.2 se puede apreciar que la concentración inhibidora 50 varía desde 20 hasta 259 $\mu\text{g/ml}$, existiendo diferencia entre aislamientos colectados de un mismo sitio. Dado lo anterior se considera que todos los aislamientos son altamente resistentes según lo mencionado por Chiba y Northover (1988) que consideran a un aislamiento susceptible al que

presenta desarrollo hasta 1 $\mu\text{g/ml}$, por su parte Yigal (1988) considera un aislamiento resistente a benomilo a aquel que presenta desarrollo por arriba de 5 $\mu\text{g/ml}$.

Cuadro 4.1. Cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de rosal utilizadas para estudiar el valor adaptativo

Cepa	Localidad	Procedencia
RG1*	Rancho Guadalupe carr. Mex-Matehuala	Invernadero
RG2	Rancho Guadalupe carr. Mex-Matehuala	Invernadero
RG3*	Rancho Guadalupe carr. Mex-Matehuala	Invernadero
RG7*	Rancho Guadalupe carr. Mex-Matehuala	Invernadero
RG8	Rancho Guadalupe carr. Mex-Matehuala	Invernadero
RG10	Rancho Guadalupe carr. Mex-Matehuala	Invernadero
RC1*	Rancho el Capulin Cañón de la Carbonera	Invernadero
RC2*	Rancho el Capulin Cañón de la Carbonera	Invernadero
RC5	Rancho el Capulin Cañón de la Carbonera	Invernadero
RC6	Rancho el Capulin Cañón de la Carbonera	Invernadero
RC7	Rancho el Capulin Cañón de la Carbonera	Invernadero
RC8*	Rancho el Capulin Cañón de la Carbonera	Invernadero
EM1	Rosales procedentes de viveros de Edo. Mex.	Campo
EM2	Rosales procedentes de viveros de Edo. Mex.	Campo
EM3	Rosales procedentes de viveros de Edo. Mex.	Campo

* con estos aislamientos se tuvieron problemas para el incremento de la cepa, por lo que fueron eliminados.

Bioensayos con tiabendazol

Para el caso de este producto, el cual también es un fungicida que pertenece al grupo de los benzimidazoles, se evaluaron únicamente nueve aislamientos, ya que algunos de los aislamientos formaron esclerosios que son estructuras que forma el

hongo bajo condiciones adversas, además esta reducción de aislamientos se realizó con la finalidad de evaluar el mismo número de aislamientos de cada localidad, teniendo así lo siguiente; tres aislamientos del Rancho Guadalupe (RG2, RG8, RG10), tres aislamientos del Rancho Capulín (RC5, RC6, RC7), tres aislamientos del Estado de México (EM1, EM2, EM3). Con estos nueve aislamientos se trabajó hasta el final de la investigación.

Cuadro 4.2 Concentración inhibitriz 50 y sus límites fiduciales de aislamientos de *Botrytis cinerea* al benomilo.

AISLAMIENTO	CONCENTRACION INHIBITRIZ 50	LIMITE FIDUCIAL INFERIOR	LIMITE FIDUCIAL SUPERIOR
RG1	99	52	189
RG2	81	43	150
RG3	76	41	137
RG7	173	126	232
RG8	203	148	281
RG10	134	95	189
RC1	20	7	51
RC2	32	17	59
RC5	63	20	115
RC6	259	186	359
RC7	153	108	219
RC8	234	171	325
EM1	115	70	274
EM2	101	61	214
EM3	53	36	102

En el Cuadro 4.3 se muestran los resultados del bioensayo para tiabendazol, observándose que la tendencia en cuanto a la susceptibilidad de los aislamientos fue variable, independientemente del origen de los mismos. Se considera que todos los aislamientos son resistentes al tiabendazol dado que la concentración inhibidora 50 varío desde los valores de 37 a 200 $\mu\text{g/ml}$, observándose diferencias entre los aislamientos obtenidos de un mismo origen, como se demuestra en los aislamientos del rancho Guadalupe en el que se aprecia cepas con mucha resistencia y cepas con la resistencia más baja.

Cuadro 4.3 Concentración inhibidora 50 y límites fiduciales de aislamientos *Botrytis cinerea* al tiabendazol.

