



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Centro Universitario UAEM Tenancingo

EFFECTIVIDAD *in vitro* DE TIABENDAZOL SOBRE *Botrytis cinerea* PERS. FR.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO EN FLORICULTURA**

P R E S E N T A

NICOLASA LÓPEZ AGUILAR

DIRECTORES DE TESIS

Dr. en C. Rómulo García Velasco

M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi

ASESOR

Dr. en C. Sotero Aguilar Medel

Tenancingo, Estado de México.

Marzo de 2019



Universidad Autónoma del Estado de México

Centro Universitario Tenancingo

Tenancingo, Estado de México, a 26 de febrero de 2019

LIA. ROSALBA ANDRADE ALCANTARA
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL
DEL CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

Sirva la presente para enviarle un saludo y al mismo tiempo informar que el trabajo de tesis titulado "Efectividad *in vitro* de Tiabendazol sobre *Botrytis cinérea* pers. FR." de la alumna **Nicolasa López Aguilar**, con número de cuenta **0825395** **ha cumplido con las observaciones realizadas a su trabajo**, por lo cual, puede proseguir con sus trámites de graduación.

Sin más por el momento queda de Usted:

ATENTAMENTE

DRA. MARTHA ELENA MORA HERRERA
PROFESORA DE TIEMPO COMPLETO
CENTRO UNIVERSITARIO TENANCINGO

Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Centro Universitario Tenancingo



Tenancingo, México a 4 de marzo del 2019

LIA. ROSALBA ANDRADE ALCANTARA

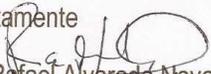
Encargada del departamento de evaluación profesional, CUT.

Presente.

Por medio de este conducto le informo que la alumna Nicolasa López Aguilar con número de cuenta 0825395 pasante de la carrera de ingeniero agrónomo en floricultura en el Centro Universitario UAEM, Tenancingo ha cumplido con las observaciones hechas en torno al trabajo de tesis titulado como: EFECTIVIDAD *In vitro* DE TIABENDAZOL SOBRE *Botrytis cinérea* PERS. FR. Por lo cual puede se puede continuar con los trámites correspondientes para su presentación.

Sin más por el momento quedo a sus órdenes para cualquier aclaración.

Atentamente


MC Rafael Alvarado Navarro

Profesor de asignatura.



Universidad Autónoma del Estado de México

Centro Universitario Tenancingo

Tenancingo, Estado de México; 4 de marzo del 2019

L. I. A. ROSALBA ANDRADE ALCANTARA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO
P R E S E N T E

Distinguida LIA. Andrade Alcántara, por este conducto informamos a usted que la pasante de Ingeniero Agrónomo en Floricultura, Nicolasa López Aguilar con número de cuenta 0825395, ha cumplido con las correcciones y observaciones sugeridas por los revisores de su trabajo de tesis titulado: **"Efectividad *in vitro* de Tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* PERS. FR.** Bajo la dirección del Dr. en C. Rómulo García Velasco y M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi y como Asesor el Dr. en C. Sotero Aguilar Medel. Por lo que solicitamos a usted continuar con los trámites correspondientes para la asignación de fecha de examen.

Sin otro particular, aprovechamos la ocasión para manifestarle nuestra más alta consideración y estima.

A T E N T A M E N T E
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2019, Año del 75 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"



Centro Universitario
UAEM Tenancingo


Director de Tesis
M. en C. Grisel
Domínguez Arizmendi


Asesor de Tesis
DR. en C. Sotero
Aguilar Medel


Director de Tesis
Dr. en C. Rómulo
García Velasco

C.c. p. Expediente

Carretera Tenancingo – Villa Guerrero Km.
1.5, Tenancingo, Estado de México C.P.
52400, Tels. 01 714 14 077 24 y 01 714 14 077
25, <http://cutenancingo.uaemex.mx/>





Universidad Autónoma del Estado de México

Centro Universitario UAEM Tenancingo

Ref: DEP040319/29

4 de marzo de 2019

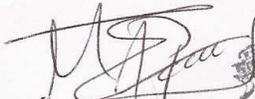
C. NICOLOSA LÓPEZ AGUILAR
PASANTE DE INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA
P R E S E N T E

Anticipándole un cordial saludo, le comunico que con base al Reglamento de Facultades y Escuelas Profesionales de la UAEM en su Capítulo VIII artículo 120, 121 y 122; y del Reglamento de Opciones de Evaluación Profesional de la UAEM en el Capítulo I artículo 6º, puede proceder a realizar la elaboración en formato electrónico del trabajo de Tesis: "Efectividad *in vitro* de Tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* PERS. FR."

Con ello, dar continuidad a los trámites necesarios para sustentar la Evaluación Profesional y obtener el título de INGENIERÍA AGRÓNOMO EN FLORICULTURA.

Sin más por el momento, quedo a sus órdenes para cualquier comentario o aclaración.

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2019, Año del 75 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"


Dra. en C. **MARÍA EUGENIA VALDEZ PÉREZ**
SUBDIRECTORA ACADÉMICA
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO



c.c.p. RAA/Archivo.

Departamento de Evaluación Profesional





CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

La que suscribe **Nicolasa López Aguilar**, autora del trabajo escrito de evaluación profesional en modalidad de Tesis "**Efectividad *in vitro* de Tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* PERS.FR**". Por medio de la presente con fundamento en lo dispuesto en los artículos 5, 18, 24, 25, 27, 30, 32 y 148 de la Ley Federal de Derechos de Autor, así como los artículos 35 y 36 fracción II de la Ley de la Universidad Autónoma del Estado de México; manifiesto mi autoría y originalidad de la obra mencionada que se presentó en Centro Universitario UAEM Tenancingo para ser evaluada con el fin de obtener el Título Profesional de Licenciado de Ingeniero Agrónomo en Floricultura.

Así mismo expreso mi conformidad de ceder los derechos de reproducción, difusión y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Universidad Autónoma del Estado de México; se podrá realizar a nivel nacional e internacional, de manera parcial o total a través de cualquier medio de información que sea susceptible para ello, en una o varias ocasiones, así como en cualquier soporte documental, todo ello siempre y cuando sus fines sean académicos, humanísticos, tecnológicos, históricos, artísticos, sociales, científicos u otra manifestación de la cultura.

Entendiendo que dicha cesión no genera obligación alguna para la Universidad Autónoma del Estado de México y que podrá o no ejercer los derechos cedidos.

Por lo que el autor da su consentimiento para la publicación de su trabajo escrito de evaluación profesional.

- a) Texto completo
- b) Por capítulos
- c) Solamente portada y tabla de contenido

Se firma presente en la ciudad de Tenancingo Estado de México, a los siete días de febrero de 2018.


López Aguilar Nicolasa
Nombre y firma de conformidad

DEDICATORIA

En primer lugar quiero agradecer a DIOS por darme vida, el conocimiento el entendimiento y la sabiduría para lograr lo que hasta ahora.

A mi papá Andrés López Limón por darme la vida, infinitas gracias. A mi mamá Susana Aguilar Vilchis por sus sabios consejos y siempre estar al pendiente de mí.

A mis hermanas: Yadi, Gabi, Bris, Estelita y a mi hermano Alexis. Gracias por estar conmigo, por ayudarme y apoyarme en los momentos más difíciles, por ser el equipo que hemos formado.

A mi hijo Andrés Sinuhe, que ha sido el motor que me ha guiado a culminar esta etapa de mi vida. Te amo hijo.

Quiero agradecer a todas mis amistades que siempre estuvieron al pendiente de mí y me motivaron e impulsaron sin los cuales no hubiera sido posible este proyecto.

Finalmente quiero agradecer a mi abuelita Amalia, que desde el cielo me cuida y me guía. Gracias, abue por sus conocimientos y enseñanzas, la extraño.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México, por el financiamiento del proyecto y por contribuir esta etapa de mi vida.

Al Centro Universitario UAEM Tenancingo y a sus catedráticos que me compartieron sus conocimientos durante el trayecto de mi carrera.

A la M. en C. Grisel por su ayuda y su motivación, por su participación en este proyecto, gracias por tus infinitos consejos, agradezco su paciencia y sus conocimientos proporcionados, Dios te colme de bendiciones, Gris.

Al Dr. Rómulo, agradezco su paciencia y sabiduría en ayudarme a concluir este proyecto y no haberme dejado desistir, infinitas gracias, Dios lo colme de bendiciones.

A Dr. Sotero, infinitas gracias por sus conocimientos compartidos y su apoyo en este proyecto.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE ANEXOS	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. REVISIÓN DE LITERATURA	11
2.1. Clasificación taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i>	11
2.2. Características morfológicas de <i>B. cinerea</i>	11
2.3. Hospederos de <i>Botrytis cinerea</i>	13
2.4. Condiciones óptimas para el desarrollo de <i>B. cinerea</i>	13
2.5. Ciclo de infección de <i>Botrytis cinerea</i>	14
2.6. Daños provocados por <i>B. cinerea</i> en el cultivo de rosa	15
2.7. Métodos de manejo de <i>B. cinerea</i>	16
2.7.1. Prácticas culturales	16
2.7.2. Nutrición	17
2.7.3. Control biológico	18
2.7.4. Control químico	20
2.8 Resistencia de hongos a fungicidas	21
2.8.1. Origen de la resistencia	21
2.8.2. Definición de resistencia a fungicidas	23
2.8.3. Componentes biológicos y químicos de la resistencia	25
2.8.4. Mecanismos de resistencia	27
2.8.5. Grupos de fungicidas asociados con resistencia	28
2.8.6. Antecedentes de resistencia a fungicidas de <i>B. cinerea</i>	29
2.9. Uso y resistencia de los benzimidazoles	31
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVOS	37

5.1. Objetivo general	37
5.2. Objetivos específicos	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1. Localización	38
6.2. Material biológico	38
6.3. Medio de cultivo	38
6.4. Determinación de la ventana biológica.....	39
6.4.1 Preparación del medio de cultivo con fungicida.....	40
6.4.2. Siembra del patógeno	40
6.4.3. Análisis de resultados.....	40
6.5. Determinación de la DL ₅₀ y DL ₉₅	41
6.5.1. Cálculo de las dosis de tiabendazol a evaluar	41
6.5.2. Establecimiento del experimento	41
6.5.3. Diseño experimental y análisis de datos	42
7. RESULTADOS	43
7.1. Determinación de la ventana biológica.....	43
7.1.1. Cepa VBc1	44
7.1.2. Cepa TBc2.....	48
7.2. Determinación de la DL₅₀ y DL₉₅.....	51
7.2.1. DL₅₀ y DL₉₅ de la cepa VBc1	52
7.2.2. DL₅₀ y DL₉₅ de la cepa TBc2	53
8. DISCUSIÓN	61
9. CONCLUSIONES	66
10. RECOMENDACIONES	67
11. LITERATURA CITADA	68
ANEXOS	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Dosis de tiabendazol para determinar la ventana biológica de las cepas VBc1 y TBc2.....	39
Cuadro 2. Dosis de tiabendazol para las cepas de <i>B. cinerea</i> VBc1 y TBc2 para la determinación de la DL50 y L95.....	41
Cuadro 3. Comparacion de medias del porcentaje de mortalidad de la cepa VBc1 con cuatro dosis de tiabendazol, en el bioensayo para determinar la ventana biológica.....	45
Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de la cepa TBc2 con cuatro dosis de tiabendazol, en el bioensayo para determinar la ventana biológica.....	48
Cuadro 5. Comparacion de medias del porcentaje de mortalidad de la cepa VBc1 en las réplicas 1 y 2, con 0.0, 0.024, 0.075. 0.23. 0.7 y 0.958 g de i. a. L ⁻¹ de tiabendazol, cinco días después de la siembra.	55
Cuadro 6. Mortalidad corregida de la cepa VBc1 ajustada por medio de la fórmula de Abbott* (1925) y valores Probit respecto a las dosis de 0.024, 0.075. 0.23, 0.7 y 0.958 g de i. a. L ⁻¹ de tiabendazol.....	56
Cuadro 7. Procedimiento para el cálculo de la DL ₅₀ y DL ₉₅ para la cepa VBc1, en función de la ecuación: $y = 4.381 + 0.814x$	57
Cuadro 8. Comparacio de medias del porcentaje de mortalidad de TBc2 en las réplicas 1 y 2, con 0.0, 0.0089, 0.05, 0.1181, 0.2792, 0.66 y 1.56 g de i. a. L ⁻¹ de tiabendazol, siete días después de la siembra.	58
Cuadro 9. Mortalidad corregida de la cepa TBc2 ajustada por medio de la fórmula de Abbott (1925) y valores Probit respecto a las dosis 0.0089, 0.05, 0.1181, 0.2792, 0.66 y 1.56 g i.a L ⁻¹ de tiabendazol.....	59
Cuadro 10. Procedimiento para el cálculo de la DL50 y DL95 para la cepa TBc2, en función de la ecuación de la regresión: $y = 3.043 + 1.226 x$	60

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentaje de mortalidad de las cepas TBc2 y VBc1 con dosis similares, en bioensayo para determinar la ventana biológica.....**44**
- Figura 2.** Crecimiento micelial al día cinco de la cepa VBc1 de *B. cinerea* con Tiabendazol, en g de i. a. L⁻¹. (a) Testigo; (b) 0.05; (c) 0.7; (d) 1.61; (e) 1.8.....**47**
- Figura 3.** Crecimiento micelial al día siete después de la siembra de la cepa TBc2 de *B. cinerea* con tiabendazol, en g de i. a. L⁻¹. (a) Testigo; (b) 0.02; (c) 0.03; (d) 0.05; (e) 1.56.....**50**
- Figura 4.** Dispersión y recta de la regresión lineal simple de las unidades Probit en relación con el logaritmo de la dosis + 2 de *B. cinerea* cepa VBc1.....**53**
- Figura 5.** Dispersión y recta de la regresión lineal simple de las unidades Probit en relación con el logaritmo de la dosis + 3 de *B. cinerea* cepa TBc2.....**54**

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Porcentaje de mortalidad de la cepa VBc1 con cuatro dosis de tiabendazol, en el bioensayo para determinar la ventana biológica.....	77
Anexo 2. Porcentaje de mortalidad de la cepa TBc2 con cinco dosis de tiabendazol, en el bioensayo para determinar la ventana biológica.....	78
Anexo 3. Transformación dosis a logaritmo de las dosis de tiabendazol para determinar la DL ₅₀ y DL ₉₅ de VBc1.....	79
Anexo 4. Transformación dosis a logaritmo de las dosis de tiabendazol para determinar la DL ₅₀ y DL ₉₅ de TBc2.....	79
Anexo 5. Resultados de las réplicas para determinar el porcentaje de mortalidad de VBc1, con 0.0, 0.024, 0.075, 0.23, 0.7 y 0.958 g i.a. L ⁻¹ de tiabendazol.....	80
Anexo 6. Resultados de las réplicas para determinar el porcentaje de mortalidad de TBc2, con 0.0, 0.0089, 0.05, 0.1181, 0.2792, 0.66 y 1.56 g i.a. L ⁻¹ de tiabendazol.....	81
Anexo 7. Glosario utilizado en la resistencia a fungicidas (Latín, 2011).....	82

RESUMEN

El fitopatógeno *Botrytis cinerea* afecta el botón floral del cultivo de rosa bajo condiciones de campo y poscosecha. En la región florícola del Estado de México, el manejo se basa en el uso de fungicidas entre los que se encuentra el tiabendazol, al cual ha perdido sensibilidad y en algunos casos ha desarrollado resistencia. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar la DL_{50} y la DL_{95} bajo condiciones *in vitro* de tiabendazol frente a *B. cinerea*. Se utilizaron las cepas VBc1 y TBc2 provenientes de los municipios de Villa Guerrero y Tenancingo, Estado de México, respectivamente. Se realizaron bioensayos para calcular la ventana biológica; es decir, los extremos del intervalo con efecto tóxico del fungicida (0 y 100 %) y a partir de estos resultados se calcularon dosis logarítmicas. La mortalidad se transformó a unidades Probit y las dosis a logaritmo, los datos se sometieron a una regresión lineal simple y a partir de la ecuación se determinó la DL_{50} y la DL_{95} . En el caso de la cepa TBc2 la DL_{50} y la DL_{95} correspondieron a 0.0394 y 0.8673 g de i. a L^{-1} , respectivamente; mientras que para la cepa VBc1 fueron de 0.0576 y la 6.047 g de i. a L^{-1} , respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, conocido como “moho gris” o “podredumbre gris”, daña numerosos cultivos entre los que se encuentran: verduras, hortalizas, frutales y ornamentales. Los daños se presentan en cualquier etapa de desarrollo de las plantas, lo que afecta significativamente el valor comercial (Chaves y Wang, 2004; Gómez, 2001; Benito *et al.*, 2000; Jarvis, 1997).

En el cultivo de rosa los primeros síntomas se manifiestan como pequeñas manchas de color café; si las condiciones ambientales son las adecuadas estas aumentan de tamaño, de tal forma que el patógeno coloniza totalmente la flor, a partir de la cual puede avanzar hacia el cáliz, el pedúnculo y el tallo. Es común observar en la superficie de los tejidos infestados agrupaciones de conidios del hongo (Tlapal y Mendoza, 2002).

En la región florícola del Sur del Estado de México el manejo de dicho fitopatógeno se basa en el uso de fungicidas, entre los que destacan procloraz, iprodiona, metalaxil-m, clorotalonil y tiabendazol, de los cuales se ha reportado pérdida de sensibilidad (Camacho, 2009) y en el caso de tiabendazol el desarrollo de resistencia (Ponce-González *et al.*, 2002).

Derivado de lo anterior es necesario llevar a cabo investigaciones que permitan monitorear el nivel de resistencia del fitopatógeno, esto a través de la determinación de las dosis letales conocidas como DL_{50} y DL_{95} , objetivo central de la presente investigación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea*

El género *Botrytis* fue descrito por Michelli en 1729. A principios del siglo XIX Persoon agrupó a cinco especies dentro del género; posteriormente en 1973 fue redefinido por Hennebert, con las distintas denominaciones conocidas por cada especie para su forma anamorfica y teleomorfica (Coley-Smith *et al.*, 1980).

De acuerdo al ITIS [Integrated Taxonomic Information System] (2017) *B. cinerea* se encuentra ubicado dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Leotimycetes

Orden: Helotiales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: *Botrytis*

Especie: *cinerea*

Botrytis cinerea Pers.: Fr. corresponde a la fase asexual (anamorfo), mientras que *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel a la fase sexual (teleomorfo) (Gómez, 2001).

2.2. Características morfológicas de *B. cinerea*

Entre las estructuras que produce *B. cinerea* se encuentran: micelio, conidióforos, conidios y esclerocios; en el caso *B. fuckeliana*: apotecios, ascas y ascosporas. Cada estructura difiere en tamaño y forma dependiendo de la cepa y de las

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

condiciones ambientales en las que se desarrolla (Holz *et al.*, 2007; Coley-Smith *et al.*, 1980).

El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos septados y cilíndricos que se multiplican mediante división citoplasmática. Sin embargo, es común que se presente división nuclear sin que se haya producido división citoplasmática; esto da lugar a hifas cenocíticas con elevado y variable número de núcleos (Holz *et al.*, 2007).

Los conidióforos son ramificados y en conjunto con los conidios se encuentran sobre la superficie de los tejidos infectados. Los conidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo, son hialinos, unicelulares, ovoides, capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la fase de crecimiento del cultivo (Coley-Smith *et al.*, 1980).

Los esclerocios son comprimidos, irregulares o esféricos de color negro; los cuales se desarrollan sobre o debajo de la epidermis del tejido infectado. Son las principales estructuras de resistencia de la fase asexual; dependiendo de las condiciones del cultivo sus dimensiones longitudinales oscilan de 1 a 15 mm. Los esclerocios pueden dar origen a micelio o a los apotecios (estructuras de la fase sexual) que surgen individuales o en grupos, los que a su vez producen ascosporas elipsoidales y con núcleo diploide (Holz *et al.*, 2007; Coley-Smith *et al.*, 1980).

2.3. Hospederos de *Botrytis cinerea*

B. cinerea es un hongo polífago, se comporta como saprofito o parasito necrótrofo afectando casi a todas las plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas y ocasionalmente algunas pteridofitas (Gómez, 2001). Es el agente causal de la “podredumbre gris” o “moho gris”, enfermedad que provoca serias pérdidas económicas en campo y en poscosecha (Chaves y Wang, 2004; Gómez, 2001; Benito *et al.*, 2000; Jarvis, 1997).

Se han reportado pérdidas económicas en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), calabaza (*Cucurbita* sp.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), fresa (*Fragaria indica* Anrd.), uva (*Vitis vinifera* L.), manzana (*Malus domestica* Borkh), plátano (*Musa paradisiaca* L.), arándano (*Vaccinium oxycoccus* L.), naranja (*Citrus sinensis* Osbeck), pera (*Pyrus communis* L.), etc. (Merchán *et al.*, 2014; Agrios, 2005).

Dentro de los ornamentales susceptibles se encuentran: gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus), crisantemo (*Dendranthema* spp.), rosa (*Rosa* sp.), clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), entre otros (Williamson *et al.*, 2007, Agrios, 2005; Benito *et al.*, 2000; Palmucci *et al.*, 1997).

2.4. Condiciones óptimas para el desarrollo de *B. cinerea*

El clima es un factor determinante para el establecimiento y desarrollo del hongo en el tejido vegetal. Los factores de mayor influencia son: la temperatura, la humedad relativa y la luminosidad.

- a) Temperatura:** la esporulación se presenta con temperaturas de 12-22 °C, la óptima para la germinación de los conidios es de 20 °C; por su parte el micelio es capaz de crecer en temperaturas cercanas a 0 °C y los esclerocios se desarrollan cuando las temperaturas oscilan entre 11-13 °C (Lahlali *et al.*, 2007; Rabon, 2001; Chase, 2000).
- b) Humedad relativa:** las condiciones de alta humedad relativa favorecen el desarrollo del hongo. Cuando esta es superior a 90 % se estimula la germinación de los conidios, mientras que la esporulación se presenta entre 70-100 % (Barnes y Shaw, 2002).
- c) Luminosidad:** es un factor que condiciona el crecimiento y el desarrollo de las plantas, pero también el desarrollo de enfermedades. El crecimiento y esporulación del hongo se presenta con longitud de onda azul (380 a 530 nm) y ultravioleta (280 a 360 nm) (Rodríguez y Arbeláez, 1995). De acuerdo con Tan y Epton (1974), la radiación ultravioleta influye favorablemente en el desarrollo de *B. cinerea*; los autores demostraron que en cultivo *in vitro* crece en presencia de luz azul (380 a 530 nm), pero esta inhibe la esporulación, mientras que para estimular la esporulación se requiere de luz ultravioleta.

2.5. Ciclo de infección de *Botrytis cinerea*

Las esporas de *B. cinerea* se producen sobre cualquier material vegetal y son dispersadas a través de corrientes de aire, gotas de agua, materia orgánica en descomposición o residuos de material vegetativo. Una vez que las esporas han

alcanzado la superficie del huésped se inicia el ciclo de infección, el cual se divide en cinco fases (Holz *et al.*, 2007; Benito *et al.*, 2000):

1. Adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped.
2. Penetración en el tejido vegetal a través de la manipulación de procesos mecánicos, por medio de heridas o aberturas naturales.
3. Establecimiento del patógeno en la zona de penetración, causando la muerte de células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta.
4. En muchos casos se inicia una fase de latencia; a través de esta, los mecanismos de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en el área de necrosis, que corresponde a las lesiones primarias.
5. Posteriormente, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras de defensa de la planta e iniciar su diseminación en el tejido vegetal, dando paso a la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. El patógeno produce sobre el tejido infectado una generación de esporas que inician un nuevo ciclo de infección.

2.6. Daños provocados por *B. cinerea* en el cultivo de rosa

Botrytis cinerea es el agente causal de la podredumbre gris en el cultivo de rosa. Ataca tejido maduro o débil e infecta a través de aberturas naturales y heridas. Al provocar muerte celular, los síntomas se manifiestan como lesiones color pardo (Bañon *et al.*, 1993).

El daño más severo es en los botones florales, donde aparecen pequeñas manchas color rojo o púrpura; en estados avanzados de la enfermedad el micelio y las estructuras de propagación cubren toda la flor, las cuales dan una apariencia grisácea polvosa, que corresponde a los conidios del patógeno (Holz *et al.*, 2007; Agrios, 2005; Bañon *et al.*, 1993).

El patógeno causa pérdidas económicas asociadas a los síntomas en los pétalos de las flores; los síntomas también se manifiestan después de la cosecha, debido a los cambios de temperatura durante el almacenamiento y el transporte al destino de comercialización (Holz *et al.*, 2007).

2.7. Métodos de manejo de *B. cinerea*

Los daños que provoca *B. cinerea* en el cultivo de rosa ha conducido a la necesidad de controlarlo por medio de diversos métodos como son: prácticas culturales, control biológico y el control químico (Deni, 2007) siendo este último el más utilizado en la región florícola del Estado de México.

2.7.1. Prácticas culturales

Las prácticas culturales son útiles para prevenir la infección de *B. cinerea* en cultivos de flores bajo invernadero, en los que se sugiere la instalación y manejo de aperturas cenitales, manejo de cortinas (especialmente si se presenta humedad relativa mayor al 90 %), eliminación de botones de mala calidad, manejo de ventiladores y calefacción, limpieza de residuos de podas; adecuada plantación para evitar el exceso de humedad, eliminación de arvenses que puedan ser fuente de inóculo, manejo adecuado de los riegos para evitar encharcamientos, evitar el

uso de grandes caudales y riegos frecuentes, además de aplicaciones de cal al suelo (Latorre, 2013; Agrios, 2005).

2.7.2. Nutrición

Para el cultivo de rosa es importante la nutrición la cual beneficia su producción y la resistencia ante cualquier patógeno. El calcio (Ca) es un nutriente secundario, útil para el crecimiento vigoroso de las plantas; en la forma de pectato de calcio, es responsable de mantener unidas las paredes celulares. Cuando existen deficiencias, las puntas de las raíces, las hojas jóvenes y las puntas de los brotes presentan un crecimiento distorsionado debido a la formación incorrecta de la pared celular (Chango 2009).

Por su parte, el silicio es un elemento que puede suprimir enfermedades en forma tan efectiva como un fungicida (Epstein y Bloom, 2005). Según Epstein y Bloom (2005), el mecanismo de acción del Si dentro de la planta una vez aplicado al suelo reacciona con el agua transformándose en ácido monosilícico (H_4SiO_4); a su vez, el ácido monosilícico acumulado se polimeriza en ácido polisilícico y luego se transforma en sílice amorfo formando una membrana gruesa de celulosa. De esta forma, una doble capa cuticular protege y fortifica mecánicamente a las plantas. Este elemento también forma complejos de compuestos orgánicos en las paredes de las células de la epidermis aumentando la resistencia a la degradación por las enzimas liberadas por los hongos.

2.7.3. Control biológico

El control biológico se basa en el uso de microorganismos benéficos, entre estos se encuentran hongos, *levaduras*, bacterias y actinomicetos; tales microorganismos, pueden ser utilizados de manera individual o en combinación (Latorre, 2013; Plasencia *et al.*, 2012).

En España y Colombia se ha reportado el uso de levaduras como *Pichia candida* y *Rhodotorula* sp., ambas actúan como controladoras de *B. cinerea* en el cultivo de fresa y tomate. Sus mecanismos de acción son competencia por nutrientes y espacio, producen antibióticos o enzimas líticas que inhiben la germinación de los conidios y causan lisis de los tubos germinativos del patógeno en la superficie de la planta (Elad y Stewart, 2007; Filonow, 1998).

Se ha reportado al hongo *Gliocladium roseum* contra *B. cinerea*, con el cual se han obtenido resultados satisfactorios en frambuesa, semillas de coníferas, begonia y geranio (Agrios, 2005; Chaves y Wand, 2004). Además de *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum* y *T. viridae* que han sido reconocidos por sus características como biocontroladores de hongos patógenos con origen en el suelo y bacterias. Cabe destacar que tales microorganismos no solo reducen la severidad, sino también estimulan el crecimiento de las plantas (Jacometti *et al.*, 2010; Chaves y Wand, 2004).

También se ha estudiado el uso de bacterias antagónicas como controladoras de patógenos en poscosecha de frutas y vegetales; entre estas se encuentran especies del género *Pseudomonas*. Se ha reportado que tienen la capacidad de

producir metabolitos secundarios, entre estos antibióticos, que son tóxicos para hongos y bacterias (Jacometti *et al.*, 2010). Chaves y Wand (2004), reportan que algunos géneros de bacterias útiles contra *B. cinerea* en el cultivo de uva son *Bacillus*, *Pantoea* y *Pseudomonas*.

Unas de las ventajas en el uso de agentes de control biológico es la reducción en el uso de agroquímicos; no obstante, entre las desventajas se tiene que los agentes de control biológico son de acción lenta y además requieren de mayor investigación, dado que cada uno de estos actúan diferente (Lauwerys, 2007).

Las recomendaciones para el uso de productos biológicos suelen ser similares a las recomendaciones para los fungicidas, ya que los resultados dependen de las condiciones ambientales, entre estas la temperatura y la humedad relativa. A su vez, la viabilidad de los microorganismos es esencial para garantizar una correcta acción antagónica. Generalmente los productos comerciales tienen vida corta de almacén, por lo que pueden perder viabilidad aún bajo las mejores condiciones de almacenamiento (Elad y Stewart, 2007).

Los productos biológicos carecen de acción instantánea, característica de muchos fungicidas. Por este motivo, los biocontroladores se deben integrar de manera preventiva a otras estrategias de control y se deben utilizar cuando el ambiente permita el buen establecimiento, multiplicación y colonización del agente biológico en el sitio de acción. Solo bajo estas condiciones se puede esperar que el biocontrolador ejerza la actividad antagónica esperada (Elad y Stewart, 2007).

La efectividad del control biológico se obtiene únicamente al mantener un umbral poblacional mínimo en el sitio de acción, bajo dicho umbral, el control biológico pierde efectividad. Por este motivo los biocontroladores se emplean en altas concentraciones, a modo de inundar en forma rápida y total el sitio. De esta manera se logra una acción de pre-infección (preventiva) con resultados muchas veces similares o mejores que los posibles de obtener con un fungicida sistémico (Latorre, 2013; Latorre *et al.*, 1997). Los productos biológicos no tienen acción de post-infección (curativa), la acción antagónica se activa antes que el organismo patógeno se establezca y la persistencia en la planta es limitada (Elad y Stewart, 2007).