AISLAMIENTO	CONCENTRACION INHIBITRIZ 50	LIMITE FIDUCIAL INFERIOR	LIMITE FIDUCIAL SUPERIOR
RG2	37	13	138
RG8	115	69	150
RG10	170	100	240
RC5	118	73	184
RC6	39	31	49
RC7	200	127	300
EM1	73	28	232
EM2	83	43	196
EM3	27	9	75

Bioensayos con vinclozolin.

Como ya se mencionó este es un fungicida de contacto que pertenece al grupo de las dicarboxamidas observándose que dos aislamientos resultaron moderadamente

resistentes, y todos los demás aislamientos son susceptibles, es importante mencionar que para el caso del aislamiento RC5 no presentó crecimiento en este producto. Otra observación importante es que tampoco existió relación en cuanto a el origen de los aislamientos y la susceptibilidad de los mismos a este fungicida (Cuadro 4.4). Lo anterior si consideramos lo descrito por Wang y Coley-Smith (1986), el cual menciona que un aislamiento moderadamente resistente a los productos con dicarboxamidas es aquel que presenta crecimiento de 1.0 a 2.4 $\mu\text{g/ml}$.

Cuadro 4.4. Concentración inhibitriz 50 y limites fiduciales de aislamientos de *Botrytis cinerea* al vinclonzoлин

AISLAMIENTO	CONCENTRACION INHIBITRIZ 50	LIMITE FIDUCIAL INFERIOR	LIMITE FIDUCIAL SUPERIOR
RG2	0.73	0.66	0.81
RG8	0.15	0.0	0.3
RG10	0.7	0.61	0.78
RC5	0.0	0.0	0.0
RC6	2.47	1.95	3.68
RC7	2.2	1.76	3.21
EM1	0.27	0.0	0.45
EM2	0.18	0.0	0.3
EM3	0.08	0.0	0.2

Biensayos con iprodione.

Este compuesto como el anterior producto es un fungicida de contacto. Los resultados (Cuadro 4.5), muestran que se obtuvo un aislamiento sin crecimiento

(RC5); tres aislamientos con una CI_{50} menor de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, tres aislamientos con una CI_{50} menor de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ y dos aislamientos con un crecimiento mayor a 1.0 $\mu\text{g/ml}$. Dado lo anterior podemos considerar a 7 aislamientos susceptibles y dos aislamientos podemos considerarlos moderadamente resistentes, de acuerdo a los estudios realizados por Wang y Smith (1986).

Sin embargo, si se considera a lo mencionado por Yigal (1988), quien menciona que todos los aislamientos que presentan crecimiento en 5 $\mu\text{g/ml}$ de iprodione son resistentes, considerando lo anterior todos los aislamientos son susceptibles.

Cuadro 4.5 Concentración inhibitriz 50 y limites fiduciales de aislamientos de *Botrytis cinerea* al iprodione.

AISLAMIENTO	CONCENTRACION INHIBITRIZ 50	LIMITE FIDUCIAL INFERIOR	LIMITE FIDUCIAL SUPERIOR
RG2	0.83	0.72	0.96
RG8	1.28	1.12	1.51
RG10	0.87	0.76	1.0
RC5	0.0	0.0	0.0
RC6	1.07	0.85	1.15
RC7	0.73	0.52	0.92
EM1	0.12	0.0	0.3
EM2	0.25	0.0	0.35
EM3	0.13	0.0	0.26

Pruebas de Adaptabilidad *B. Cinerea*

Germinación de Conidios de los Diferentes Aislamientos.

La germinación de las esporas fue variable, dependiendo de los aislamientos, así el porcentaje de germinación varió de 21 (RG8) a 87 (EM3) (Cuadro 4.6). El análisis de varianza (Cuadro A.2) detectó diferencias significativas en la capacidad germinativa de los diferentes aislamientos y la prueba de Tukey, señala que la cepa 3 del estado de México (EM3) presentó una germinación estadísticamente superior al resto de los aislamientos, mientras que la cepa con menor germinación fue la 8 del Rancho Guadalupe (RG8). Asimismo, se pudo observar que cepas de una misma localidad pueden presentar alta o baja capacidad de germinación y es que esta capacidad es intrínseca de la cepa y no condicionada por el medio ambiente.