2.7.4. Control químico

El control químico es la principal estrategia que utilizan los productores para reducir el daño de *B. cinerea* en la mayoría de cultivos, entre estos el cultivo de rosa. Sin embargo, su uso es cada vez más restringido debido a los efectos secundarios que produce, entre estos la contaminación al ambiente (Vares, 2006) y la generación de resistencia, principalmente del grupo de los benzimidazoles (Elad y Stewart, 2007).

De acuerdo con el modo de acción, los fungicidas “matan” a los hongos dañando la membrana celular, inactivando enzimas o proteínas esenciales o interfiriendo con procesos importantes, tales como la producción de energía o respiración; otros impactan en rutas metabólicas específicas como la producción de esteroides o quitina. Por ejemplo, fungicidas a base de fenilamida se enlazan e inhiben la función de la polimerasa del ARN en oomicetos, mientras que los benzimidazoles

inhiben la formación de polímeros de β -tubulina usados por las células fungosas durante su división nuclear (McGrath, 2004).

Los fungicidas curativos son capaces de penetrar a la planta y eliminar selectivamente a los hongos invasores; están diseñados para identificar proteínas o enzimas específicas producidas por los hongos. El modo de acción es tan específico, que cualquier cambio en la genética puede superar la eficiencia o las poblaciones del patógeno pueden tornarse resistentes (McGrath, 2004).

2.8. Resistencia de hongos a fungicidas

La resistencia a fungicidas puede surgir como una consecuencia de cambios genéticos en la célula del hongo (Deker, 1976).

2.8.1. Origen de la resistencia

Los estudios sobre el desarrollo de resistencias a los fungicidas convencionales fueron escasos hasta la década de los 60's, excepto por el destacado trabajo de Georgopoulos y sus colaboradores sobre la tolerancia a los fungicidas pertenecientes al grupo de hidrocarburos aromáticos, y algunos informes sobre aspectos genéticos de la resistencia adquirida a algunos antibióticos y otros fungicidas experimentales (Deker, 1976; Georgopoulos y Zaracovitis, 1967).

Después de la introducción de fungicidas sistémicos, un número creciente de casos de resistencia adquirida en campo estimuló el estudio de este fenómeno en el laboratorio. Para este tipo de estudios se utilizaron hongos que son fácilmente accesibles para análisis genéticos, como *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*), *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae*, además de estos

organismos no fitopatógenos; *Venturia inaequalis*, el agente causal de la sarna de la manzana; *Ustilago maydis* y *U. hordei*, patógenos del maíz y la cebada, respectivamente; e *Hypomyces solani* (perf. *Nectria haematococca*), patógeno de *Cucurbita* spp. son utilizados para este propósito (Deker, 1976; Georgopoulos y Zaracovitis, 1967).

En casi todos los casos en que se ha analizado la resistencia a los fungicidas agrícolas, los resultados indican la mutación de genes cromosómicos. El desarrollo de la resistencia se produce principalmente por mutación en un solo gen. En una especie de hongos, a menudo se pudo demostrar más de un sitio para la resistencia a los fungicidas, siendo la resistencia mayoritariamente aditiva en los recombinantes. Usualmente existen diferentes grados de resistencia para diferentes loci; otras influencias pueden resultar de la existencia de más de un alelomorfo en cada locus que determina el grado de resistencia o sensibilidad, y también de la presencia de genes modificados (Georgopoulos y Zaracovitis, 1967).

La resistencia puede ser dominante, semidominante o recesiva. En las células haploides, las mutaciones para la resistencia se expresarán de inmediato, pero en las células heterocíticas y heterocigotas diploides la situación es más complicada.

En las bacterias, los genes de resistencia pueden estar localizados en plásmidos, que consisten en moléculas de ADN extracromosómicas que pueden transmitirse entre bacterias; la transferencia de resistencia por plásmidos podría obstaculizar el control de las enfermedades bacterianas. En algunas investigaciones ha sido posible transferir la tolerancia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*, a través

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

de *E. coli*, a *Pseudomonas glycine* y *P. phaseolicola*, tanto en condiciones *in vitro* como en la planta. No obstante, es importante destacar que los plásmidos no se han detectado en hongos (Lacy y Leary, 1975).

Trabajos de genética sobre la resistencia a los fungicidas es bastante limitado, de acuerdo a Deker (1976), se ha prestado la mayor atención a los hidrocarburos aromáticos, benzimidazoles y oxathiins.

2.8.2. Definición de resistencia a fungicidas

La resistencia se define como la habilidad desarrollada por un organismo para sobrevivir en presencia de dosis de productos químicos que previamente fueron nocivos o letales para él (Hobbelen *et al.*, 2014; Beckerman, 2013; Varés, 2006). Para el FRAC (2018c), el término -resistencia a fungicidas- lo refiere a una reducción hereditaria adquirida de la sensibilidad de un hongo a un agente antifúngico específico (o fungicida).

Deker (1976), estableció el término resistencia adquirida y señala que se usa cuando en una población, que normalmente es sensible a un biocida, surgen formas que son menos sensibles a este. La resistencia puede tener una base genética y como regla ser estable, o puede estar causada por una adaptación fisiológica y desaparecer rápidamente cuando el organismo tolerante deja de estar expuesto; algunos autores llaman a este último tipo de tolerancia sensibilidad transitoria reducida. Ambos términos se usan indistintamente, ya que no existe una base biológica sólida para distinguir entre los dos cuando se trata de la relación entre el hongo y el fungicida; por lo que la mayor atención es

principalmente sobre la resistencia estable, determinada genéticamente, ya que la resistencia transitoria rara vez alcanzará un nivel alto o causará problemas en la práctica.

Por lo tanto, la resistencia a los fungicidas ocurre cuando una población de patógenos cambia de una que es sensible a cierto ingrediente activo, a una que es insensible; es una diferencia genética en el patógeno que se transmite a las generaciones sucesivas. Desde una perspectiva práctica, la resistencia a los fungicidas se convierte en un problema cuando se observa en el campo (en lugar de solo en el laboratorio); se manifiesta cuando los fungicidas que proporcionaron un buen control en el pasado ya no son efectivos o, en algunos casos, se deben aplicar a dosis más altas y / o en intervalos más cortos para mantener el cultivo saludable (Latín, 2011).

El aumento de la resistencia tiene serias consecuencias: brotes inesperados de enfermedades, daños severos en el cultivos y aumento de los recursos para la producción de más fungicidas, pero quizás la consecuencia más significativa es la pérdida de una herramienta química importante para controlar las enfermedades en los cultivos (Latín, 2011).

El tema de la resistencia se aborda mediante el uso de una variedad de términos, los cuales contribuyen a la comprensión de los factores subyacentes responsables del desarrollo y el manejo de las poblaciones de patógenos resistentes a los fungicidas. Se usan los términos resistencia y sensibilidad reducida, la intención es

reconocer que la resistencia ocurre en varios grados y que la sensibilidad reducida implica algo menos que la resistencia completa (Latín, 2011).

Los términos aislados y cepas son intercambiables y se refieren a tipos individuales dentro de una población. No hay explicaciones simples para este fenómeno tan complejo; sin embargo, se puede adquirir un conocimiento práctico de la resistencia a los fungicidas a través de una breve discusión de la biología de la resistencia y un examen de las situaciones en que la resistencia se ha convertido en un problema (Latín, 2011).

2.8.3. Componentes biológicos y químicos de la resistencia

De acuerdo a Latín (2011), el fenómeno de resistencia a fungicidas tiene dos componentes, “un componente químico (el fungicida) y el componente biológico (el patógeno)”. A menos que ambos componentes posean ciertos atributos para favorecer el desarrollo de la resistencia esto no es una gran preocupación. Este punto importante agrega perspectiva a la discusión. La resistencia no es un problema con cada fungicida y cada patógeno, solo ciertas combinaciones de fungicida-patógeno representan una preocupación real.

2.8.3.1. El componente químico

Con los fungicidas con un sitio de acción específico se corre el riesgo de desarrollar resistencia, los compuestos con acción multisitio atacan numerosos procesos vitales en las células fúngicas. Para que se produzca resistencia con los compuestos que actúan en múltiples sitios, las mutaciones que anulan el

ingrediente activo deberían ocurrir en innumerables sitios, sin afectar la capacidad de crecimiento de los hongos. Solo existe la posibilidad más remota de que todas estas mutaciones puedan ocurrir en una cepa patógena viable.

Con los compuestos específicos del sitio se necesitan menos cambios con algunos compuestos, solo uno para reducir la efectividad de un ingrediente activo o para hacerlo completamente ineficaz. Además, no todos los fungicidas con un sitio de acción específico tienen el mismo riesgo de resistencia. El nivel de riesgo parece estar determinado por el mecanismo bioquímico de resistencia.

2.8.3.2. El componente biológico

No todos los agentes patógenos tienen el mismo riesgo de desarrollar problemas de resistencia. Para el caso específico del césped, más de dos docenas de enfermedades se manejan con fungicidas; a pesar de todo, la resistencia se ha convertido en un problema con solo cinco patógenos. Este grupo diverso de patógenos fúngicos comparten la capacidad de generar poblaciones extremadamente numerosas, por ejemplo: cuatro de las enfermedades (antracnosis, mancha gris de la hoja, mancha por *Microdochium* spp. y tizón causado por *Pythium* spp.) son causadas por productores proliferos de esporas. La quinta enfermedad (mancha del dólar) permanece activa en algunas regiones geográficas durante más de 6 meses del año. El significado es que las poblaciones de patógenos altamente proliferas tienen más oportunidades para la aparición de tipos resistentes (Infante *et al.*, 2009).

2.8.4. Mecanismos de resistencia

Para comprender los antecedentes bioquímicos y fisiológicos del fenómeno de la resistencia adquirida a los fungicidas, es indispensable conocer el modo de acción de los fungicidas en cuestión. Por otro lado, el estudio de cepas con resistencia adquirida a fungicidas puede ayudar a dilucidar el mecanismo de la acción fungicida.

El desarrollo de resistencia a un fungicida puede deberse a cambios en la célula fúngica, en mayor o menor medida que el fungicida alcance el sitio de acción. Tales cambios incluyen una permeabilidad disminuida de la membrana del protoplasto al fungicida, o aumento de la desintoxicación antes de que se alcance el sitio de acción. Si el fungicida es capaz de llegar a este sitio, la resistencia puede deberse a una disminución de la afinidad entre el producto químico y el sitio reactivo, al evadir el sitio de bloqueo mediante la operación de una vía alternativa, o para compensar los efectos de la inhibición (FRACC 2018c).

Los tipos de resistencia son: disminución de permeabilidad; conversión en un compuesto inactivo; falta de conversión en un compuesto fungitóxico; desintoxicación por unión; disminución de afinidad en el sitio reactivo; circulación (circumvention), que se refiere a una circulación de entrada y salida del fungicida en la célula; compensación, en la que puede producirse un aumento de la tolerancia cuando un organismo sensible cambia su metabolismo de tal manera que se requiere menos del producto para la inhibición o que el nivel de la enzima inhibida aumenta; otros efectos, donde la neutralización de la acción fungicida

también puede darse por un mecanismo distinto a los mencionados anteriormente. Por ejemplo, la tolerancia adquirida de cepas de *Verticillium dahliae*, al crecer en medio de agar más benomil y algunos otros fungicidas, se atribuyó a la capacidad de estas cepas para acidificar el medio, lo que puede influir en el grado de aceptación y unión de los productos químicos (Deker, 1976).

2.8.5. Grupos de fungicidas asociados con resistencia

Benzimidazoles: con este se presenta resistencia común en muchas especies de hongos, asociadas a varias mutaciones del sitio objetivo, principalmente E198A/G/K, F200Y en el gen de la β -tubulina. También se asocia con la resistencia cruzada positiva entre los miembros del grupo, o con la resistencia cruzada negativa a los N-fenilcarbamatos. Es un grupo de alto riesgo, dentro del cual se encuentran: benomyl, carbendazim, fuberidazole y el tiabendazol (FRAC, 2018a).

Imidazoles: existen grandes diferencias en los espectros de actividad de los fungicidas DMI (Inhibidores de la Desmetilación); se reporta resistencia en varias especies de hongos. Se conocen diversos mecanismos de resistencia, incluyendo mutaciones del sitio objetivo en el gen *cyp51* (*erg 11*), p. V136A, Y137F, A379G, I381V; promotor *cyp51*; transportadores ABC y otros. En general, es prudente aceptar que existe resistencia cruzada entre los fungicidas DMI activos contra el mismo hongo. Los fungicidas DMI son inhibidores de la biosíntesis de esteroides (SBI), pero no muestran resistencia cruzada a otras clases de SBI. Se considera como un grupo con riesgo medio para el desarrollo de resistencia, dentro de este

se encuentran el: Imazalil, oxpoconazole, pefurazoate, prochloraz y triflumizole (FRAC, 2018a).

Triazoles: existen grandes diferencias en los espectros de actividad de los fungicidas DMI; en general se ha reportado resistencia en varias especies de hongos. Se conocen varios mecanismos de resistencia incluyendo mutaciones del sitio objetivo en el gen *cyp51* (*erg 11*), p. V136A, Y137F, A379G, I381V; promotor *cyp51*; transportadores ABC y otros. En general, es prudente aceptar que existe resistencia cruzada entre los fungicidas DMI activos contra el mismo hongo. Los fungicidas DMI son inhibidores de la biosíntesis de esteroides (SBI), pero no muestran resistencia cruzada a otras clases de SBI. Riesgo medio. Dentro de este grupo se encuentran el: azaconazole, bitertanol, bromuconazole, cyproconazole, difenoconazole, diniconazole, epoxiconazole, etaconazole, fenbuconazole, fluquinconazole, flusilazole, flutriafol, hexaconazole, imibenconazole, ipconazole, metconazole, myclobutanil, penconazole, propiconazole, simeconazole, tebuconazole, tetraconazole, triadimefon, triadimenol y el triticonazole (FRAC, 2018a).

2.8.6. Antecedentes de resistencia a fungicidas de *B. cinerea*

Las estrategias de manejo basadas en aplicaciones de fungicidas conducen a más problemas de resistencia, debido a que el tamaño de la población de la cual individuos resistentes son seleccionados es más grande; además, es difícil erradicar a todos los hongos dentro de una planta y frecuentemente algunos patógenos escapan a la acción del fungicida (McGrath, 2004).

El uso inadecuado de plaguicidas ha conducido al desarrollo de investigaciones que abordan el desarrollo de resistencia de los patógenos a estos productos, así como el análisis de los daños al ambiente y los efectos en la salud humana (Warren-Hicks y Hart, 2010).

El desarrollo de resistencia de *B. cinerea* a fungicidas hace más difícil su control, a pesar de la gran cantidad de alternativas disponibles. El fenómeno de resistencia es provocado en gran medida por el uso repetido de ingredientes activos y dosis inadecuadas; un factor que agrava la situación es no considerar los antecedentes de resistencia de las cepas locales, lo que conduce a diseñar programas de control inapropiados y poco eficientes (Esterio y Auger. 2007).