Cuadro 4.6- Germinación (expresada en por ciento) de los diferentes aislamientos de *Botrytis cinerea*

Aislamiento	Media
EM3	87 A
RC7	80 B
RC5	66 C
RG2	66 C
EM2	56 D
EM1	49 E
RG10	38 F
RC6	28 G
RG8	21 H

*Aislamientos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 5% de significancia)

Incidencia de *B. cinerea* en pétalos de rosal

La toma de datos de este estudio se dejó de realizar cuando alguno de los aislamientos presentó en el total de los pétalos inoculados síntomas de la enfermedad; ocurriendo esto a las 96 h. En el Cuadro 4.7 se observa que las cepas EM3 y el RC7 los que alcanzaron el 100 por ciento de incidencia y las cepas EM1 y RG10 lo que presentaron la menor incidencia siendo esta del 85 y 86 por ciento. Por otra parte el análisis de varianza (Cuadro A.4) nos da como resultado una diferencia significativa entre los aislamientos y al realizar a la prueba de Tukey indica que existen aislamientos de la misma localidad con incidencias estadísticamente diferentes; tal es caso de las cepas del estado de México la EM3 con un 100 de incidencia y la EM1 con el 85 por ciento

Cuadro 4.7- Incidencia expresada en por ciento de los diferentes aislamientos de *Botrytis cinerea*

Aislamiento	Incidencia %
EM3	100 A
RC7	100 A
RC5	95 BA
RG2	95 BA
RG8	90 CB
RC6	90 CB
EM2	90 CB
RG10	86 C
EM1	85 C

*Aislamientos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 5% de significancia)

Severidad de *B. cinerea* en pétalos de rosal

La severidad se evaluó cuando los tratamientos alcanzaron el 100 por ciento de incidencia que fue a las 96 h; sin embargo, la severidad en cuanto a daño, difiere de lo observado en la incidencia. Lo anterior indica, que a pesar de que los aislamientos de *B. cinerea* tiene capacidad de infección, varía en agresividad en el hospedero. El análisis de varianza (Cuadro A.6) muestra que existe diferencia significativa entre los tratamientos, y la prueba de Tukey indica que la cepa EM3 presentó una severidad estadísticamente superior al resto de los aislamientos. Las cepas RC6 y RG8 fueron las que presentaron estadísticamente la menor severidad de todos los aislamientos, así mismo se observa en el Cuadro 4.8 que existen diferencias entre aislamientos de un mismo origen como los del rancho Capulín en donde el RC7 presenta una severidad estadísticamente superior que el RC6.

Cuadro 4.8- Severidad expresada en número de lesiones de los diferentes aislamientos de *B. cinerea*

Aislamiento	Promedio del número de lesiones
EM3	86 A
RC7	68 B
EM1	63 CB
RC5	63 CB
Edo2	62 CB
RG10	56 C
RG2	56 C
RC6	41 D
RG8	36 D

*Aislamientos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 5% de significancia)

Producción de conidios

La producción de conidios van desde los 2102500 (aislamiento EM3) a 182000 conidios por cm^2 (aislamiento RG8) (Cuadro 4.9). El análisis de varianza para la producción de conidios (Cuadro A.7) muestra diferencias altamente significativas entre los aislamientos. La prueba de Tukey, separa a cada uno de los aislamientos como unidades completamente independiente siendo el aislamiento EM3 el que presento la mayor producción de conidios y el RG8, el que presento la menor producción. Nuestros resultados concuerda con lo mencionado por Gullino *et al.* (1982) Lorenz y Pommer, (1982), quienes señalan que la producción de conidios es muy heterogénea en *B. cinerea*.

Cuadro 4.9- Producción de conidios esporas por centímetro cuadrado de los diferentes aislamientos de *B. cinerea*

Aislamiento	Conidios/ cm^2 de pétalo infectado
EM3	2102500 A
RC7	1994500 B
EM1	1750800 C
EM2	1236000 D
RC5	863500 E
RG2	678500 F
RG10	305400 G
RC6	273000 H
RG8	182000 I

*Aislamientos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 5% de significancia)

DISCUSION

La resistencia de los 2 grupos de fungicidas más utilizados en la industria ornamental (benzimidazoles y dicarboxamidas) es común en los invernaderos de producción de plantas ornamentales según lo demuestran trabajos realizados en diferentes partes del mundo (Yourman y Jeffers 1999; Katan, 1982; LaMondia y Douglas 1997, Morman y Leasel 1992; Panayotakou y Malathakis 1983; Stehmann y De Waard 1996) lo que coincide con el presente estudio donde el 100 por ciento de los aislamientos fueron resistentes a benzimidazoles.