B. cinerea es un fitopatógeno con alto riesgo para el desarrollo de resistencia a numerosos fungicidas (Latorre, 2013). Los bencimidazoles se comenzaron a utilizar a nivel mundial a inicios de 1960 y 11 años después (en 1971) se dieron a conocer los primeros casos de cepas resistentes de acuerdo a (Carreño y Álvarez.1990; los mismos autores reportan que el grupo químico de las dicarboximidazoles (i.a. iprodiona), desarrollado a principios de la década de los 70, presentó el primer caso de resistencia de *B. cinerea* en 1989 en Chile. Por otro lado, los ingredientes activos azoxystrobin y pyraclostrobin, pertenecientes al grupo de las estrobirulinas, tienen un amplio espectro de acción; actúan inhibiendo la respiración mitocondrial, y el riesgo de desarrollo de resistencia es alto (Rebollar *et al.*, 2007).

Autores como Ponce-González *et al.* (2002), destacan que el manejo de *B. cinerea* en la zona florícola del Estado de México se basa en el uso de fungicidas, principalmente con aquellos pertenecientes al grupo de los benzimidazoles. Dichos autores reportan que con benomil las cepas presentaron una CE_{50} de 250.50 a 831.68 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con un factor de resistencia respecto a una cepa sensible- entre 4,555.18 y 15,120.45; y una CE_{95} de 12,241.09 y 18,279.08 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con un factor de resistencia de 24,980.63 y 37,303.24. Con tiabendazol, la CE_{50} fue de 88.51 a 129.96 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con un factor de resistencia de 3,160 a 4,640.42 y la CE_{95} de 5,149.25 a 9,448 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con un factor de resistencia de 15745.94 y 28,892.91. Con los resultados anteriores los autores confirmaron que las cepas en estudio han desarrollado resistencia a benomil y tiabendazol.

En un estudio desarrollado por Camacho (2009), se observó que cepas provenientes de los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas, Estado de México, han perdido sensibilidad a tiabendazol; y que además presentan diferentes grados de sensibilidad a los ingredientes activos procloraz, iprodiona y clorotalonil, lo cual muestra que dependiendo del manejo del cultivo es el comportamiento del hongo ante tales fungicidas.

2.9. Uso y resistencia de los benzimidazoles

Los benzimidazoles representan el comienzo más dramático de los problemas de resistencia a fungicidas (Delp, 1987, citado por Smith, 1988). Como tal, rastrear la historia de su uso y la resistencia a estos puede servir para dirigir su utilidad continua. Además, los problemas de resistencia a benzimidazoles se pueden relacionar con los de otras clases de fungicidas (Smith, 1988).

Los benzimidazoles fueron introducidos para el manejo de enfermedades de plantas en la década de los 1960's e inicios de los 1970's. Varios fungicidas integrantes de este grupo fueron, y aun en la actualidad son, utilizados para aplicaciones foliares, en postcosecha y tratamiento a semillas, en el momento de su introducción representaron un grupo innovador con propiedades muy ventajosas en comparación con protectantes tales como los ditiocarbamatos, phthalimidas y mezclas de cobre.

Su atributo fue el modo de acción en un solo sitio en la inhibición de la polimerización de la tubulina, cuyo modo de acción permite la selectividad diferencial entre el hongo y el huésped proporcionando la seguridad de la planta con una molécula sistémica (Davidse, 1973). Las propiedades fungicidas de los benzimidazoles los hizo especialmente atractivos ya que fueron altamente efectivos a bajas tasas de uso contra una amplia gama de patógenos; su sistemicidad permitió la acción postinfección y ayudó a extender los intervalos de aplicación. Por supuesto, estas propiedades hicieron que fueran populares entre los productores que a menudo los usaron como único agente de control de enfermedades (Delf, 1987; citado por Smith, 1988).

Pocos años después del uso generalizado e intensivo, se informó de la aparición de resistencia en campo en varios patógenos. Los primeros reportes fueron en mildiu polvoriento (cenicilla) de cucurbitáceas en invernaderos, tan solo después de un año de aplicación; en *Botrytis* del ciclamen en invernaderos holandeses después de dos años de aplicación, seguido por la resistencia de *Cercospora* sobre el cultivo de cacahuate en el sureste de los Estados Unidos; y sobre

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

remolacha azucarera en Grecia. Otros casos graves fueron reportados con *Botrytis* sobre uva en Europa en 1973, para 1984 se tenían numerosos casos de resistencia de patógenos en los cuales los benzimidazoles no eran efectivos (Smith, 1988).

3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de la resistencia a los fungicidas es un proceso. Los hongos, como otros organismos, están cambiando constantemente. Ocasionalmente, bajo ciertas condiciones, estos cambios proporcionan una ventaja o desventaja en términos de la capacidad de la progenie para sobrevivir y reproducirse en otra generación. Los cambios ventajosos permiten que el individuo que contiene el cambio sobreviva y se reproduzca a tasas mayores, de modo que su progenie será un mayor porcentaje de la población en las generaciones posteriores. Esto puede ocurrir relativamente rápido en los hongos, ya que su frecuencia reproductiva (es decir, la cantidad de progenie producida por un solo individuo y la rapidez con la que completan su ciclo de vida es rápida) es alta. Por ejemplo, en una sola lesión de *Botrytis cinerea* se pueden producir miles de micro y macroconidios y un conidio puede producir una nueva lesión y esporular en horas. El cambio puede ser evolutivamente neutral, o incluso ligeramente desventajoso, en la mayoría de las condiciones y solo puede ser ventajoso cuando existen ciertos factores, este es el caso de la resistencia a los fungicidas.

En la mayoría de los casos de resistencia a los fungicidas, el cambio que conduce a una sensibilidad reducida es evolutivamente neutral, excepto cuando se aplica el fungicida específico. El fungicida está ejerciendo presión de selección sobre la población de patógenos ya que está matando a la población inicial (o de tipo silvestre) pero no mata a la población cambiada (o mutante). Cuando los cambios son ligeramente desventajosos en condiciones normales (es decir, en ausencia del

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

fungicida), la frecuencia de la población modificada puede disminuir cuando se elimina la presión de selección (FRAC, 2018b).

El cultivo de rosa (*Rosa* sp.) es seriamente afectado por el hongo *Botrytis cinerea*; el fitopatógeno puede afectar las flores en campo, en almacenamiento o durante la comercialización, por lo que disminuye considerablemente su valor comercial; por lo que los floricultores realizan aplicaciones de fungicidas de manera constante e inadecuada, abusando de las dosis y combinando productos que no generan ningún efecto sinérgico y que además tienen el potencial de dañar la salud humana y ambiental. Aunado a lo anterior, se encuentra el desarrollo de resistencia del patógeno a los fungicidas, lo que hace más difícil su manejo.

En los municipios de Villa Guerrero y Tenancingo, Estado de México, el uso de plaguicidas en la actividad florícola representa un grave problema. Uno de los fungicidas más utilizados en el manejo de *B. cinerea* es el tiabendazol, al cual se ha reportado pérdida de sensibilidad y el desarrollo de resistencia.

Derivado de lo anterior es necesario llevar a cabo investigaciones dirigidas a determinar la DL_{50} y la DL_{95} ; información fundamental para establecer el grado de eficiencia de los productos y con esto los límites de resistencia de los microorganismos en estudio.

4. HIPÓTESIS

Con base en estudios previos de sensibilidad de *Botrytis cinerea* a fungicidas, se tienen indicios de que el fungicida tiabendazol ha perdido efectividad contra cepas provenientes del cultivo de rosa de los municipios de Tenancingo y Villa Guerrero, Estado de México.

El grado de efectividad de tiabendazol frente a *Botrytis cinerea* se encuentra en función de la ubicación geográfica de las cepas; esto se debe a las diferencias en los métodos de manejo.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar el grado de efectividad *in vitro* del fungicida tiabendazol frente a cepas de *Botrytis cinerea* provenientes del cultivo de rosa, de los municipios de Villa Guerrero y Tenancingo, Estado de México.

5.2. Objetivos específicos

Determinar la DL_{50} y la DL_{95} , bajo condiciones *in vitro*, de tiabendazol contra las cepas de *Botrytis cinerea* VBc1 y TBc2.

Diferenciar a nivel *in vitro* el grado de efectividad-sensibilidad de tiabendazol, sobre las cepas de *Botrytis cinerea* VBc1 y TBc2.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo, con dirección: carretera Tenancingo – Villa Guerrero, Km 1.5, Tenancingo, Estado de México.

6.2. Material biológico

Se utilizaron las cepas de *B. cinerea* VBc1 y TBc2, provenientes de los municipios de Villa Guerrero y Tenancingo, Estado de México, respectivamente. Ambas cepas fueron aisladas previamente de botones florales de rosa; una de sus características es que han perdido sensibilidad al ingrediente activo (i. a.) tiabendazol (Tecto 60[®]) a la dosis de 0.6 g de i. a. L⁻¹, la cual es recomendada por el fabricante del producto comercial (Camacho, 2009).

6.3. Medio de cultivo

Las cepas conservadas en aceite mineral se reactivaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (Bioxon[®]), el cual se preparó adicionando 39 g de PDA en 1000 mL de agua destilada y se esterilizó en autoclave (Felisa[®]) a temperatura de 120-121 °C, con una presión de 20 Psi, durante 20 minutos. El medio estéril se vació en cajas de Petri de cristal (Kimax[®]) de 8.5 cm de diámetro; una vez solidificado se procedió a sembrar las cepas, y se mantuvieron en obscuridad dentro de una incubadora (Lindberg/blueM[®]) a temperatura de 24 ± 2 °C.

6.4. Determinación de la ventana biológica

Previo a la determinación de la DL_{50} y la DL_{95} , se realizaron bioensayos para calcular la ventana biológica; es decir, los extremos del intervalo con efecto tóxico del fungicida contra *B. cinerea*; esto con la finalidad de obtener una inhibición de crecimiento micelial cercana al 0 y 100 %.

Se evaluaron cuatro dosis de tiabendazol y un testigo (sin fungicida), cada tratamiento con siete repeticiones (Cuadro 1). Es importante señalar que las dosis fueron establecidas en función de los resultados de bioensayos anteriores realizados en el laboratorio de fitopatología del CU UAEM Tenancingo (datos no publicados).

Cuadro 1. Dosis de tiabendazol para determinar la ventana biológica de las cepas VBc1 y TBc2.

Tratamiento	Dosis de tiabendazol (g de i. a. L ⁻¹)	
	VBc1	TBc2
1	0.00	0.00
2	0.05	0.02
3	0.70	0.03
4	1.61	0.05
5	1.80	1.56

6.4.1 Preparación del medio de cultivo con fungicida

Se preparó medio de cultivo PDA tal como se describió en el apartado 6.1., una vez estéril se enfrió hasta alcanzar aproximadamente una temperatura de 50 °C; enseguida se adicionó la respectiva dosis de fungicida y se mantuvo en agitación a 50 °C en un termo agitador (Thermo Scientific®) hasta que se disolvió por completo, e inmediatamente el medio se vació en cajas de Petri de cristal de 8.5 cm de diámetro.

6.4.2. Siembra del patógeno

En el centro de cada caja se colocó un disco de 8 mm de diámetro de medio de cultivo, con crecimiento micelial de la cepa correspondiente de siete días de edad. El testigo consistió en la siembra del patógeno en medio de cultivo sin fungicida. Los tratamientos se incubaron a temperatura de 24 ± 2 °C bajo condiciones de obscuridad.

6.4.3. Análisis de resultados

Cuando al menos una repetición del testigo cubrió el 100 % de la caja de Petri se dio por finalizado el experimento. Para el análisis (con el apoyo de un plumón indeleble de punto fino) se trazó el margen del crecimiento radial de cada colonia, se tomaron fotografías (con cámara fotográfica Sony®, modelo DSC-P100) y se calculó el área de crecimiento micelial con el programa Image J (Versión: 1.50).

6.5. Determinación de la DL₅₀ y DL₉₅

6.5.1. Cálculo de las dosis de tiabendazol a evaluar

Tomando como referencia los resultados de la ventana biológica se seleccionaron las dosis más representativas, a partir de las cuales se calcularon seis dosis logarítmicas para la cepa VBc1 y siete para la TBc2 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Dosis de tiabendazol para las cepas de *B. cinerea* VBc1 y TBc2 para la determinación de la DL₅₀ y DL₉₅.

Tratamiento	Dosis de tiabendazol (g de i. a. L ⁻¹)	
	VBc1	TBc2
1	0.00	0.00
2	0.024	0.0089
3	0.075	0.05
4	0.23	0.1181
5	0.7	0.2792
6	0.958	0.66
7	--	1.56

6.5.2. Establecimiento del experimento

La preparación del medio de cultivo con fungicida, la siembra de *B. cinerea* y el cálculo del área de crecimiento micelial se realizó siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 6.2.1, 6.2.2, 6.2.3, respectivamente.

6.5.3. Diseño experimental y análisis de datos

El experimento se estableció en un diseño experimental completamente al azar con siete repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron con el programa InfoStat, versión libre.

La efectividad de las dosis se determinó con la fórmula de Abbott (1925):

$$Pr = (Po - Pc / 100 - Pc) * 100$$

Donde:

Pr= Mortalidad corregida (%)

Po=Mortalidad observada de la repetición (%)

Pc=Mortalidad del testigo sin fungicida (%)

Para asegurar la veracidad de los resultados, se realizaron dos réplicas de cada experimento. Los resultados de cada tratamiento se analizaron con la prueba t-Student ($P < 0.05$). En caso de no existir diferencias estadísticas se promediaron y se procedió al cálculo de la DL_{50} y la DL_{95} .

La mortalidad corregida –correspondiente al promedio de las réplicas- se transformó a unidades Probit, y las dosis a logaritmo. Estos datos se sometieron a una regresión lineal simple, y a partir de la ecuación generada se determinó la DL_{50} y DL_{95} de cada una de las cepas.

7. RESULTADOS

7.1. Determinación de la ventana biológica

La respuesta del patógeno *Botrytis cinerea* ante la exposición de tiabendazol fue variable para las cepas VBc1 (Villa Guerrero) y TBc2 (Tenancingo), por la naturaleza del experimento –en la que las dosis evaluadas fueron diferentes para cada cepa- no fue posible realizar un análisis estadístico que permitiera determinar las diferencias en el porcentaje de mortalidad entre estas; no obstante, los datos permitieron establecer comparaciones biológicas de la mortalidad con dosis similares (Figura 1, Cuadros 3 y 4):

- La cepa TBc2 requirió menores dosis para inhibir el crecimiento micelial, en contraste con VBc1.
- El porcentaje de mortalidad de TBc2 con 0.05 g i. a. L⁻¹ fue del 62.92 %; mientras que para VBc1 fue de 46.88 %.
- Para TBc2 a la dosis de 1.56 g i. a. L⁻¹ se registró mortalidad del 97.2 %; mientras que para VBc2 a 1.8 g i. a. L⁻¹ fue de 74.52 %.