Para el caso de las dicarboxamidas solo el 22 por ciento de los aislamientos resulto resistente y esto se puede explicar en los estudios realizados por Wang *et al.* (1986) al no encontrar una correlación entre aislamientos resistentes a benzimidazoles y dicarboxamidas. Por otra parte investigaciones genéticas no demostraron que existiera resistencia cruzada entre estos dos grupos de fungicidas (Faretra y Pollastro, 1991 y 1996) lo cual sugiere independencia y probable separación, basado en una distancia de entre los genes que confieren resistencia a benzimidazoles y los que la confieren a dicarboxamidas. Por su parte Morris (1986) mencionan que los mecanismos confieren resistencia a benzimidazoles es debido a la sustitución de aminoácidos específicos, que inhiben el ensamble de los microtubulos, y que los mecanismos de resistencia para dicarboxamidas no son del todo conocidos.

Cuadro 5.1 - Síntesis de los diferentes parámetros evaluados para las cepas de *B. cinerea*

Cepa	benomilo	tiabendazol	vinclozolin	iprodione	Germinación	Producción conidios	Severidad	Incidencia
RG2	MR	BR	S	S	66 C	678.5 F	56 C	95 BA
RG8	AR	AR	S	MR	21 H	182 I	36 D	90 CB
RG10	AR	AR	S	S	38 F	305.4 G	56 C	86 C
RC5	MR	AR	S	S	66 C	863.5 E	63 CB	95 BA
RC6	AR	BR	MR	MR	28 G	273 H	41 D	90 CB
RC7	AR	AR	MR	S	80 B	1994.5 B	68 B	100 A
EM1	AR	MR	S	S	49 E	1750.8 C	63 CB	85 C
EM2	AR	MR	S	S	56 D	1236 D	62 CB	90 CB
EM3	MR	BR	S	S	87 A	2102.5 A	86 A	100 A

Donde: AR= Alta Resistencia; MR= Moderada Resistencia; BR= Baja Resistencia; S= Susceptible Aislamientos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 5% de significancia)

Con respecto a la adaptabilidad de los aislamientos en el Cuadro 5.1 se puede apreciar que no existe una relación directa entre resistencia y adaptabilidad la que fue medida con los estudios de germinación de conidios, incidencia, severidad y producción de conidios. Los resultados obtenidos indican que existen cepas que presentaron alta resistencia a benzimidazoles y moderada resistencia a dicarboxamidas (RC7) sin que esto afectara la capacidad de la misma de causar enfermedad, lo cual es similar a lo realizado en diferentes estudios realizados; en ellos se noto que los aislamientos moderadamente resistentes a dicarboxamidas son tan virulentos como los aislamientos susceptibles (Gullino *et al.*, 1982; Gullino y Garibaldi 1981; Hunter *et al* 1979; Leroux *et al.*, 1977; Lorenz y Pomer 1985; Maraiete *et al.*, 1981). Sin embargo, en nuestro estudio también se presento el caso de cepas (RC5 y RG10) que presentaron resistencia a benzimidazoles y efectos en su adaptabilidad presentando bajos porcentajes de germinación, disminución en la producción de conidios y moderada incidencia y severidad. Estos resultados son un tanto similares al obtenido con patosistemas de durazno - *Monilia laxa* y benomilo, al determinar que los aislamientos resistentes reducían la elongación del tubo germinativo y el desarrollo del esporodoquio, sin afectar su virulencia.

Por otro en el mismo Cuadro podemos observar, tal es el caso de la cepa RC6 la cual presenta alta resistencia al benomilo, baja resistencia al tiabendazol y moderada resistencia a las dicarboxamidas, en este caso se observa que la adaptabilidad del aislamiento es baja debido a que presenta baja germinación, casi no produce conidios y

a pesar de que se identifica presente en los tejidos de los pétalos de rosal la lesión que ocasiona no es significativa.