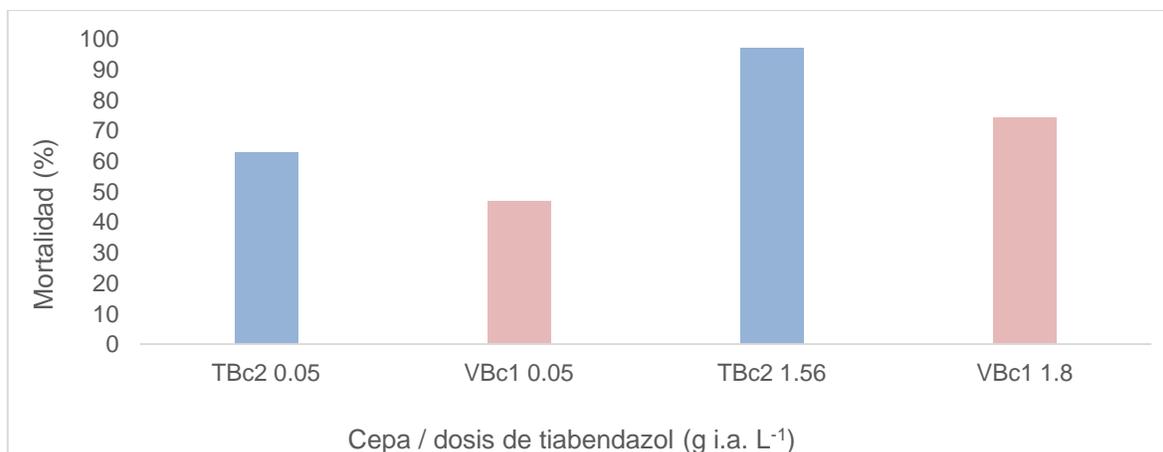


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de las cepas TBc2 y VBc1 con dosis similares, en bioensayo para determinar la ventana biológica.

7.1.1. Cepa VBc1

Se observó que con la dosis más baja (0.05 de g i. a. L⁻¹), la cepa VBc1 presentó mortalidad del 46.88 %, la cual aumentó en pequeñas proporciones conforme se adicionaron mayores cantidades de fungicida; por ejemplo al aumentar la dosis de 0.05 a 0.7 g de i. a. L⁻¹, la mortalidad se incrementó 20.50 %; de 0.7 a 1.61 g de i. a. aumentó 4.62 % y de 1.61 a 1.8 g de i. a. 2.51 % (Cuadro 3, Anexo 1).

Hasta esta etapa de la investigación, los resultados indican que para alcanzar alto porcentaje de mortalidad se requieren dosis altas de fungicida; ya que, con 1.8 g de i. a. L⁻¹ (dosis más alta) la mortalidad fue de 74.52 %. De acuerdo con el análisis de varianza no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de 0.7, 1.61 y 1.8 g de i. a. ($P < 0.001$) (Cuadro 3).

Con relación a la selección de las dosis más representativas, se consideraron los tratamientos de 0.05 y 1.8 g de i. a. L⁻¹, por ser las más cercanas a los extremos

esperados (0 y 100 % de mortalidad) y la de 0.7 g de i. a. porque la mortalidad fue intermedia respecto a los demás tratamientos (67.38 %). De acuerdo con los cálculos correspondientes se determinó que las dosis para el análisis Probit serían: 0.024, 0.075, 0.23, 0.07 y 9.58 g i. a. L⁻¹ (Cuadro 2).

En cuanto a las características culturales del hongo en el medio de cultivo con fungicidas, destaca que con el testigo y la dosis más baja (0.05 g i. a.) el crecimiento micelial en los bordes fue color blanco y de textura compacta; en el área central de la colonia el crecimiento fue de color café, lo que indica el abundante desarrollo de conidios. En los tratamientos de 0.7 a 1.8 g de i. a. L⁻¹, el crecimiento micelial fue algodonoso (Figura 2).

Cuadro 3. Comparación de medias del porcentaje de mortalidad de la cepa VBc1 con cuatro dosis de tiabendazol, en el bioensayo para determinar la ventana biológica.

Tratamiento (g de i. a. L ⁻¹)	Porcentaje de mortalidad
0.00	2.98 ^a
0.05	46.88 ^b
0.70	67.39 ^c
1.61	72.00 ^c
1.80	74.52 ^c

Comparación de medias Tukey, P<0.001.

*Cifras seguidas de la misma literal, no existen diferencias estadísticas

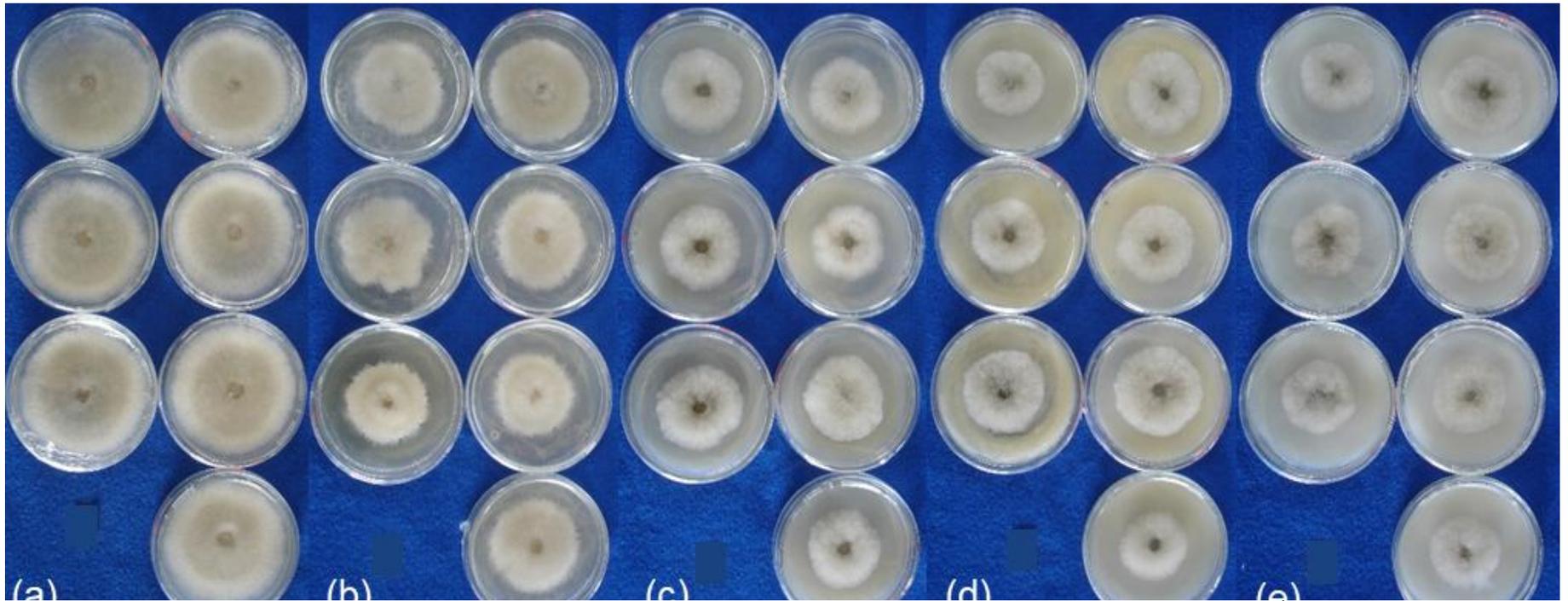


Figura 2. Crecimiento micelial al día cinco de la cepa VBc1 de *B. cinerea* con Tiabendazol, en g de i. a. L⁻¹. (a) Testigo; (b) 0.05; (c) 0.7; (d) 1.61; (e) 1.8

7.1.2. Cepa TBc2

La cepa TBc2 presentó alto porcentaje de mortalidad, el cual aumentó conforme se adicionó mayor cantidad de fungicida al medio de cultivo. Como es el caso de 0.02 a 0.03 g de i. a. L⁻¹ la mortalidad se incrementó 3.74 %, de 0.03 a 0.05 g de i. a. L⁻¹, 26.97 %; y de 0.05 a 1.56 g de i. a. L⁻¹, 34.28 % (Cuadro 4, Anexo 2).

La mortalidad de los tratamientos fue estadísticamente diferente al testigo. En lo que respecta a las dosis de 0.02 y 0.03 g de i. a. L⁻¹ no presentaron diferencias, pero sí las hubo entre 0.05 y 1.56 g de i. a. L⁻¹ (P<0.001) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de la cepa TBc2 con cuatro dosis de tiabendazol, en el bioensayo para determinar la ventana biológica.

Tratamiento (g de i. a. L ⁻¹)	Porcentaje de mortalidad*
0.00	1.64 ^a
0.02	32.24 ^b
0.03	35.98 ^b
0.05	62.92 ^c
1.56	97.20 ^d

Comparación de medias Tukey, P<0.001.

*Cifras seguidas de la misma literal, no existen diferencias estadísticas.

En el medio de cultivo el patógeno presentó diferencias en la coloración y la textura del micelio dependiendo de la dosis de fungicida: en el testigo y en las dosis de 0.02, 0.03 y 0.05 g de i. a. L⁻¹ fue blanco en los bordes y en el centro de coloración café. A la dosis más elevada (1.56 g de i. a. L⁻¹) presentó crecimiento compacto de color grisáceo; en la que aproximadamente los primeros tres días

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

después de la siembra el hongo no creció sobre el medio de cultivo, sino que limitó su crecimiento a la superficie del disco -sembrado al inicio- y se extendió hacia la superficie de la tapa de la caja de Petri (Figura 3).

Los tratamientos considerados como los más representativos para la determinación de las dosis del análisis Probit fueron 0.05 y 1.56, ya que el porcentaje de mortalidad fue cercano a 50 y 100 % (62.92 y 97.2 %), respectivamente (Cuadro 4). De acuerdo con los cálculos correspondientes, se determinó que se evaluarían en los próximos experimentos las dosis: 0.0089, 0.05, 0.1181, 0.2792, 0.66 y 1.56 g de i. a. L⁻¹ (Cuadro 2).

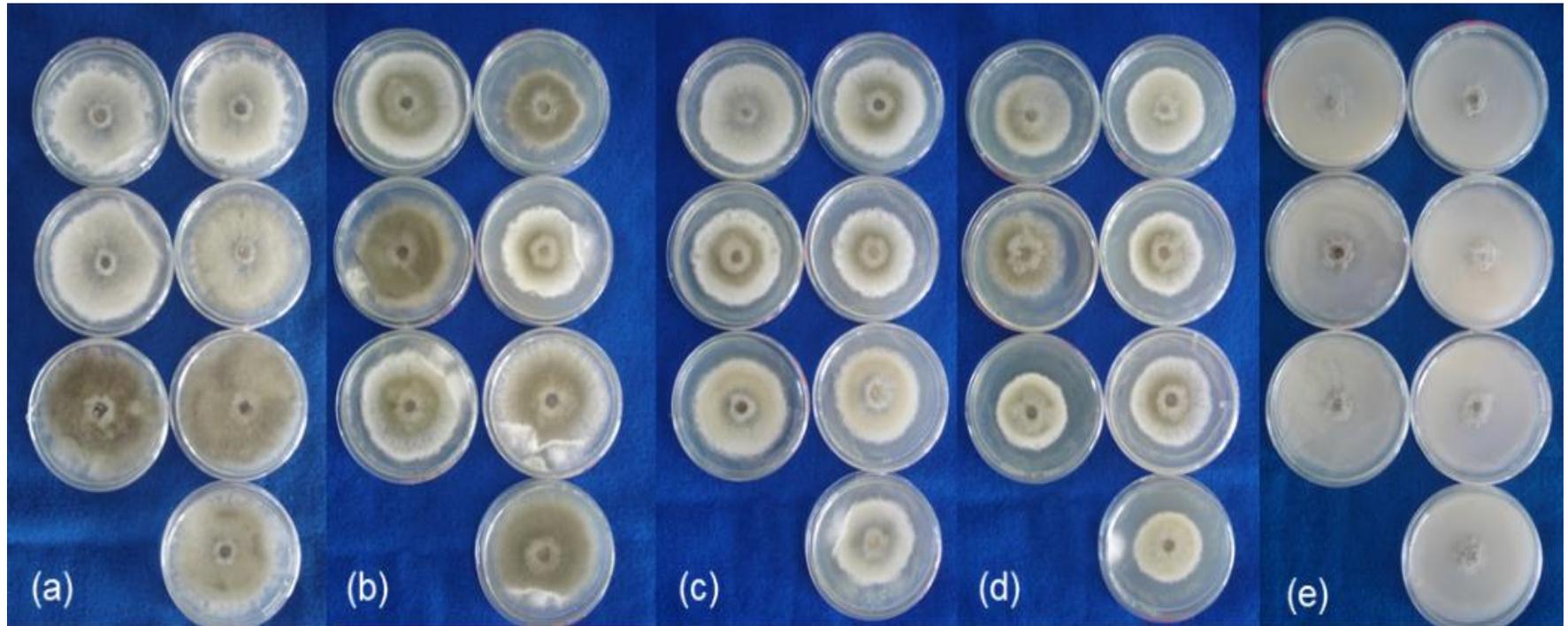


Figura 3. Crecimiento micelial al día siete después de la siembra de la cepa TBC2 de *B. cinerea* con tiabendazol, en g de i. a. L⁻¹. (a) Testigo; (b) 0.02; (c) 0.03; (d) 0.05; (e) 1.56.

7.2. Determinación de la DL₅₀ y DL₉₅

Se realizaron dos réplicas del experimento. El análisis de varianza mostró que no existen diferencias estadísticas significativas ($P=0.05$) (Anexos 5 y 6), por lo que los ensayos –para cada cepa- se analizaron como uno solo; para tal efecto se promedió el porcentaje de mortalidad de las repeticiones y enseguida se aplicó la metodología correspondiente (Cuadros 5 y 8).

La cepa VBc1 presentó mayor velocidad de crecimiento micelial comparado con TBc2; esto se observa en el testigo, donde la mortalidad natural de VBc1 fue de 0 % y en TBc2 de 50.24 % (Cuadros 5 y 8). Tales resultados no representan en el sentido estricto la mortalidad del patógeno; sino que el crecimiento micelial no alcanzó el máximo esperado durante el periodo de evaluación. En este orden de ideas, la cepa VBc1 llenó por completo la caja de Petri al quinto día después de la siembra, mientras que en los experimentos de TBc2 se dieron por terminados al día siete aun cuando ninguna de las repeticiones del testigo llenó el 100 % de la caja de Petri.

En los tratamientos con fungicida, las cepas presentaron aumento gradual en el porcentaje de mortalidad conforme se aumentó la dosis de tiabendazol. La comparación de medias Tukey ($P=<0,001$) mostró diferencias estadísticas generalmente entre los tratamientos de las dosis más bajas para ambas cepas, respecto al testigo.

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

Por otro lado, al no haber evaluado las mismas dosis para las dos cepas, no fue posible realizar un análisis estadístico; no obstante sí es posible observar que se requieren mayores dosis de fungicida para inhibir, en mayor proporción, el crecimiento de VBc1; ya que a la dosis de 0.958 g de i. a. L⁻¹ el intervalo de porcentaje de mortalidad fue de 76.29750 a 89.07062 (Cuadro 5 y 9).

7.2.1. DL₅₀ y DL₉₅ de la cepa VBc1

Al someter los datos al análisis de regresión lineal simple se obtuvo la siguiente ecuación (Figura 4):

$$y = 4.381 + 0.814 x$$

Donde:

y= Valor Probit esperado; en otros términos, es el valor de la tabla Probit para el 50 y 95 % de mortalidad, los cuales equivalen a 5 y 6.64521, respectivamente.

x= Equivale al logaritmo de la DL₅₀ o DL₉₅, según corresponda, más las dos unidades sumadas al inicio del análisis (logaritmo de la dosis+2).

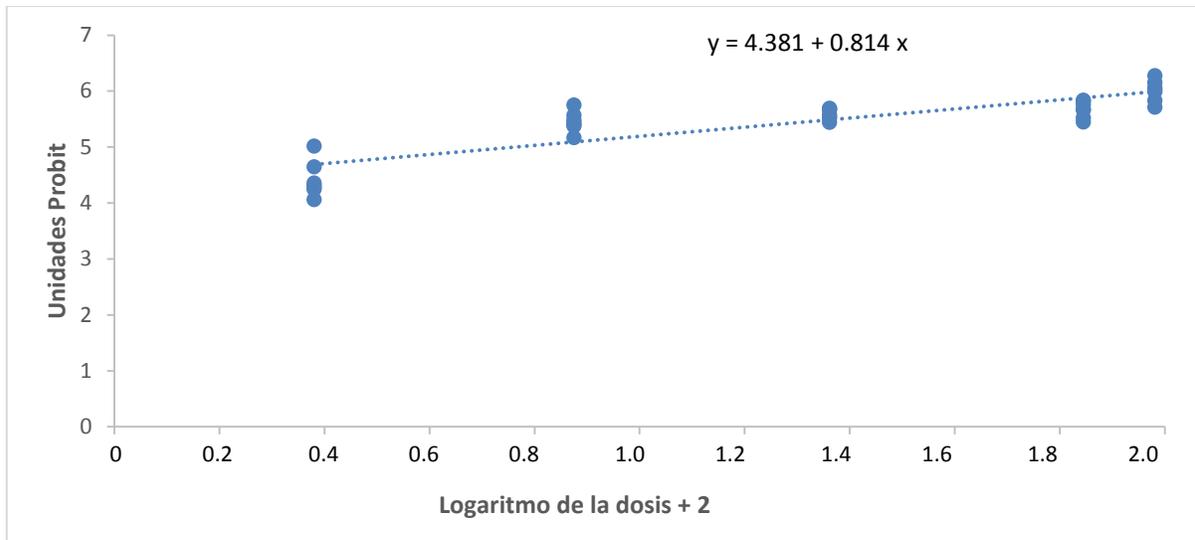


Figura 4. Dispersión y recta de la regresión lineal simple de las unidades Probit en relación con el logaritmo de la dosis + 2 de *B.cinerea* cepa VBC1.

De acuerdo con los cálculos correspondientes, se obtuvo que la DL_{50} es de 0.0576 g de i. a. L^{-1} , y la DL_{95} 6.0476 g de i. a. L^{-1} (Cuadro 7). Los resultados indican que el tiabendazol no es efectivo para el manejo de la cepa de *B. cinerea* VBC1, ya que la dosis de la DL_{95} es 907.93 % más que la recomendada por el fabricante.

7.2.2. DL_{50} y DL_{95} de la cepa TBC2

Los resultados del porcentaje de mortalidad se transformaron por medio de la aplicación de la fórmula de Abbott (1925); a partir de la cual se determinó la mortalidad real de la cepa tomando como referencia la mortalidad del testigo (mortalidad natural) (Cuadro 9).

De acuerdo con la regresión lineal simple, se obtuvo la siguiente ecuación (Fig. 5):

$$y = 3.043 + 1.226 x$$

Donde:

y= Valor Probit esperado, es decir es el valor de tabla para el 50 y 95 % de mortalidad, los cuales equivalen a 5 y 6.64521, respectivamente.

x= Equivale al logaritmo de la DL₅₀ o DL₉₅, según corresponda, más las tres unidades sumadas al inicio del análisis (logaritmo de la dosis+3).

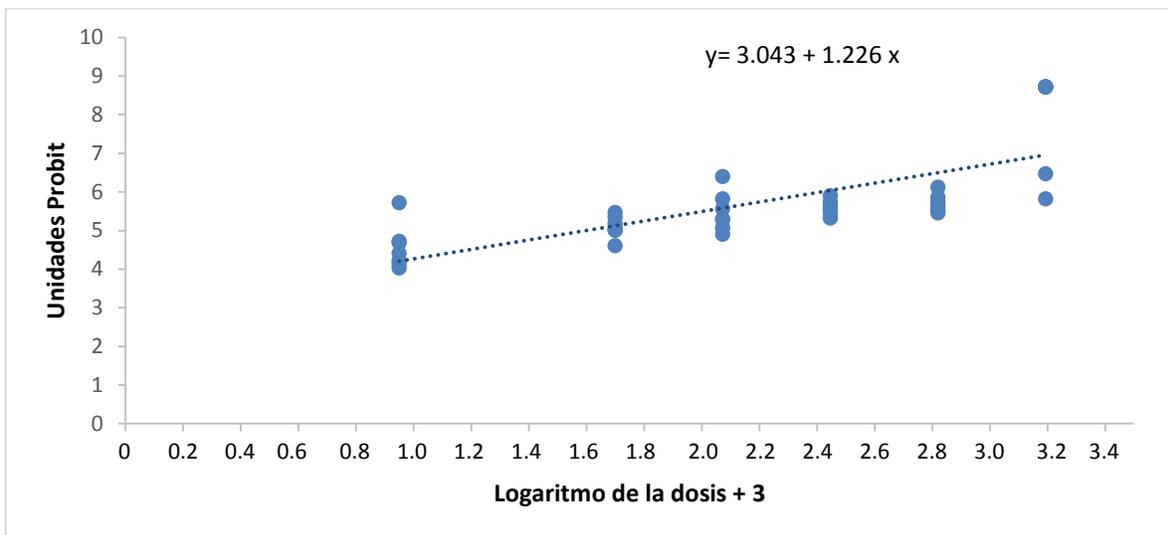


Figura 5. Dispersión y recta de la regresión lineal simple de las unidades Probit en relación con el logaritmo de la dosis + 3 de *B. cinerea* cepa TBc2.

De acuerdo con la aplicación de la ecuación se determinó que la DL₅₀ es de 0.0395 g de i. a. L⁻¹, y la DL₉₅ 0.8673 g de i. a. L⁻¹ (Cuadro 10). La última dosis indica que tiabendazol ha perdido efectividad con la cepa en cuestión, debido a que se requiere 44.6 % más de la dosis de fungicida que la recomendada.

Cuadro 5. Comparación de medias del porcentaje de mortalidad de la cepa VBc1 en las réplicas 1 y 2, con 0.0, 0.024, 0.075, 0.23, 0.7 y 0.958 g de i. a. L⁻¹ de tiabendazol, cinco días después de la siembra.

		Dosis de tiabendazol (g de i. a. L⁻¹)				
Repetición	0	0.024	0.075	0.23	0.7	0.958
1	0	22.64227	68.66346	67.19758	67.33068	79.72683
2	0	26.04827	65.64951	75.10317	75.07191	89.07062
3	0	50.77627	56.70145	71.99810	79.9144	87.61814
4	0	17.44680	64.75086	70.51971	70.01233	85.69310
5	0	32.51210	71.54342	75.60878	74.79678	83.99675
6	0	23.69089	77.48825	69.88101	79.41418	84.83376
7	0	24.67708	67.08413	75.00133	77.69907	76.29750
Promedio	0^a	28.25623^b	67.41158^c	72.18723^{cd}	74.89134^{cde}	83.89096^e

Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey (P = <0,001).

Cuadro 6. Mortalidad corregida de la cepa VBc1 ajustada por medio de la fórmula de Abbott* (1925) y valores Probit respecto a las dosis de 0.024, 0.075, 0.23, 0.7 y 0.958 g de i. a. L⁻¹ de tiabendazol.

Dosis	0.024		0.075		0.23		0.7		0.958	
Repetición	0.38021⁺	Probit⁺⁺	0.87506	Probit	1.36172	Probit	1.84509	Probit	1.98136	Probit
1	22.64217	4.24815	68.66346	5.48413	67.19758	5.44224	67.33068	5.44778	79.72683	5.83078
2	26.04827	4.35698	65.64951	5.40113	75.10317	5.67734	75.07191	5.67419	89.07062	6.27605
3	50.77627	5.0175	56.70144	5.1684	71.99810	5.57951	79.91442	5.83789	87.61814	6.15531
4	17.44680	4.06161	64.75086	5.37679	70.51971	5.53845	70.01233	5.524	85.69310	6.06254
5	32.51210	4.64667	71.54342	5.56768	75.60878	5.69321	74.79678	5.66477	83.99675	5.99032
6	23.69089	4.28104	77.48825	5.75184	69.88101	5.51826	79.41418	5.8202	84.83376	6.02788
7	24.67708	4.31316	67.08413	5.43948	75.00134	5.67419	77.69907	5.75852	76.29750	5.71248
PROMEDIO	28.25622		67.41158		72.18723		74.89134		83.89096	

* Debido a que el testigo llenó por completo el 100 % de las cajas de Petri no hubo cambios en el porcentaje de mortalidad de los tratamientos.

⁺logaritmo de la dosis +2 (para eliminar el signo negativo de la cifra) ⁺⁺valor de tabla Probit.

Cuadro 7. Procedimiento para el cálculo de la DL₅₀ y DL₉₅ para la cepa VBc1, en función de la ecuación: $y = 4.381 + 0.814x$.

Dosis letal	Valor Probit*	Aplicación de la ecuación $y = 4.381 + 0.814 x$	Restar unidades (2)^β	Antilogaritmo (g de i. a. L⁻¹)
DL ₅₀	5	0.76044226	-1.23955774	0.0576
DL ₉₅	6.64521	2.78158477	0.78158477	6.0476

* Valor de tabla.

^β Unidades sumadas para el cálculo de las dosis logarítmicas

Cuadro 8. Comparación de medias del porcentaje de mortalidad de TBc2 en las réplicas 1 y 2, con 0.0, 0.0089, 0.05, 0.1181, 0.2792, 0.66 y 1.56 g de i. a. L⁻¹ de tiabendazol, siete días después de la siembra.

Repetición	0.0	0.0089	0.05	0.1181	0.2792	0.66	1.56
1	49.61053	69.02435	81.89037	89.78079	86.13439	85.47871	89.76292
2	45.58626	64.09430	75.44709	76.50296	87.55829	88.85713	96.46705
3	45.51837	58.51929	76.46633	95.54696	81.43033	83.91010	100
4	47.63814	59.81009	84.09144	85.81280	85.04189	87.46538	100
5	48.09640	54.04391	67.51201	80.88007	83.89045	90.36857	100
6	54.69601	69.67288	78.65667	80.82915	90.84648	93.49686	100
7	60.53276	61.07766	75.23538	73.20404	88.57127	84.22811	100
Promedio	50.23978^a	62.32035^b	77.04276^c	83.22239^{cd}	86.21044^d	87.68641^d	98.03285^e

Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey (P = <0,001).

Cuadro 9. Mortalidad corregida de la cepa TBc2 ajustada por medio de la fórmula de Abbott (1925) y valores Probit respecto a las dosis 0.0089, 0.05, 0.1181, 0.2792, 0.66 y 1.56 g i.a L⁻¹ de tiabendazol.

Repetición	0.0089		0.05		0.1181		0.2792		0.66		1.56	
	0.94939 ⁺	Probi ^{++t}	1.69897	Probit	2.07225	Probit	2.44591	Probit	2.81954	Probit	3.19312	Probit
1	37.75017	4.68707	63.60622	5.34734	79.46308	5.8202	72.13514	5.58545	70.81747	5.54717	79.42718	5.8202
2	27.84254	4.41157	50.65755	5.015	52.77946	5.06756	74.99667	5.67104	77.60686	5.75852	92.90004	6.46867
3	16.63880	4.02996	52.70586	5.06756	91.05100	6.39862	62.68170	5.32084	67.66513	5.45611	100	8.71908
4	19.23284	4.12959	68.02955	5.46727	71.48887	5.56473	69.93963	5.52113	74.80997	5.6679	100	8.71908
5	7.64492	5.71896	34.71092	4.60701	61.57586	5.29194	67.62564	5.45611	80.64432	5.8631	100	8.71908
6	39.05348	4.72111	57.10765	5.17857	61.47354	5.28933	81.60474	5.90011	86.93105	6.12174	100	8.71908
7	21.78021	4.21785	50.23209	5.005	46.14984	4.90232	77.03240	5.7386	68.30422	5.47568	100	8.71908
PROMEDIO	24.27757		53.86426		66.28309		72.28798		75.25415		96.04675	

⁺logaritmo de la dosis +3 (para eliminar el signo negativo de la cifra) ⁺⁺valor de tablas.

Cuadro 10. Procedimiento para el cálculo de la DL50 y DL95 para la cepa TBc2, en función de la ecuación de la regresión: $y = 3.043 + 1.226 x$.

Dosis letal	Valor Probit*	Aplicación de la ecuación $y = 3.043 + 1.226 x$.	Restar unidades $(3)^B$	Antilogaritmo (g de i. a. L⁻¹)
DL50	5	1.596247961	-1.403752039	0.039468258
DL95	6.64521	2.938181077	-0.061818923	0.86732346

* Valor de tabla.

^B Unidades sumadas para el cálculo de las dosis logarítmicas

8. DISCUSIÓN

Las cepas TBc2 y VBc1 fueron seleccionadas de una colección de 15 aislamientos de *B. cinerea*; los cuales fueron obtenidos por Camacho en 2009 a partir de rosa cultivada en los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas, Estado de México. De manera particular, las cepas estudiadas en la presente investigación provienen de Tenancingo y Villa Guerrero respectivamente, y de acuerdo con los reportes de la autora han perdido sensibilidad a tiabendazol. Tal aseveración se debe a que con 0.6 g L⁻¹ de ingrediente activo (dosis recomendada por el fabricante del producto) se inhibió el 39.8% de crecimiento micelial de TBc2 y el 10.5% de VBc1; esto es relevante debido a que la resistencia se manifiesta como una variación genética que resulta, precisamente, de la reducción de sensibilidad (Escudero *et al.*, 2009).

La variable evaluada en todos los experimentos fue el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, dado que este es uno de los efectos del fungicida, además de ocasionar anomalías en la germinación de las esporas (FRAC, 2018b; Leroux, 2007). Lo anterior ocurre porque el tiabendazol –en conjunto con el benomil, fuberidazol y carbendazim- pertenece al grupo químico de los benzimidazoles, cuyo mecanismo de acción es la inhibición del ensamblaje de microtúbulos durante la mitosis, por la unión de la β -tubulina (FRAC, 2018a; McGrath, 2004). La tubulina es un dímero proteico que consiste en las subunidades α - y β -, principales componentes de los filamentos de los microtúbulos, fundamentales para la división de las células eucariotas (Young, 2015). Cabe señalar que, de acuerdo con Young

(2015) los benzimidazoles son utilizados con mayor frecuencia para el manejo de fitopatógenos del phylum ascomycota entre los cuales han sido reportados serios problemas de resistencia en campo. En este caso, la resistencia resulta de por lo menos tres mutaciones, específicamente las que se presentan en las posiciones 198 y 200 del gen de la beta tubulina (Leroux, 2007).

La primera etapa de la presente investigación fue determinar la ventana biológica para identificar la dosis mínima a la cual el hongo presentaba crecimiento micelial cercano al 100% y la dosis máxima con la que su crecimiento se acercaba a 0%. En todos los experimentos la mortalidad fue mayor a la reportada por Camacho (2009), por ejemplo: mientras que el autor reportó mortalidad de 10.5% para VBc1 y 39.8% para TBc2 con 0.6 g de i. a. L⁻¹; en el presente estudio con la dosis de 0.05 g de i. a. L⁻¹ el porcentaje de inhibición de VBc1 fue de 46.88% (cuadro 3) y para TBc2 62.92% (cuadro 4).