De acuerdo a lo señalado anteriormente, los resultados del presente estudio concuerdan con lo mencionado con Jean (1988) al señalar de diferentes estudios de resistencia de *B. cinerea* pueden ser contradictorios, así como con los aislamientos que se estudiaron donde algunas cepas se puede considerar que existe una relación inversa entre los genes que transmiten resistencia a fungicidas y los que generan o proveen la adaptabilidad del hongo pero en otras cepas se observó que se perdieron niveles de adaptabilidad aún y cuando las cepas manifestaron altos niveles de resistencia.

Lo anterior parece indicar que los genes que confieren resistencia se encuentran en genes diferentes o a cierta distancia de los que confieren la adaptabilidad de *B. cinerea* en su patosistema con rosal y que es debido al azar el que una cepa de una población dada de *B. cinerea* se manifieste en uno u otro sentido.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrollo el presente estudio podemos concluir:

- Todas las cepas presentaron resistencia al benomilo
- Todas las cepas presentaron resitencia al tiabendazol
- Dos cepas presentaron resistencia moderada al vinclonzolin
- Dos cepas presentaron moderada resistencia al iprodione,
- La germinación de conidios vario desde el 28 al 87 por ciento
- La producción de conidios presentó diferencias altamente significativas con producciones de 182 mil hasta 2102500 conidios por cm²
- La incidencia fue variable desde 85 hasta 100 por ciento
- La severidad de cada una de las cepas vario de 41 al 86 por ciento
- Los estudios para determinar incidencia y severidad demostraron que no existe una relación entre la capacidad del aislamiento o cepa de infectar un tejido y la virulencia del mismo.

LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C. S. 1979. Introducción a la micología. Buenos Aires, Argentina. 3ª ed. Eupebea. 615 p.
- Beringer, H y Northdurft, F. 1985. Effects of potassium on plant and celular structures. Pages 351-364: in Potassium in Agriculture, De. American Society of Agronomy
- Clemons, G.P., and Sisler H D. 1971. Localization of the site of action of a fungicide benomyl derivate. Pestic. Biochem. Physiol. 1:32-42.
- Cronquist A, C. 1986. Introducción a la botánica. México. Ceosa. 800 p.
- Chiba, M., and Northover, J. 1988. Efficacy of new benzimidazole fungicides again sensitive and benomyl resistant *Botrytis cinerea*. Phytopatology 78:613-618
- Davidse, L.C. 1973. Antimitotic activity of methyl-benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. Pestic. Biochem. Physiol. 3:317-325.
- Davidse, L.C. 1976. Metabolic conversion of methyl benzimidazol-2yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidalus*. Pestic. Biochem. Physiol. 6:538-546.
- Davidse, L. C. 1986. Benzimidazole fungicide: Mechanism of action and biological impact. Ann. Rev. Phytopathol. 24:43-65.
- Dekker, J. 1976. Acquired resistance to fungicides. Ann. Rev. Phytopathol. 45:405-428
- Delp, C.J. 1987 Benzimidazole and related fungicide in mode selective fungicide pp 233-244
- Faretra, F. And Pollastro, S. 1991. Genetic basis resistance to benzimidazole and dicarboxamide fungicide in *Botryotinia fuckleliana* (*Botrytis cinerea*) Mycol. Res. 95:943-951.
- Faretra, F. And Pollastro, S. 1996. Genetic studies of phytopathogenic fungus *Botryotinia fuckleliana* (*Botrytis cinerea*) by analysis of ordered tetrads. Mycol. Res 100:670-674

- Fritz, R., Leroux, P., Gredt, M. 1977. Mecanisme de l'ation fungitoxique de procimidione de la vonclonzoline et du dicloran sur *Botrytis cinerea* P. Phytopathol. Z. 90: 152-163.
- Georgopoulos, S.G., Sarris, M., and Ziogas, B.N. 1979. Mitotic instability *Aspergillus nidulans* caused by the fungicides iprodione, procymidne et vinclonzolin. Pesticide Sci. 10:389-392.
- Gigal, Elad *et al.* 1988. Negative cross resistance between benzimidazole and phenylcarbamate fungicides and control of *Botrytis cinerea* on grapes.
- Gilman, J. 1963. Manual de hongos del suelo. Editorial Continental S.A. Méx 384p.
- Gullino, M. L. and Garibaldi, A. 1981 Management of grape gray mould consider fungicide resistance. Phytopathology Mediterr. 20:117-122
- Gullino, M. L.; Romano M. L. and Garibaldi A. 1982 Characterization dicarboxamide-resistance strain of *Botrytis cinerea* naturally occurring in Ita Med. Fac. Land bouww. Rijksuniv . Gent 47:781-791.
- Hammerschalag, R. S., and Sisler, HD. 1973. Benomyl and methil-2 benzimidaz carbamate (MBC): Biochemical, cytological and chemical aspect of toxicity *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Pestic. Biochem. Phys 3:42-54.
- Hildebrand, E. M., and Heinicke, A. J. 1937. Incidence of fire blight in young ap trees in relation to orchad practice. Cornell Agric. Exp. Stn. Mem. 203.
- Hisada, Y., Kato, T., and Kawase, Y. 1977. Sistemic movement in cucumber pla and control of cucumber gray mould by a new fungicide, S-7131. Neth Pathol. 83: 71-78.
- Holz, B. 1979. Uber eine resistenzerscheinung von *Botrytis cinerea* an Reben geg die neuen Kontaktbotryzim Gebiet der Mittelmosel. WeibergKeller 26:18-25
- Hunter, T. Jordan, V. W.L. and Pappas, A.C. 1979. Control of strawberry fruit r caused by *Botrytis cinerea* and *phytophthora cactorum*. Proc. 1979 Br. Pr Conf. 1:177-183.
- Jean, M. G. 1988. Fungicide resistance in North America. The Americ Phytopahological Society USA. Second printing.53-55.

- Jones, A. L., and Ehet, G.R. 1976. Isolation and characterization of benomyl-tolerant strains of *Monilia fructicola*. Plant dis. Rep. 60:776-780
- Juscafresa, B. 1979. Cultivo del rosal. 3ª Edición. Editorial Aedos. Barcelona, España. 150p.
- Kappas, A. and Georgopoulos, S.G. 1970. Genetic analysis of dodine resistance in *Nectria haematococca* (syn *Hypomyces solani*). Genetic 66:617-622
- Katan, T. 1982. Resistance to 3,5-dichloro-phenyl-N-cycloheximide (dicarboxamide) fungicides in the gray mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. Plant Pathol. 31:133-141
- Kato, T. 1983. Mode of antifungal action of a new fungicide, tolclofosmethyl. Pp. 153-157]In Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment, Vol. III J. Miyamoto and P.C. Keamey ed. Pergamon Press New York.
- Lacroix, L., Bic. C., Burgaud, L., Guillot, M., Leblac, R., Rottot, R., and Sauli, M. 1974. Etude des propriétés antifongiques d' une nouvelle famille de dérivés de l' hydantoïne et en particulier du 26019 R.P. Phytologie. Phytopharm 23:165-174.
- Larson, A.R. 1987. Introducción a la floricultura A. G. T. Editor S.A. 1ª Edición en español México D.F.
- LaMondia, J. A. and Douglas S.M. 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazoles and dicarboxamide fungicide. Plant Dis. 81:729-732.
- Leroux, P. Fritz, R. And Gedt, M. 1977. Etudes en laboratoire de souches de *Botrytis cinerea* résistantes a la Diclozoline, au Dicloran au Quitozone a la Viclonzoline et au 26019 RP (Glycophene). Phytopathol. Z. 89:347-358.
- Litrell, R.H 1974. Tolerance in *Cercospora arachidicola* to benomyl and related fungicides, Phytopathology 64-1377-1378.
- López, M.J. 1980. Cultivo de rosal en invernadero. Mundi prensa, Madrid 341 pp.
- Lorenz, G. and Pommer, E. H 1982. Studies on pectolytic and cellulolytic enzymes of dicarboxamide-sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. EPPO Bull 12:145-149
- Maraite, H Meunier, S., Poutoris, A., and Meyer, J.A. 1981. Emergence in vitro and fitness of strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboxamide fungicide. Parasitica 36:90-101.