Las diferencias mencionadas pueden deberse a que Camacho (2009) calculó la mortalidad en función del diámetro de la colonia, mientras que en esta investigación se realizó a partir del área de crecimiento micelial; debido a que generalmente el patógeno no presenta crecimiento simétrico en el medio de cultivo, de tal forma que en algunos extremos la colonia puede crecer en mayor o menor proporción. No obstante, cabe señalar que coincidió en que la cepa VBc1 presenta menor sensibilidad en comparación con TBc2 (cuadros 3 y 4).

Los resultados obtenidos evidencian que las dos cepas presentan variaciones en el porcentaje de mortalidad, esto puede deberse a la exposición al fungicida a la

que han sido sometidas en campo. En este sentido, Hollomom (2015) menciona que el riesgo de resistencia aumenta cuando se presentan varios ciclos cortos por estación, cuando la dispersión de las esporas es alta en tiempo y espacio, al existir recombinación sexual y por el uso constante de un mismo ingrediente activo. De acuerdo con el FRAC (2014), hasta el año 2013 no se tenían definidos criterios científicos para determinar el riesgo de desarrollo de resistencia por parte de hongos fitopatógenos; por lo que en 2014 dicho comité publicó una clasificación basada en estudios desarrollados durante los últimos 45 años, a partir de lo cual la resistencia se clasificó como baja, media y alta, catalogadas en función del número de clases de fungicidas que involucra y el tiempo en el que se presenta.

De acuerdo con lo anterior *B. cinerea* –asociado a varios cultivos principalmente uva- se ubica en la categoría de alto riesgo. De manera complementaria, Hollomom (2015) considera el riesgo medio o alto, solo sí la resistencia se reporta para más de una clase de fungicidas; también reporta que la resistencia surge rápidamente en cultivos altamente susceptibles a patógenos a los que se les aplica extensiva y repetidamente fungicidas con un solo modo de acción.

En lo que respecta a las dosis letales, se obtuvo que la cepa de VBc1 requiere mayores dosis que TBc2. La DL_{50} para VBc1 fue de $0.0576 \text{ g i.a. L}^{-1}$, mientras que para TBC2 $0.03946 \text{ g i.a. L}^{-1}$; es decir, esta última cepa requiere 45.94% menos ingrediente activo. En lo referente a la DL_{95} , mientras que para VBc1 la dosis es de $6.0476 \text{ g i.a. L}^{-1}$, para TBC2 es de $0.867 \text{ g i.a. L}^{-1}$; lo que equivale a 597.27 % menos fungicida.

Ahora bien, si los resultados de la DL_{95} son analizados tomando en cuenta la dosis recomendada por el fabricante del producto comercial, se obtuvo que TBc2 requiere 44.6% más ingrediente activo, mientras que para VBc2 esta se eleva 907.93%. Contrastado las dosis letales dentro de una misma cepa, es evidente que tanto VBc1 como TBC2 requieren una DL_{50} baja y una DL_{95} alta; al respecto Ponce-González *et al.* (2002) mencionan que se debe a que el patógeno es altamente propenso a desarrollar resistencia; por el contrario, la propensión es baja cuando la DL_{50} es intermedia y la DL_{95} se incrementa ligeramente.

Hollomom (2015), indica que los resultados de este tipo de estudios deben ser confrontados con el comportamiento de aislamientos silvestres que nunca han sido expuestos a fungicidas. En este sentido, Ponce-González *et al.* (2002) aislaron una cepa sensible de *B. cinerea* a partir de rosa silvestre de Texcoco, Estado de México, de la que obtuvieron una DL_{50} de 0.000028 g de i. a. L^{-1} y una DL_{95} de 0.000327 g de i. a. L^{-1} . Tomando como referencia tales dosis para los resultados obtenidos en la presente investigación, se obtuvo un factor de resistencia para la DL_{50} de 2,057.14 para VBc1 y de 1,409.58 para TBc2. Mientras que el factor de resistencia para la DL_{95} es de 18,494.19 y 2,652.37 para VBc1 y TBc2, respectivamente.

De acuerdo con el análisis anterior, es evidente la elevada resistencia de las cepas al fungicida. En contraste, Ponce-González y colaboradores (2002) reportaron que el factor de resistencia de cepas obtenidas a partir de cultivos de gladiola y rosa del municipio de Villa Guerrero, para la DL_{50} osciló entre 3,160 y 4,640.42, mientras que para la DL_{95} se encontró entre 15,755.94 y 28,892.91; tales

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

hallazgos apoyan la hipótesis de la amplia distribución de cepas de *B. cinerea* resistentes a tiabendazol en la región en estudio.

9. CONCLUSIONES

Para la cepa proveniente del municipio de Villa Guerrero (VBc1), la DL_{50} fue de 0.0576 g de i. a. L^{-1} y la DL_{95} de 6.0476 g de i. a. L^{-1} . De acuerdo con tales resultados, para alcanzar una mortalidad del 95 % se requiere 907.94 % más ingrediente activo, de lo recomendado por el fabricante del producto.

Las dosis letales para la cepa de Tenancingo (TBc2) fueron las siguientes: DL_{50} fue de 0.0395 g de i. a. L^{-1} y DL_{95} de 0.8673 g de i. a. L^{-1} ; siendo esta última 44.6 % más de lo recomendado.

Los resultados evidencian que las cepas VBc1 y TBc2 requieren diferentes dosis de tiabendazol para lograr mortalidad del 50 (DL_{50}) y 95 % (DL_{95}); siendo VBc1 la que requiere mayor cantidad de fungicida.

Se concluye que el fungicida tiabendazol ha perdido efectividad contra cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de cultivos de rosa, provenientes de Tenancingo y Villa Guerrero, Estado de México.

10. RECOMENDACIONES

Se sugiere determinar el factor de resistencia de las cepas a partir de comparaciones con una cepa de *B. cinerea* sensible a tiabendazol.

Es importante determinar la DL_{50} y DL_{95} de otros fungicidas de uso común en la región.

Las cepas VBc1 y TBc2 se obtuvieron en el año 2009, por lo que es necesario realizar investigaciones con cepas de reciente aislamiento.

11. LITERATURA CITADA

Abbott, W. S. 1923. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.

Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. Limusa. México. 638 p.

Bañón, A. S., D. Cifuentes, J. A. Fernández y A. G. Benavente-García. 1993. Gerbera, Liliium, Tulipán y Rosa. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 250 p.

Barnes, S. and Shaw, M. 2002. Factors affecting symptom production by latent *Botrytis cinerea* in *primula x polyantha*. *Plant pathology* 51: 746-754.

Benito, E. P., M. Arranz y A. P. Eslava. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 43-46 p.

Beckerman, L. J. 2013. Detection of fungicide resistance. pp. 281-310. In: Nita, M. (Ed.). Fungicides. Showcases of integrated plant disease management from around the world.

Camacho, L. M. D. 2009. Aislamiento de cepas de *Botrytis cinerea* en el cultivo de *Rosa* sp. en la zona de Villa Guerrero, Estado de México y la evaluación de su sensibilidad *in vitro* a fungicidas. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Universidad Autónoma del Estado de México. México. 70 p.

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

Carreño, I. y Alvarez, M. 1990. Determinación de razas resistentes de *Botrytis cinerea* de vides a fungicidas dicarboximidas. Agricultura Técnica 50: 298-303.

Chango I. X. E. 2009. Evaluacion de tres productos a base de calcio con aplicaciones foliares, en tres dosis en el cultivo de rosa bajo invernadero. Facultad de Ecuadro. P. 85.

Chase, R. 2000. Preventing and controlling *Botrytis* blight on Greenhouse Ornamental Plants. Cleary's Hort Talk. Volume 7.

Chaves, N. y Wang, A. 2004. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa *Gliocladium roseum*. Agron. Costar. 28(2): 73-85.

Coley-Smith, J. R. Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. 1980. The biology of *Botrytis*. Academic Press, London, UK.

Davidse, L. C. 1973. Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. Pestic. Biochem. Physiol. 6: 538-546.

Dekker, J. 1976. Acquired resistance to fungicides. Annual Rev. Phytopathol. 14: 405-428.

Deni, S. 2007. Rational management of *Botrytis*-incited diseases: Integration of control measures and use of warning systems. pp. 335-347. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds.). *Botrytis: Biology, Pathology and control*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 403 p.

Elad, Y. and Stewart, A. 2007. Microbial control of *Botrytis* spp. pp. 223-241. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds.). *Botrytis:*

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

Biology, Pathology and Control. Springer. Dordrecht, The Netherlands.
403 p.

Escudero, R. M., Marín, M. M., Jaramillo, V. S., Cotes, T. J. M. 2009. Metodología de evaluación de la sensibilidad a fungicidas QoI-Fenamidone: caso de estudio *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín 62(1): 4773-4782.

Esterio, M. y Auger, J. 1997. Análisis molecular de las poblaciones de *Botrytis* presentes en vides de mesa en Chile, y su implicancia en el manejo de las enfermedades. Folleto divulgativo, pp. 683-690.

Epstein, E.; BLOOM, A. 2005. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives, 2nd Edition, Sinauer Associates, Inc., Sutherland, MA, 400.

Filonow, A. B. 1998. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Science and Technology* 8: 243-256.

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. 2014. Pathogen risk list. Disponible en línea: http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=669d419a_8 (Consultado: mayo 29 de 2018).

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. 2018b. Site of action and mechanism (s) of resistance. Disponible en línea: [http://www.frac.info/expert-fora/benzimidazoles/soa-and-mechanism\(s\)-of-resistance](http://www.frac.info/expert-fora/benzimidazoles/soa-and-mechanism(s)-of-resistance) (Consultado: julio 17 de 2018).

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. 2018a. FRAC Code List ©*2018:

Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering)

Disponible en línea: <http://www.phi-base.org/images/fracCodeList.pdf>

(Consultado: mayo 29 de 2018).

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. 2018c. Definition of fungicide

resistance. Disponible en línea. <http://www.frac.info/resistance-overview>

(consulta, noviembre 2018).

Georgopoulos, S. G. and Zaracovitis, C. 1967. Tolerance of fungi to organic

fungicides. *Ann. Rev. Phytopathol.* 5: 109-130.

Gómez, V. 2001. La podredumbre gris en los cultivos hortícolas del sudeste

español. *Terralia*. 22. Disponible en línea:

http://www.terralia.com/articulo.php?recor_dID=2210#bibliografia

(Consultado abril 22 de 2017).

Hobbelen, F. H. P., Paveley, N. D. and van den Bosch, F. 2014. The emergence of

resistance to fungicides. *PLoS One* 9(3): e91910.

Hollomom, D. W. 2015. Fungicide resistant: 40 years on and still a major problem.

Pp. 3-11. *In: Ishii, H., Hollomom, D. W. (eds.). Fungicide resistance in plant*

pathogens. Principles and a guide to practical management. Springer. ISBN

978-4-431-55642-8 (e-book), Japan.

Holz, G., Coertze, S. and Williamson, B. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant

surfaces. Pp. 9-24. *In: Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P. and Delen, N.*

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

Botrytis: Biology, Pathology and Control, ISBN 9781-4020-2626-3 (e-book), Países Bajos,.

Holz, G., Coertze, S. and Williamson, B. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. pp. 9-27. *In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds.). Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 403 p.

Infante D, B. Martínez, González N. y Yusimy R. 2009 MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. Revista de protección vegetal.

ITIS. Integrated Taxonomic Information System. 2017. Disponible en línea: <http://www.catalogueoflife.org/col/browse/classification?38129f52dc91b18378b1bd8e8aa8> (Consultado marzo 14 de 2017).

Jacometti, M. A., Wratten, S. D. and warter, M. 2010. Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. Australian Journal of Grape and Wine Research 16: 154–172.

Jarvis, W. R. 1997. Control de enfermedades en cultivos de invernadero. España, Mundi-Prensa. 334 p.

Lacy, G. H. and Leary, J. V. 1975. Transfer of antibiotic resistance plasmid RP1, into *Pseudomonas glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola* *in vitro* and *in planta*. J. Gen. Microbiol. 88: 49-57.

Lahlali, R., Najib, M., Friel, D. and Haissam, M. 2007. Predictive modelling of temperatura and water activity (solute) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. International Journal of Food Microbiology 114(1): 1-9.

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

Latin, R. 2011. A practical guide to turfgrass fungicides. APS PRESS. St. Paul, Minnesota. USA. 270 p.

Latorre, G. B. A. 2013. Control biológico de *Botrytis cinerea* en especies frutales en Chile. pp. 35-44. En: Montealegre, A. J. R. y Pérez R. LM. (Eds). Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Sanidad Vegetal. 147.

Latorre, B. A., Agostin E., San Martin, R. and Vázquez, G. S. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzanium* produced by liquid fermentation against Botrytis bunch rot of table grape in Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. pp. 209-214.

Lauwerys, R. R. 2007. Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. 5th ed. Paris: Masson. p. 240-254.

Leroux, P. 2007. Chemical Control of Botrytis and Its Resistance to Chemical Fungicides. *In*: Elad, Y., P. Williamson, and N. Delen (eds). Botrytis: Biology, Pathology and Control. Springer. The Netherlands. pp. 195-223.

McGrath, M. T. 2004. ¿Qué son los fungicidas? Disponible en línea: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicidesSpanish.aspx> (Consultado: junio 5 de 2018).

Merchán, G. J. B., Ferrucho, R. L. y Álvarez, H. J. G. 2014. Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.) Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 8(1): 44-56.

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

Mirzaei, S., E. M. Goltapeh. and M. Shams-bakhsh. 2007. Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Technology* 3(1): 65-76.

Palmucci, H. E., M. C. Rivera y E. R. Wright. 1997. *Botrytis cinerea* Pers. en plantas ornamentales cultivadas en Argentina. *Bol. San. Veg. Plagas* 23: 295-299.

Plascencia, T. R. I., Olalde P. V., Mena V. H. G., Ceja T. L. F., Venegas, G. J., Oyoque, S. G. y Angoa, P. M. V. 2012. Antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs. *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. *Ra Ximhai* 8(3): 103-110.

Ponce-González. F., García-Aguirre M. G., Lozoya-Saldaña H. y Herrera-Suárez T. 2002. Resistencia de *Botrytis cinerea* (Pers.) Fr., a dos fungicidas benzimidazoles utilizados en la floricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8: 95-105.

Rabon, M. W. A. 2001. Desarrollo del manejo integrado de *Botrytis cinerea* en lechuga lisa (*Lactuca sativa*) bajo condiciones de invernadero en la Sabana de Bogota. Trabajo de grado Facultad de agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Rebollar-Alviter, A., Madden. V. L. and Ellis, A. M. 2007. Pre-and post-infection activity of azoxystrobin, pyraclostrobin, mefenoxam, and phosphite against leather rot of strawberry, caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease* 91(5): 559-564.

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

Reboldinos, L., Vallejo I., Santos, M., Collado, G. I., Carbu, M., Cantoral, J. M.

2000. Análisis genético y relación con patogenicidad en *Botrytis cinerea*.

Rev Iberoam Micol. 37-42.