- Mendoza, Z.C. 1993. Enfermedades del rosal en México. Universidad Autónoma Chapingo 59pp.
- Morman, G.W. and Lease, R. J. 1992. Benzimidazole and dicarboxamide -resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. Plant Dis. 76:477-480.
- Morris, N. R. 1986. The molecular genetic of microtubule proteins in fungi. Mycol. 19:77-82.
- Moe, R. 1972. Effect of daylength light intensity and temperature on growth and flowering in Rose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97(6) : 796-800.
- Nell, T. A. 1979. Blindness in rose effects of high intensity light and blind spot prediction techniques. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104(1):21-25
- Northover, J., and Matteoni, J.A. 1984. Iprodione-resistant *Botrytis cinerea* from Ontario Canada vineyard and greenhouses. (abstr.) Phytopathology 74:81
- Ozanne, P.G. 1980. Phosphate nutrition of plants-A general treatise, page 559-584. Role of phosphorus in agriculture. American Society of Agronomy, Crop Nutrition Series 10.
- Pommer, E. H and Mangold, E. 1975. Vinclonazolol (BAS 352 F), ein neuer Wirkstoff zur Bekämpfung von *Botrytis cinerea*. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Wageningen 40:713-722.
- Stehmann, C. and De Ward M.A. 1996. Sensitivity of population of *Botrytis cinerea* to triazoles, benomyl and vinclonazolol. Eur. J. Plant. Pathol. 102:171-180.
- Trejo M.J.A. 1988. Apuntes del curso sobre nutrición y manejo del cultivo de rosas en invernadero, grupo visaflo. Villa Guerrero, Edo. de México.
- Wang Z. and J. R. Coely Smith 1986. Studies on some characteristic dicarboxamides - resistant isolates of *Botrytis cinerea* from protected lettuce. Plant Pathology 35:544-550
- Wang Z. Coley-Smith J.L. and Wareing P. 1986. Dicarboxamide resistance in *Botrytis cinerea* protected lettuce. Plant Pathol. 35:427-433.
- Yigal E. 1988. Negative cross resistance between benzimidazole and phenylcarbamate fungicide and control of *Botrytis cinerea* on grapes. F. Pathology 37: 141-147.

- Yigal E. 1988. Involvement of ethylene in the disease cause of *Botrytis cinerea* rose and carnation flowers and possibility for control. Ann. Appl. B 113:589-598.
- Yourman, L.F. and Jeffers S.N. 1999. Resitence to benzimidazole and dicarbxin fungicides in greenhouse isolate of *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 83:569-575.

EM3	100	100	100
-----	-----	-----	-----

Cuadro A.4. Análisis de varianza para incidencia de *Botrytis cinerea* en pétalos de rosal

	° de libertad	Σ cuadrados	Cuadrado $\frac{1}{2}$	F calculada	F
Variable	8	726	90.75	28.16	**
Error	18	58	3.22		
Total	26	784			

Cuadro A.5 Severidad de *Botrytis cinerea* en pétalos de rosal.

VARIABLE	REP1	REP2	REP3
RG2	52	54	62
RG8	35	37	36
RC10	54	56	58
RC5	61	61	67
RC6	41	41	41
RC7	67	69	68
EM1	61	67	61
EM2	62	61	63
EM3	87	85	86

Cuadro A.6 Análisis de varianza de severidad de *Botrytis cinerea* en pétalos de rosal

	° de libertad	Σ cuadrados	Cuadrado $\frac{1}{2}$	F calculada	F
Variable	8	5166	645.75	98.86	**
Error	18	120	6.66		
Total	26	5286			

Cuadro A.7. Producción de conidios de *Botrytis cinerea* por cm² de pétalos de rosal

VARIABLE	R1	R2	R3
RG2	677300	678000	680200
RG8	181000	182300	182700
RG10	305000	304800	306400
RC5	882500	863000	865000
RC6	272900	273000	273100
RC7	1990000	1997000	1996500
EM1	1750300	1750000	1752100
EM2	1235000	1236500	1236500
EM3	2100000	2103500	2104000

Cuadro A.8. Análisis de varianza para producción de conidios de *Botrytis cinerea* por cm² en pétalos de rosal

	G. de libertad	Σ de cuadrados	Cuadrado ½	F. calculada	F
Variable	8	1.38284 E+12	1.72855 E+12	99999.99	***
Error	18	5.52800 E+07	3.07111 E+06		
Total	26	1.38285 E13			