Rodríguez, R. A. y Arbelaez T. G. 1995. Efecto de un plástico fotoselectivo y de

una pantalla climática en la enfermedad causada por el hongo *Botrytis*

cinerea Pers. y en el negreamiento de los pétalos en el cultivo de rosa (*rosa*

Hybrida). Agronomía Colombiana 12(2): 127-133.

Smith, C. M. 1988. History of benzimidazole use and resistance. pp. 23-24. *In*:

Fungicide Resistance in North America. Delp C. J. (ed.). American

Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA. 133 p.

Staats, M., P. van Baarlen and J. A. L. van Kan. 2005. Molecular Phylogeny of the

Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity.

Molecular Biology and Evolution 22(2): 333-346.

Tan, K. K. and Epton, S. A. H. 1974. Effect of light on the growth and sporulation of

Botrytis cinerea. Transactions of the British Mycological Society

61(1):145-157.

Tlapal, B. B. y Mendoza, Z. C. 2002. Enfermedades de origen fungoso en

ornamentales pp. 97-118. En: Manejo Fitosanitario de Ornamentales.

Bautista, M. N., Alvarado, L. J., Chavarín, P. J. C. y Sánchez, A. H. (eds.).

Montecillo, Texcoco, Estado de México: Instituto de Fitosanidad y Colegio

de Postgraduados.

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

Vares, M. L. 2006. Resistencia de los patógenos a los fungicidas. Universidad Politécnica de Madrid. Agricultura: Revista Agropecuaria 884: 340-342.

Warren-Hicks, W.J and Hart, A. 2010. Application of uncertainty analysis to ecology risks of pesticides. CRC Press. New York. EE.UU. 192 p.

Williamson, B., Tudzynski, B. and Van Kan, A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mold disease. Molecular Plant Pathology 8(5): 561-580.

Young, D. H. 2015. Anti-tubulin agents. pp. 93-103. *In*: Ishii, H., Hollomon, D. W. Fungicide resistance in plant pathogens. Principles and a guide to practical management. Springer. ISBN 978-4-431-55642-8 (e-book).

ANEXOS

Anexo 1. Porcentaje de mortalidad de la cepa VBc1 con cuatro dosis de tiabendazol, en el bioensayo para determinar la ventana biológica.

Repetición	Dosis de tiabendazol (g i.a. L ⁻¹)				
	0.0	0.05	0.7	1.61	1.8
1	0	51.92682	74.89504	65.79244	69.86047
2	0	47.10664	59.61624	78.61112	80.61029
3	0	43.68178	69.88548	72.87085	77.67138
4	0	35.79047	72.97268	80.91759	72.41349
5	0.35017	57.04000	73.83917	74.44661	73.24603
6	2.52622	45.92929	71.49519	66.53386	75.96341
7	17.95151	46.70466	49.00577	64.85448	71.86679
Promedio	2.97541^a	46.88281^b	67.38708^c	72.00385^c	74.51884^c

Comparación de medias Tukey, P<0.001.

Cifras seguidas de la misma literal, no existen diferencias estadísticas.

Anexo 2. Porcentaje de mortalidad de la cepa TBc2 con cinco dosis de tiabendazol, en el bioensayo para determinar la ventana biológica.

Repetición	Dosis de tiabendazol (g i.a. L ⁻¹)				
	testigo 0.0	0.02	0.03	0.05	1.56
1	0	42.01311	47.95348	61.53145	97.92221
2	0	39.71200	29.94479	64.82054	96.88957
3	0	41.89877	30.02162	64.23811	96.83776
4	7.08019	38.90269	42.70095	70.94671	97.66673
5	0	17.68174	42.87960	56.93995	97.48807
6	0	35.61896	30.81128	53.47221	95.98199
7	4.43071	9.83510	27.57222	68.47409	97.60599
Promedio	1.64442^a	32.23748^b	35.98342^b	62.91758^c	97.19890^d

Comparación de medias Tukey, P<0.001.

*Cifras seguidas de la misma literal, no existen diferencias estadísticas.

Anexo 3. Transformación dosis a logaritmo de las dosis de tiabendazol para determinar la DL₅₀ y DL₉₅ de VBc1.

Dosis	Logaritmo	Logaritmo +2*
0.024	-1.61979	0.38021
0.075	-1.12493	0.87506
0.23	-0.63827	1.36172
0.7	-0.15490	1.84509
0.958	-0.01863	1.98136

*Proceso para eliminar el signo negativo

Anexo 4. Transformación dosis a logaritmo de las dosis de tiabendazol para determinar la DL₅₀ y DL₉₅ de TBc2.

Dosis	Logaritmo	Logaritmo +3*
0.0089	-2.05061	0.94939
0.05	-1.30103	1.69897
0.1181	-0.92775	2.07225
0.2792	-0.55408	2.44591
0.66	-0.18046	2.81954
1.56	0.19312	3.19312

*Proceso para eliminar el signo negativo

Anexo 5. Resultados de las réplicas para determinar el porcentaje de mortalidad de VBC1, con 0.0, 0.024, 0.075, 0.23, 0.7 y 0.958 g i.a. L⁻¹ de tiabendazol.

Repetición	Dosis de tiabendazol (g i.a. L-1)											
	0		0.024		0.075		0.23		0.7		0.958	
	Rp1	Rp2	Rp1	Rp2	Rp1	Rp2	Rp1	Rp2	Rp1	Rp2	Rp1	Rp2
1	0	0	37.83610	7.44824	63.02682	74.30011	66.23372	68.16144	70.82165	63.83971	73.40503	86.04863
2	0	0	15.11622	36.98033	64.44714	66.85188	74.82179	75.38456	79.56693	70.57689	85.36616	92.77509
3	0	0	40.19081	61.36173	62.52300	50.87989	69.66037	74.33763	82.28432	77.54453	87.25010	87.98528
4	0	0	26.14118	8.75243	54.86395	74.63778	68.25434	72.78509	72.49209	67.53256	81.76978	89.61642
5	0	0	33.63943	31.38477	61.63507	81.45177	71.14144	80.07611	78.93985	70.65371	82.32183	85.67166
6	0	0	37.41804	9.96373	69.42990	85.54660	72.90122	66.86081	79.74738	79.08099	83.35805	86.30947
7	0	0	25.33543	24.01872	63.82899	70.33927	70.49292	79.50976	83.98156	71.41658	71.40050	81.19450
Promedio	0	0	30.81103	25.70142	62.822126	72.00104	70.50083	73.87363	78.26197	71.52071	80.69605	87.08587

No existen diferencias estadísticas entre réplicas, T-student (P=0.05).

Efectividad *in vitro* de tiabendazol sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

Anexo 6. Resultados de las réplicas para determinar el porcentaje de mortalidad de TBc2, con 0.0, 0.0089, 0.05, 0.1181, 0.2792, 0.66 y 1.56 g i.a. L⁻¹ de tiabendazol.

Dosis de tiabendazol (g i.a. L ⁻¹)															
		0.0		0.0089		0.05		0.1181		0.2792		0.66		1.56	
Repetición	Rp1	Rp2													
1	35.67077	63.55028	82.28968	55.75903	84.67833	79.10242	94.40980	85.15177	82.10923	90.15954	85.47871	85.47871	86.55780	92.96804	
2	47.27815	43.89438	68.32937	59.85922	88.16036	62.73382	73.80344	79.20247	81.83946	93.27712	88.85713	88.85713	97.73105	95.20304	
3	29.92872	61.10803	75.95984	41.07873	80.56027	72.37239	100	91.09392	79.64376	83.21691	83.91010	83.91010	100	100	
4	41.82195	53.45434	79.54192	40.07825	83.55100	84.63188	84.19595	87.42965	88.86070	81.22309	87.46539	87.46539	100	100	
5	51.25864	44.93416	74.29832	33.78951	64.80803	70.21600	74.83251	86.92763	88.16215	79.61874	90.36857	90.36857	100	100	
6	57.77786	51.61417	54.28867	85.05708	91.13501	66.17834	72.45994	89.19836	83.41343	98.27953	93.49686	93.49686	100	100	
7	53.28819	67.77732	49.59534	72.55998	61.46892	89.00184	69.84975	76.55834	92.00150	85.14105	84.22811	84.22811	100	100	
Promedio	45.28918	55.19039	69.18616	55.45454	79.19456	74.89096	81.36448	85.08031	85.14718	87.27371	87.68641	87.68641	97.75555	98.31015	

No existen diferencias estadísticas entre réplicas, T-student (P=0.05).

Anexo 7. Glosario (Latín, 2011)

Resistencia: La resistencia ocurre cuando un fungicida ya no proporciona niveles aceptables de control de la enfermedad porque la mayoría de los individuos en la población de patógenos son insensibles al ingrediente activo.

Sensibilidad: Los fungicidas son efectivos contra individuos sensibles, aislados o cepas. Se espera un buen control cuando la población de patógenos se compone de individuos predominantemente sensibles.

Sensibilidad reducida: La sensibilidad reducida implica algo menos que la resistencia completa. Los individuos, aislados o cepas con sensibilidad reducida se controlan en menor grado que los tipos sensibles.

Mutación: La mutación es la fuente última de variación o carga dentro de una población. Es un cambio natural y espontáneo en el ADN de los hongos. Con respecto a la resistencia a los fungicidas, el mutante de interés cambia de uno que es sensible a un fungicida a uno que es insensible.

Selección: La selección es un proceso por el cual los individuos con alguna ventaja adaptativa son seleccionados o pueden superar a otros y ser predominantes en una población. Por ejemplo, en presencia de un fungicida dado, los individuos insensibles continúan infectando y colonizando las plantas mientras se suprimen los individuos sensibles. Por lo tanto, son naturalmente seleccionados para un mayor crecimiento debido a su ventaja competitiva.

Presión de selección: La presión de selección es una fuerza aplicada a una población de patógenos. Determina la tasa de cambio en la población. El aumento de la presión de selección al aplicar repetidamente el mismo fungicida acelera la evolución de las poblaciones de patógenos resistentes a los fungicidas.

Sitio de destino (sitio blanco): El sitio objetivo es la proteína particular o el proceso bioquímico que es interrumpido por el ingrediente activo del fungicida.

Sitio específico: El sitio específico describe los fungicidas cuyos ingredientes activos, o inhibidores, afectan a un solo sitio objetivo bioquímico en la célula del hongo. Los inhibidores específicos del sitio están en riesgo de desarrollar resistencia entre algunas poblaciones de patógenos.

Multi-sitios: Describe fungicidas con ingredientes activos que afectan a una variedad de diferentes sitios objetivo dentro de la célula fúngica. La probabilidad de que un patógeno fúngico desarrolle resistencia a un fungicida de sitios múltiples es remota. No hay informes confirmados de patógenos del césped que hayan desarrollado resistencia a compuestos de sitios múltiples.

Monogénico: Característica monogénica en la naturaleza genética de la resistencia. Cuando la resistencia es monogénica, la mutación es el resultado de un cambio en un solo gen principal. El cambio a poblaciones resistentes es rápido con presión de selección repetida.

Poligénico: Cuando la resistencia es poligénica, se sospecha que las mutaciones en varios genes menores causan la insensibilidad a los fungicidas. La acumulación

(incremento) de patógenos resistentes es gradual cuando la resistencia es poligénica.

Resistencia cruzada: La resistencia cruzada ocurre cuando los individuos o una cepa resistente a un fungicida dado también es resistente a otros fungicidas dentro de la misma clase química. Por ejemplo, una cepa de *Sclerotinia homoeocarpa* que es resistente al fungicida DMI propiconazol es resistente a otros fungicidas DMI, como fenarimol, myclobutanil y triadimefon.

Resistencia múltiple: La resistencia múltiple ocurre cuando los individuos o una cepa resistente a un fungicida en una cierta clase química también posee resistencia a los fungicidas en una clase química diferente. Por ejemplo, hay cepas del patógeno antracnosis (*Colletotrichum cerealela*) que exhiben resistencia múltiple a los fungicidas tanto de QoI como de bencimidazol.

Consecuencias “penalización” del estado físico: El estado físico es la capacidad de un individuo o raza para competir por la supervivencia en una población. Un castigo del estado físico es la reducción de habilidades competitivas. Algunas cepas de patógenos resistentes a los fungicidas sufren consecuencias por adecuación tal que, en ausencia de la sustancia química, no pueden competir por sobrevivir con las cepas sensibles. Como resultado, disminuyen en frecuencia en la población cuando se elimina la presión de selección.

Distribución de sensibilidad cualitativa: Las distribuciones de sensibilidad describen la composición de las poblaciones con respecto a sus individuos

sensibles y resistentes a los fungicidas. Las poblaciones con distribuciones cualitativas están compuestas de dos tipos, sensibles y resistentes. Esta es una característica de las poblaciones de *S. homoeocarpa* y su sensibilidad a los fungicidas de bencimidazol, tal como el tiofonato-metilo.

Distribución de sensibilidad cuantitativa: Las poblaciones de patógenos con distribuciones de sensibilidad cuantitativas están compuestas por individuos con diversos grados de sensibilidad. Algunos individuos son completamente resistentes, otros son completamente sensibles y otros son levemente o moderadamente insensibles. La presión de selección con un fungicida dado, generalmente resulta en un cambio gradual hacia individuos predominantemente resistentes. Se observa distribución cuantitativa en fungicidas con resistencia poligénicos.

Fitomovilidad: De acuerdo a la movilidad en la planta los fungicidas se clasifican como un fungicida de contacto o como fungicidas penetrantes: penetrante local, penetrante acropétala o penetrante sistémico. Los fungicidas de contacto permanecen en el exterior de la planta y no pueden afectar las infecciones existentes. Los penetrantes locales pueden moverse solo a través de las superficies de las hojas, debajo del área de depósito. Los penetrantes de forma acropétala entran en la corriente del xilema y se distribuyen hacia arriba (transporte de la base hacia el ápice), hacia las puntas de las hojas. Los fungicidas sistémicos son móviles de floema y xilema (acropétala -transporte de la base hacia el ápice- y/o basipétala -transporte del ápice hacia la base-) y, por lo tanto, se distribuyen a las raíces.

Terminología moderna para fungicidas de contacto y penetrantes

Fungicida de contacto: Los fungicidas de contacto permanecen en las superficies de las plantas. El único movimiento es la redistribución que puede ocurrir con la precipitación, el riego y el rocío.

Fungicida penetrante: Los fungicidas penetrantes se absorben en los tejidos de las plantas. Su capacidad para moverse dentro de las plantas se divide en tres categorías.

Penetrante acropétala: El fungicida penetrante de acropétala se mueve entre las células a lo largo de un gradiente de potencial de agua (presión). Son móviles de xilema y se desplazan hacia arriba hacia las puntas de las hojas y los márgenes.

Penetrante local: Los fungicidas de penetración local se difunden en la cutícula cerosa. La mayor parte del ingrediente activo permanece allí porque los fungicidas penetrantes locales tienen una atracción química para los compuestos de cera. Algunos ingredientes activos se mueven a través de la cutícula entre las células hacia la cutícula en el lado opuesto de la hoja.

Penetrante sistemático: Los fungicidas penetrantes sistémicos se mueven a través de los protoplastos de células vivas siguiendo un gradiente de densidad de azúcar desde áreas de alta concentración (hojas expandidas) a áreas de baja concentración (raíces y hojas recién emergentes).